
Aquadien™ DNA Extraction and Purification Kit
iQ-Check™ Screen *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

User Guide

Tests for the DNA extraction, purification, and real-time PCR detection and quantification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples

Catalog #3578121, Aquadien DNA Extraction and Purification Kit
Catalog #3578104, iQ-Check Screen *Legionella* spp. Kit
Catalog #3578102, iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
Catalog #3578105, iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
Catalog #3578103, iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	The iQ-Check <i>Legionella</i> Technology	1
Section 3	Kit Components	2
Section 4	Shelf Life and Storage	3
Section 5	Materials Required but Not Supplied	3
	Equipment.....	3
	Supplies	3
Section 6	Safety Precautions and Recommendations for Best Results	4
Section 7	Protocol.....	5
	A. Sampling and Transportation	5
	B. Water Filtration and DNA Extraction	5
	C. Real-Time PCR.....	10
	D. Data Analysis	11
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	17
Section 9	Confirmation of Single Colonies Using the iQ-Check Kit.....	18
Section 10	Test Performance and Validations.....	18
Section 11	References.....	19
Section 12	Revision History.....	19
	Appendix 1 — Membrane Folding Guide	20
	Appendix 2 — PCR Mix Calculation Guide	21

Section 1

Introduction

Legionella are gram-negative bacteria present in all aquatic environments. Infection can cause acute pneumonia, Legionnaires' disease, and a milder form of pulmonary infection, Pontiac fever. In Europe, the number of declared cases of Legionnaires' disease increases by 25% per year. In the United States, the Centers for Disease Control and Prevention estimates the number of cases of Legionellosis at between 10,000 and 20,000 per year. *Legionella pneumophila* species is responsible for approximately 90% of all clinical cases.

Regular control of the presence of *Legionella* in water supply systems such as air conditioning cooling towers, spa pools, fountains, hot and cold-water systems, is the only way of preventing the disease. Detection of *Legionella* is compulsory or strongly recommended in most developed countries. Conventional culture methods for detection of *Legionella* spp. and *L. pneumophila* in water samples present several disadvantages, including low sensitivity and long incubation periods (10–14 days for positive samples).

The Aquadien Kit allows an optimal DNA extraction and purification from bacteria present in water samples for subsequent real-time polymerase chain reaction (PCR) detection. The principle of the extraction is based on alkaline lysis of bacteria in the presence of thermal shock and DNA purification using ultrafiltration.

The iQ-Check *Legionella* spp. and iQ-Check *L. pneumophila* Kits are formulated for rapid detection or quantification of *Legionella* (spp. or *pneumophila*) in water samples. Quantification is possible with the use of the calibrated iQ-Check *Legionella* DNA Quantification Standards in the amplification step. The results are obtained in less than 3 hr following the filtration and DNA extraction step.

Section 2

iQ-Check *Legionella* Technology

The iQ-Check *Legionella* Kits are tests based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain DNA primers and a DNA probe specific for *Legionella* spp. or *L. pneumophila*, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX96 Touch Deep Well and CFX Opus 96 Real-Time PCR Systems.

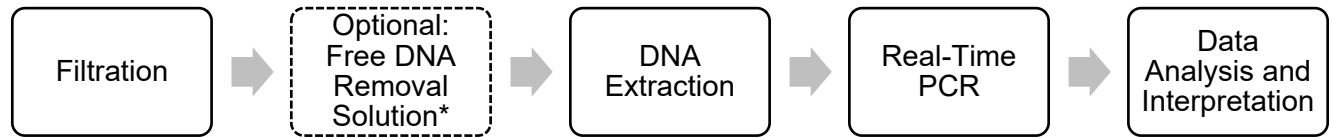
PCR is a powerful technique used to generate many copies of target DNA. During the PCR reaction, several cycles of heating and cooling denature the DNA. Primers then anneal to the target region, where the DNA polymerase uses the primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

In real-time PCR, specific probes detect the DNA during amplification by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore that fluoresces only when hybridized to the target sequence. FAM is the fluorophore linked to the probe in this kit that hybridizes to the *Legionella* spp.– or *L. pneumophila*–specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected. As the number of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. At the annealing step of each PCR cycle, the optical module or detector measures this fluorescence. The software associated with the instrument plots fluorescence intensity against number of cycles. This method allows a simple determination of the presence or absence of *Legionella* spp. or *L. pneumophila* in a sample.

Section 3 Kit Components

A synthetic DNA internal control is included in the reaction mix. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *Legionella* spp. or *L. pneumophila* target DNA sequence and is detected by a second fluorophore (HEX). This allows for the validation of any negative result.

The iQ-Check kits can detect or quantify *Legionella* spp. or *L. pneumophila* in water samples in four main steps:



* Please refer to the user guide of the iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391) for conditions of use.

Section 3 Kit Components

The Aquadien DNA Extraction and Purification Kit contains sufficient reagents for 96 tests (94 samples).

Reagent ID	Reagent	Quantity Provided, ml
R1	Lysis solution	2 bottles, 100
R2	Elution buffer	1 tube, 25
	Cryotube (4.5 ml)	100 tubes
	Purification column	96 columns
	Collector vials	192 vials

The iQ-Check Screen *Legionella* spp. and *L. pneumophila* Kits contain sufficient reagents for 96 tests (94 samples). The Quanti *Legionella* spp. and *L. pneumophila* Kits additionally contain quantification standards sufficient to quantify up to 43 samples.

Reagent ID	Reagent	Quantity Provided, ml
B	Fluorescent probes	1 tube, 0.55
C	Amplification mix	1 tube, 4.4
D	PCR negative control	1 tube, 0.5
E	PCR positive control	1 tube, 0.25
Qs1	PCR standard 1	1 tube, 0.08 (white cap)
Qs2	PCR standard 2	1 tube, 0.08 (yellow cap)
Qs3	PCR standard 3	1 tube, 0.08 (orange cap)
Qs4	PCR standard 4	1 tube, 0.08 (red cap)
	Reference material ¹	1 tube, 0.08 (blue cap)
	Calibration card	1 card

¹ The reference material contains calibrated DNA connected to the standard reference material, independent from the quantification standards.

Section 4

Shelf Life and Storage

Once received, the kit must be stored at 2–8°C. Reagents stored at this temperature can be used until the expiration date indicated on the tubes. Do not freeze the reagents.

Section 5

Materials Required but Not Supplied

Equipment

- Bunsen burner
- Filtration apparatus mounted either on an air pump or vacuum flask
- Biosafety cabinet — Class II
- Water bath, preferably with lid, capable of maintaining $95 \pm 5^\circ\text{C}$
- Vortexer
- Magnetic stir plate
- Heating thermoshaker* capable of maintaining 95°C , with a mixing speed of 1,300 rpm
- Centrifuge with fixed angle rotor, preferably refrigerated
 - Capable of holding 1.5–2.0 ml tubes with a rotation capacity of 6,000 x g
 - Capable of holding 1.5–2.0 ml tubes with a rotation capacity of 12,000 x g for dirty/clogging water samples
- 20, 200, and 1,000 μl micropipets
- Bio-Rad real-time PCR system;* for example, the CFX96 Touch Deep Well (catalog #3600037) or CFX Opus 96 (catalog # 17007992) Real-Time PCR Systems

Note: We recommend using an uninterrupted power supply (UPS) with the thermal cycler.

* Contact Bio-Rad Technical Support for information on recommended instruments.

Supplies

- Aquadien Reagent W2, 5 ml, for dirty/clogging water samples (catalog #3578119)
- Aquadien Lysis Solution R1, 100 ml (catalog #3578125)
- *Legionella* DNA Free Water, 1 L (catalog #12006823)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)

Section 6 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- Polycarbonate membrane filter, porosity of 0.45 µm
- Disposable sterile funnel, 250 ml
- Sterile metallic inox tweezers with rounded ends
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Sterile tubes, 2 ml
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Powder-free gloves
- Single-use respiratory mask
- Bleach, 5%
- Alcohol, 70%
- Cleaning agent such as DNA away or RNase AWAY

Section 6 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- This test must be performed by trained personnel
- Water samples must be handled as potentially infectious material and discarded according to local rules and regulations
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
- The quality of results depends on strict compliance with Good Laboratory Practices (for example, the ISO 8199 and ISO/TS 12869 standards), especially concerning PCR:
 - Never circulate laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) from one workstation to another
 - Decontaminate small laboratory material used for the filtration (for example, the metal tweezers) after each extraction with alcohol and sterilize it by burning on the Bunsen burner
 - Check that tweezers are not hot before use
 - Always use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions
 - A negative control should be used during DNA extraction
 - Do not use reagents after their expiration date
 - Vortex reagents from the kit before using them to ensure homogeneity
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets, as well as correct functioning of the instruments

- Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
- Clean work spaces periodically with 5% bleach then rinse with sterile *Legionella* DNA Free Water and 70% alcohol or with other decontaminating agents, such as DNA AWAY
- Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both will interfere with data acquisition
- For quantification, it is necessary to test each sample, control, and all quantification standards in duplicate. Reference material should be tested according to the NF T90-471 and ISO/TS 12869 standards. Do not mix quantification standards from different batches

Section 7 Protocol

It is strongly recommended to read the entire protocol before starting the test.

A. Sampling and Transportation

Water samples should be collected according to the general standards for bacteria detection and enumeration (NF T90-471 and ISO/TS 12869). The quality of results depends on strict compliance with good practices of water sampling for microbiological analysis (for example, the ISO 19458 standard), especially concerning PCR

B. Water Filtration and DNA Extraction

General recommendations

- Switch on the water bath and/or the heating thermoshaker and set to $95 \pm 5^\circ\text{C}$. Check the level of the water bath for adequate submersion of the 4.5 ml cryotubes.
- Prepare the number of tubes corresponding to the number of samples for DNA extraction. Pipet x ml of R1 in each tube, depending on the chosen protocol.

Note: Pipet R1 while stirring at medium speed on a stir plate in order to keep the resin in suspension. Use a pipet tip with a wide opening (for example, use a 1000 μl pipet with the corresponding tip).

- Prepare the number of purification columns required by placing a column in each collector vial.

Water filtration

1. Rinse the filtration ramp with 100 ml of *Legionella* DNA Free Water and then decontaminate the ramp by burning with alcohol. Make sure the ramp is dry and cool before positioning the membrane filter. This operation should be repeated after each filtered sample in order to avoid DNA or bacterial contamination between sample filtrations.
2. Place the membrane filter on the filtration apparatus. Place the sterile funnels.
3. Filter 100 ml – 1 L of water sample over the membrane filter.

Aquadien DNA extraction and purification

1. Carefully fold the membrane in half three times to obtain a cone (see Appendix 1).
2. Using tweezers, place the membrane in a cryotube containing 2 ml of R1. The point of the cone formed by the membrane should be positioned toward the top of the cryotube.
3. Vortex for 20 sec.

Note: Check that the membrane is still totally immersed in R1 solution.

4. Incubate in a covered water bath at $95 \pm 5^\circ\text{C}$ for 15 min.
5. Vortex for 20 sec.
6. Using a 1 ml sterile filtered pipet tip, carefully remove the membrane by pressing it to the wall of the cryotube in order to recover all the lysate. Throw away the membrane.
7. Allow the cryotubes to sit at room temperature for 20 min. The resin of the R1 solution will pellet at the bottom of the cryotube. The supernatant contains 1.6 ml of extracted DNA. It is also possible to centrifuge the cryotubes at $900 \times g$ for 3 min in a centrifuge adapted for 4.5 ml tubes. Verify that the tubes are at room temperature before starting the purification step.
8. Transfer 500 μl of the supernatant to a purification column. Do not vortex the lysate before collection.
9. Seal each column with the collector vial cap.

Note: Do not pipet the resin pellet. If this occurs, wait 5 min for the resin to pellet again or centrifuge at $900 \times g$ for 3 min.

10. Centrifuge at $6,000 \times g$ for 10 min. If the centrifuge temperature is programmable, set to 20°C .

Note: If clogging of the purification column occurs, increase the centrifugation time without increasing the centrifugation speed.

11. Throw away the liquid contained in the collector vial.
12. Repeat step 8 by pipetting an additional 500 μl of the supernatant in the same purification column and seal with the collector cap.
13. Centrifuge at $6,000 \times g$ for 10 min. If the centrifuge temperature is programmable, set to 20°C .

Note: If clogging of the purification column occurs, increase the centrifugation time without increasing the centrifugation speed. Check that all supernatant is filtered through the column. If not, centrifuge again. If clogging still occurs after a second centrifugation, follow the protocol for dirty/clogging water samples below.

14. Add 100 μl of R2 solution in the purification column.
15. Throw away the collector vial. Cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole unit upside down.
16. Centrifuge at $1,000 \times g$ for 3 min. If the centrifuge temperature is programmable, set to 20°C . Throw away the purification column.

Note: In this step, the cap cannot be closed.

17. Store the collector vial containing the 100 μ l of purified DNA solution. Use 5 μ l of the DNA solution for each real-time PCR reaction. The DNA solution can be stored for several months at -20°C . The calculation of the Z factor ($Z = 32$) is detailed in Section 7 Protocol, D. Data Analysis, Calculation of the Analyzed Fraction of Sample.

Aquadien DNA extraction and purification — short protocol

1. Carefully fold the membrane in half three times to obtain a cone (see Appendix 1).
2. Using tweezers, place the membrane in a tube containing 1 ml of R1. The point of the cone formed by the membrane should be positioned toward the top of the tube.
3. Incubate at 95°C for 15 min at 1,300 rpm in a heating thermoshaker.
4. Carefully take out the membrane by pressing it to the wall of the tube in order to recover all the lysate. Throw away the membrane.
5. Centrifuge at $900 \times g$ for 3 min.
6. Transfer 500 μ l of the supernatant to a purification column. Do not vortex the lysate before collection.
7. Seal each column with the collector vial cap.

Note: Do not pipet the resin pellet. If this occurs, wait 5 min for the resin to pellet again or centrifuge at $900 \times g$ for 3 min.

8. Centrifuge at $6,000 \times g$ for 10 min. If the centrifuge temperature is programmable, set to 20°C .

Note: If clogging of the purification column occurs, increase the centrifugation time without increasing the centrifugation speed.

9. Add 100 μ l of R2 solution in the purification column.
10. Throw away the collector vial. Cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole unit upside down.
11. Centrifuge at $1,000 \times g$ for 3 min. If the centrifuge temperature is programmable, set to 20°C . Throw away the purification column.

Note: In this step, the cap cannot be closed.

12. Store the collector vial containing the 100 μ l of purified DNA solution. Use 5 μ l of the DNA solution for each real-time PCR reaction. The DNA solution can be stored for several months at -20°C . The calculation of the Z factor ($Z = 32$) is detailed in Section 7 Protocol, D. Data Analysis, Calculation of the Analyzed Fraction of Sample.

Aquadien DNA extraction and purification — dirty/clogging water samples

1. Carefully fold the membrane in half three times to obtain a cone (see Appendix 1).
2. Using tweezers, place the membrane in the cryotube containing 2 ml of R1. The point of the cone formed by the membrane should be positioned toward the top of the cryotube.

Section 7 Protocol

3. Vortex 20 sec.

Note: Check that the membrane is still totally submerged in R1 solution.

4. Incubate in a covered water bath at $95 \pm 5^\circ\text{C}$ for 15 min.

5. Vortex 20 sec.

6. Using a 1 ml sterile filtered pipet tip, carefully remove the membrane by pressing it to the wall of the cryotube in order to recover all the lysate. Throw away the membrane.

7. Transfer the sample, including the resin, to a new 2 ml tube. Throw away the cryotube. The lysate can be stored at $2\text{--}8^\circ\text{C}$ for 24–72 hr.

8. Add 200 μl of cool (4°C) W2 buffer. Vortex 5 sec.

9. Allow the tube to sit in a refrigerator at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 min.

10. Centrifuge at 12,000 x g at 4°C for 15 min.

11. Transfer 500 μl of the supernatant to a purification column. Do not vortex the lysate before collection. Seal each column with the collector vial cap.

Note: Do not pipet the resin pellet. If this occurs, wait 5 min for the resin to pellet again or centrifuge at 900 x g for 3 min.

12. Centrifuge at 6,000 x g at 20°C for 10 min.

Note: If clogging of the purification column occurs, increase the centrifugation time without increasing the centrifugation speed.

13. Throw away the liquid contained in the collector vial.

14. Repeat step 11 by pipetting an additional 500 μl of the supernatant in the same purification column and seal with the collector cap.

15. Centrifuge at 6,000 x g at 20°C for 10 min.

Note: If clogging of the purification column occurs, increase the centrifugation time without increasing the centrifugation speed. Check that all supernatant is filtered through the column. If not, centrifuge again.

16. Throw away the liquid contained in the collector vial.

17. Add 250 μl of R2 solution in the purification column.

18. Centrifuge at 6,000 x g at 20°C for 5 min.

19. Add 100 μl of R2 solution in the purification column.

20. Throw away the collector vial and cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole unit upside down.

21. Centrifuge at 1,000 x g at 20°C for 3 min. Throw away the purification column.

Note: In this step, the cap cannot be closed.

22. Store the collector vial containing the 100 µl of purified DNA solution. Use 5 µl of the DNA solution for each real-time PCR reaction. The DNA solution can be stored for several months at –20°C. The calculation of the Z factor ($Z = 36$) is detailed in Section 7 Protocol, D. Data Analysis, Calculation of the Analyzed Fraction of Sample.

Aquadien DNA extraction and purification — dirty/clogging water samples — short protocol

1. Carefully fold the membrane in half three times to obtain a cone (see Appendix 1).
2. Using tweezers, place the membrane in a tube containing 1 ml of R1. The point of the cone formed by the membrane should be positioned toward the top of the tube.
3. Incubate at 95°C for 15 min at 1,300 rpm in a thermoshaker.
4. Carefully take out the membrane by pressing it to the wall of the tube in order to recover all the lysate. Throw away the membrane.
5. Add 100 µl of cool (4°C) W2 buffer. Vortex 5 sec.
6. Allow the tube to sit in a refrigerator at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 min.
7. Centrifuge at 12,000 x g at 4°C for 15 min.
8. Transfer 500 µl of the supernatant to a purification column. Do not vortex the lysate before collection. Seal each column with the collector vial cap.

Note: Do not pipet the resin pellet. If this occurs, wait 5 min for the resin to pellet again or centrifuge at 900 x g for 3 min.

9. Centrifuge at 6,000 x g at 20°C for 10 min.

Note: If clogging of the purification column occurs, increase the centrifugation time without increasing the centrifugation speed.

10. Add 125 µl of R2 solution in the purification column.
11. Centrifuge at 6,000 x g at 20°C for 5 min.
12. Add 100 µl of R2 solution in the purification column.
13. Throw away the collector vial and cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole unit upside down.
14. Centrifuge at 1,000 x g at 20°C for 3 min. Throw away the purification column.

Note: In this step, the cap cannot be closed.

15. Store the collector vial containing the 100 µl of purified DNA solution. Use 5 µl of the DNA solution for each real-time PCR reaction. The DNA solution can be stored for several months at –20°C. The calculation of the Z factor ($Z = 36$) is detailed in Section 7 Protocol, D. Data Analysis, Calculation of the Analyzed Fraction of Sample.

Aquadien DNA extraction and purification — treatment with Free DNA Removal Solution (FDRS)

1. Carefully fold the membrane in half three times to obtain a cone (see Appendix 1).
2. Using tweezers, place the membrane in a tube containing 460 µl of *Legionella* DNA Free Water and 40µl of activated FDRS. The point of the cone formed by the membrane should be positioned toward the top of the tube.
3. Invert the tube several times to homogenize. Do not vortex.
4. Incubate at 37°C for 30 min.
5. Add 500 µl R1 to inactivate FDRS for DNA extraction.
6. Vortex for 10 sec.
7. Incubate at 95°C for 15 min at 1,300 rpm in a thermoshaker.
8. Carefully take out the membrane by pressing it to the wall of the tube in order to recover all the lysate. Throw away the membrane.
9. Centrifuge at 900 x g for 3 min.
10. Transfer 500 µl of the supernatant to a purification column. Do not vortex the lysate before collection.
11. Centrifuge at 6,000 x g for 10 min.
12. Add 100 µl of R2 solution and throw away the collector vial.
13. Throw away the collector vial. Cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole unit upside down.
14. Centrifuge at 1,000 x g for 3 min. If the centrifuge temperature is programmable, set to 20°C. Throw away the purification column.

Note: In this step, the cap cannot be closed.

15. Store the collector vial containing the 100 µl of purified DNA solution. Use 5 µl of the DNA solution for each real-time PCR reaction. The DNA solution can be stored for several months at –20°C. The calculation of the Z factor ($Z = 36$) is detailed in Section 7 Protocol, D. Data Analysis, Calculation of the Analyzed Fraction of Sample.

C. Real-Time PCR

Instrument and Software Setup

For instrument and software setup, follow instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check Kits.

PCR Mix Preparation

1. Prepare PCR mix containing the amplification solution (reagent C) and the fluorescent probes (reagent B). Volume of PCR mix needed depends on the number of samples and controls to be analyzed. At least one positive and one negative control must be included in each PCR run. Use the pipetting table in the Appendix 2 to find the correct volumes to use for each reagent.

Note: For quantification, it is necessary to test each sample, control, and all quantification standards in duplicate. Do not mix quantification standards from different batches.

Note: When running both iQ-Check *Legionella* spp. and iQ-Check *L. pneumophila* on the same plate, because the amplification mixes are specific to each method, it is necessary to run two independent series of quantification standards. In addition, the results of each should be analyzed separately.

2. Use the PCR mix (reagents B + C) immediately after preparation. It is stable for 1 hr maximum at 2–8°C.
3. Pipet 45 µl of PCR mix into each well according to your plate setup.
4. Add 5 µl of DNA extract, reagent D (negative control), and reagent E (positive control) or quantification standards. Do not vortex the sample before pipetting. Hermetically seal the wells of the plate or strips. It is important to avoid bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. As an optional step to eliminate any bubbles, centrifuge the sealed PCR plate or the PCR strips (quick spin).
5. Place the plate or strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.

Run PCR

To start the PCR run, follow instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check Kits.

1. Define the plate setup in the CFX Manager Industrial Diagnostic Edition (IDE) Software.
2. For iQ-Check *Legionella* Screen Kits, samples and controls are tested singly.
3. For iQ-Check *Legionella* Quanti kits, samples, controls, and quantification standards are tested in duplicate. Indicate the quantity value for each standard and for the reference material. This value is found on the calibration card in each box of the iQ-Check *Legionella* Quantification Standards and on the certificate of analysis for each product batch.

Note: For quantification assays, the calibration curve generated by one batch can be saved and reused until the end of that batch. The option 'Use reduced set of QS if possible' needs to be activated before the PCR run. At the end of the run, select "Tools" then click on "Save Standard Curve" to save the curve. Subsequently, a single point of the calibration range needs to be run, in duplicate, at each analysis to verify conformity.

4. Select the appropriate thermal protocol, "Legio. spp." or "Legio. pneumo.," for qualitative (Screen) kits or quantitative (Quanti) kits and click Run.

D. Data Analysis

Data can be analyzed directly at the end of the PCR run or at a later time by opening the stored data file. Follow instructions in the corresponding CFX Manager IDE Software user manual for opening data files and setting the data analysis parameters.

Calculation of the Analyzed Fraction of Sample (Z Factor)

Any analysis method that includes an extraction step followed by a detection step must be accompanied by a calculation of the fraction of the processed sample that was actually analyzed during the final detection. This value is taken into account in the calculation of the detection limit and the quantification limit of the overall method and is used to give a final result in a quantitative test. To do this, calculate the remaining fraction with respect to the initial sample at each step in the protocol (concentration, elimination, etc.). The Z factor corresponds to the denominator of the fraction analyzed and is specific to each extraction protocol. Z represents the value F/V expressed in the result expression table in ISO/TS 12869 and AFNOR T90-471 standards.

The CFX Manager Software, IDE automatically calculates the Z factor (Z_2 and Z_3). The Z_1 needs to be modified by the user in the software if the filtered volume is different than 1 L.

1. When 1 L of water is sampled and 5 μ l of DNA is analyzed using PCR, the Z value of the Aquadien protocol and Aquadien short protocol is 32.

It is calculated as follows:

- Sample filtration step: 1,000 ml of water is filtered out of the 1,000 ml sampled. The filtered fraction is 1/1 so $Z_1 = 1$
- DNA extraction and purification step:
 - Aquadien protocol = 1 ml of R1 supernatant is processed through the column out of the 1.6 ml generated. The purified fraction is 1 from 1.6 so $Z_2 = 1.6$
 - Aquadien short protocol = 500 μ l of R1 supernatant is processed through the column out of the 800 μ l generated. The purified fraction is 500 μ l from 800 μ l so $Z_2 = 1.6$
- PCR analysis step: 5 μ l is analyzed by PCR out of 100 μ l extracted DNA. The analyzed fraction is 5/100 = 1/20 so $Z_3 = 20$

The overall Z factor for the Aquadien protocol is $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1.6 \times 20 = 32$.

The raw PCR result should be multiplied by 32 to obtain the final quantity of bacteria contained in the initial water sample, expressed in genomic units (GU) per liter of water sample. If the filtered water volume is different than 1 L, it must be captured in these calculations.

2. When 1 L of water is sampled and 5 μ l of DNA is analyzed using PCR, the Z value of the Aquadien protocol for dirty/clogging samples and Aquadien short protocol for dirty/clogging samples is 36.

It is calculated as follows:

- Sample filtration step: 1,000 ml of the water is filtered out of the 1,000 ml sampled. The filtered fraction is 1/1 so $Z_1 = 1$

- DNA extraction and purification step:
 - Aquadien protocol = 1 ml of R1 supernatant is processed through the column out of the 1.8 ml generated (1.6 ml of R1 + 0.2 ml of W2). The purified fraction is 1 from 1.8 so $Z_2 = 1.8$
 - Aquadien short protocol = 500 μ l of R1 supernatant is processed through the column out of the 900 μ l generated (800 μ l of R1 + 100 μ l of W2). The purified fraction is 500 μ l from 900 μ l so $Z_2 = 1.8$
- PCR analysis step: 5 μ l is analyzed by PCR out of 100 μ l extracted DNA. The analyzed fraction is $5/100 = 1/20$ so $Z_3 = 20$.

The overall Z factor from the Aquadien protocol for dirty/clogging samples is:

$$Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1.8 \times 20 = 36.$$

The raw PCR result should be multiplied by 36 to obtain the final quantity of bacteria contained in the initial water sample, expressed in GU per liter of water sample. If the filtered water volume is different than 1 L, it must be captured in these calculations.

3. When 1 L of water is sampled and 5 μ l of DNA is analyzed using PCR, the Z value of the Aquadien FDRS protocol is 36.

It is calculated as follows:

- Sample filtration step: 1,000 ml of the water is filtered out of the 1,000 ml sampled. The filtered fraction is 1/1 so $Z_1 = 1$
- DNA extraction and purification step: 500 μ l supernatant is processed through the column out of the 900 μ l generated (460 μ l of water and 40 μ l activated FDRS with 400 μ l of R1). The purified fraction is 900/500 so $Z_2 = 1.8$.
- PCR analysis step: 5 μ l is analyzed by PCR out of 100 μ l extracted DNA. The analyzed fraction is $5/100 = 1/20$ so $Z_3 = 20$.

The overall Z factor from the Aquadien FDRS protocol is:

$$Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1.8 \times 20 = 36.$$

The raw PCR result should be multiplied by 36 to obtain the final quantity of bacteria contained in the initial water sample, expressed in GU per liter of water sample. If the filtered water volume is different than 1 L, it must be captured in these calculations.

Interpreting Results – iQ-Check Screen *Legionella*

Once the data analysis parameters have been set, results are interpreted by analyzing the Cq values of each sample (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold).

CFX Manager IDE Software allows complete automated analysis for Bio-Rad real-time PCR detection systems.

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

For the experiment to be valid, the controls must have the following results, as summarized in the table below. Otherwise, the PCR reaction must be repeated.

	<i>Legionella</i> Detection (FAM Channel)	Internal Control Detection (HEX Channel)
Negative control	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positive control	$30 \leq Cq \leq 40$	N/A

* The software indicates a Cq value (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold) of N/A (not applicable) when the fluorescence of a sample does not rise significantly above the background noise and hence does not cross the threshold.

If results of negative and positive controls differ from those in the table above (invalid control), repeat the run and analysis starting from Section 7 Protocol, C. Real-Time PCR, Instrument and Software Setup.

Samples

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

<i>Legionella</i> Detection (FAM Channel)	Internal Control Detection (HEX Channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	N/A	Positive
Cq > Intercept value ¹	$28 \leq Cq \leq 40$	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition ²
Cq = N/A	Cq > 40	Inhibition
Cq = N/A	Cq < 28	Analytical issue ³

¹ The intercept value to be considered in the context of a qualitative analysis is Cq = 43 (this value is used to give an indication of the intercept value chosen during the validation). An intercept value can be determined by the user by averaging intercept values obtained and adding two standard deviations.

² When both sample and internal control detection give a Cq value = N/A, the sample must be diluted 1:10 in DNA extraction elution buffer and tested again.

³ Verify that the threshold was correctly placed, or that the curve as raw data is a regular amplification curve. If the curve does not have a characteristic shape, repeat the PCR test.

An invalid interpretation can be given when validation criteria are not met. Check the raw data and proceed as if the sample was inhibited.

Detection limit

The detection limit of the PCR step (Ld PCR) for a *Legionella* PCR detection and quantification method is defined as the lowest number of GU generating a positive result at a 90% confidence limit (NF T90-471). The detection limit of the PCR step (Ld PCR) is 5 GU per 5 µl of extracted DNA. To calculate the theoretical detection limit of the total method (Ld) for a 1 L sample, take into consideration the Z factor. The theoretical Ld for the total method takes into consideration a filtration and extraction yield of 100%.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Z = Fraction of the sample deposited in each PCR well

D = Dilution factor if the DNA has been diluted before the PCR run

Interpreting Results — iQ-Check Quanti *Legionella*

Verify that the raw data curve has typical amplification (flat base line followed by an exponential increase of fluorescence and then a flattening out). Check the validity of the quantification standards series and of the controls prior to reading the mean quantity of GU calculated for each sample.

Controls and standards

Verify the controls and standards before interpreting sample results.

For the experiment to be valid, the controls and standards must have the following results, as summarized in the table below. Otherwise, the PCR reaction must be repeated.

	<i>Legionella</i> Detection (FAM Channel)	Internal Control Detection (HEX Channel)
Negative control	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
PCR efficiency	75% ≤ PCR efficiency ≤ 125%	N/A
Correlation coefficient (r ²)	≥ 0.99	N/A
Qs1–Qs4	20 ≤ Cq ≤ 40	28 ≤ Cq ≤ 40

* The software indicates a Cq value (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold) of N/A (not applicable) when the fluorescence of a sample does not rise significantly above the background noise and hence does not cross the threshold.

If one of the quantification standards is significantly outside of the standard curve, it can be eliminated to optimize the results and reach the above parameters. Only one standard replicate can be eliminated. The reference material must follow NF T90-471 and ISO/TS 12869 standards requirements. If the results of the negative controls and standards differ from those given above, repeat the PCR test.

Samples

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

<i>Legionella</i> Detection (FAM Channel)	Internal Control Detection (HEX Channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	N/A	Positive
Cq ≥ 10	Cq ≤ Mean Cq Qs + 3σ ¹	Positive
Cq ≥ 10	Cq > Mean Cq Qs + 3σ	Inhibition ²
Cq = N/A	Mean Cq Qs – 3σ ≤ Cq ≤ Mean Cq Qs + 3σ	Negative
Cq = N/A	N/A	Inhibition
Cq = N/A	Cq > Mean Cq Qs + 3σ	Inhibition
Cq = N/A	Cq < Mean Cq Qs – 3σ	Analytical issue ³

¹Mean Cq Qs is the average of the HEX Cq values for all Qs; σ represents standard deviation.

² When both sample and internal control detection give a Cq value = N/A, the sample must be diluted 1:10 in DNA extraction elution buffer and tested again.

³ Verify that the threshold was correctly placed, or that the curve as raw data is a regular amplification curve. If the curve does not have a characteristic shape, repeat the PCR test.

If a sample has a very high concentration of *Legionella* (Cq_{FAM} < Cq_{FAM} Qs4), the Cq_{HEX} might be higher than the Cq_{HEX} of Qs4. This sample is outside the dynamic range of quantification. If precise quantification is required, dilute the sample and repeat PCR.

A well with a Cq value > b intercept value and with no inhibition is not considered positive.

If one positive and one negative PCR result is obtained for a sample, the sample is considered positive.

Calculation of *Legionella* concentration

The values given for each sample in the report correspond to the initial quantity of *Legionella* GU present in 5 µl of DNA extract. To obtain the concentration of *Legionella* in GU/1 L of water sample, take into account the quantification mean value (“mean GU/well”) calculated by the software for each sample.

$$X = \frac{[\text{Mean quantity in 5 } \mu\text{l}] \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

X = *Legionella* GU contained in 1 L of water sample

Z = Fraction of the sample deposited in each PCR well

D = Dilution factor if the DNA has been diluted before the PCR run

Detection limit

The detection limit of the PCR step (Ld PCR) for a *Legionella* PCR detection and quantification method is defined as the lowest number of GU generating a positive result at a 90% confidence limit (NF T90-471). The detection limit of the PCR step (Ld PCR) is 5 GU per 5 µl of extracted DNA. To calculate the theoretical detection limit of the total method (Ld) for a 1 L sample, take into consideration the Z factor divided by 2, since samples are tested in duplicate. The theoretical Ld for the total method takes into consideration a filtration and extraction yield of 100%.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)} \times 2}$$

Z = Fraction of the sample deposited in each PCR well
D = Dilution factor if the DNA has been diluted before the PCR run

Quantification limit

The quantification limit of the PCR step (Lq PCR) of a *Legionella* PCR quantification method is defined as the lowest number of copies allowing quantification repeatability and accuracy as described in the NF T90-471 standard. Qs1, the first point on the quantification standard, corresponds to the quantification limit for each batch of iQ-Check Quanti *Legionella*. The exact value of Qs1 for each batch of quantification standards is indicated on the calibration card and on the certificate of analysis.

$$Lq = Qs1 \times Z$$

If a volume of water different from 1 L is filtered or if the DNA extract has to be diluted, the Lq for the method changes.

$$Lq = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Upper quantification limit

The upper quantification limit (UQL) of the method corresponds to the value (for 1 L) given by the highest point of the quantification standards, the Qs4 standard. The exact Qs4 value for each batch of quantification standards is indicated on the calibration card and the certificate of analysis. To obtain the UQL of the method, the Qs4 value must be multiplied by the fraction of analyzed sample Z and by the dilution factor D.

$$UQL = \frac{Qs4 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Expressing Results

The final result is expressed in GU/L with 2 significant figures (for example, 1,300 GU/L for a calculated concentration of 1,256 GU/L).

Genomic Units/PCR Well	Interpretation	Conclusion
<5	<Ld	Target not detected at the detection limit
[5, Qs1]	<Lq	Target present but not quantifiable
[Qs1–Qs4]	X	Target present and quantifiable
> Qs4	UQL	High amount of target*

* Outside the dynamic range of quantification. If precise quantification is required, dilute the sample and repeat PCR.

Section 8 Confirmation of Positive Results

Refer to local regulations.

Section 9 Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

iQ-Check *Legionella* kits may also be used for confirming single isolated *Legionella* colonies on GVPC or BCYE agar plates.

1. Pick an isolated colony with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 200 µl *Legionella* DNA Free Water in a microcentrifuge tube. Vortex for 20 sec.
3. Divide the suspension into two 100 µl aliquots (tube 1 and tube 2).
4. Incubate tube 1 at 95°C for 10 min. Use 5 µl of the suspension with 45 µl of PCR mix (see Section 7 Protocol, C. Real-Time PCR) to run PCR.
5. If Cq > intercept value, the result is negative and the colony cannot be confirmed or identified.
6. If Cq < 30, the result is positive and the colony is confirmed and identified. In this case, tube 1 with extracted DNA should be stored at –20°C for up to 3 months, if PCR must be repeated. In addition, tube 2 must be stored at 4°C for possible culturing.
7. If PCR is inhibited, dilute the tube 1 DNA extract in sterile *Legionella* DNA Free Water (1:100) and repeat PCR.

8. If $30 < C_q < \text{intercept value}$, confirm the positive result with another method or repeat the protocol with another isolated colony.

Section 10

Test Performance and Validations



BRD 07/15 – 12/07
BRD 07/16 – 12/07

METHOD FOR WATER
ANALYSIS

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

Aquadien DNA Extraction and Purification Kit is used in the scope of the iQ-Check *Legionella* spp. and *L. pneumophila* methods certified NF Validation according to the validation protocol based on the NF T90-471 Standard (June 2015) for the detection and quantification of *Legionella* spp. or *L. pneumophila* with iQ-Check Real-Time PCR Kits. The validation scope has been extended to the ISO/TS 12869 (April 2019): Water quality – Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *L. pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Certificate number: iQ-Check *Legionella* spp. BRD 07/15 – 12/07 and iQ-Check *L. pneumophila* BRD 07/16 – 12/07. Valid until: Refer to the certificate available on the AFNOR Certification website.

Section 11

References

AFNOR NF T90-471. Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification.

Engleberg NC et al. (1989). DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 57,1263–1270.

ISO 11731. Water quality — Enumeration of *Legionella*.

ISO/TS 12869. Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

MacDonell MT and Colwell RR. (1987). The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res* 15, 1335.

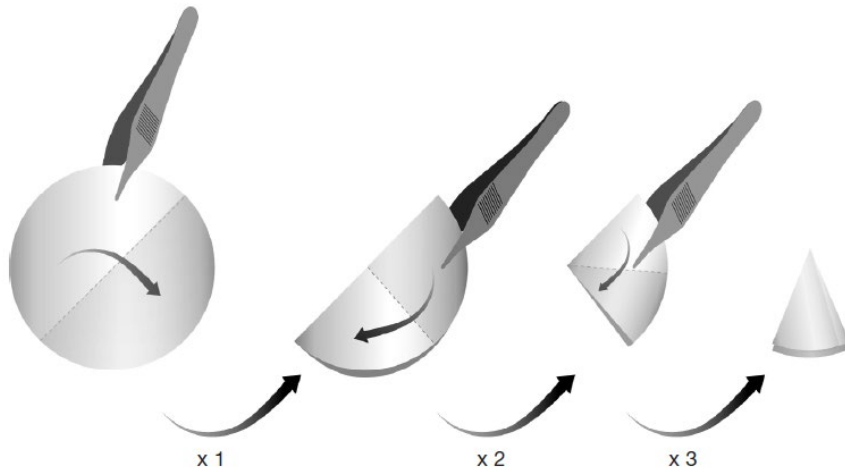
NF T 90-431. Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* — Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration or centrifugation.

Specht T et al. (1986). Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res* 18 Suppl, 2215–2230.

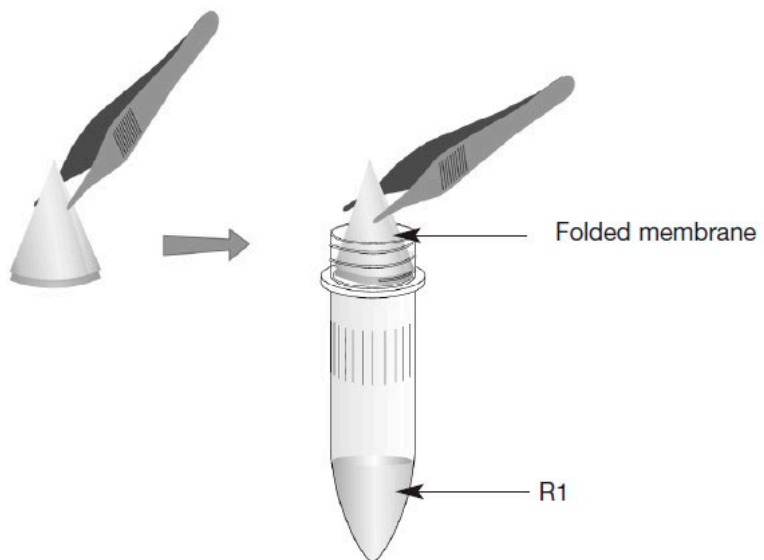
Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
October 2020	10000134675 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- New document design and update of references and content- Document number change (previous versions were 881116 and 881117)
June 2023	10000134675 Ver B	<ul style="list-style-type: none">- Renewal and extension of NF Validation:<ul style="list-style-type: none">- CFX Opus 96 Real-Time PCR System- Calibration curve generated by one batch can be saved and reused until the end of that batch- Update of references and content

Appendix 1 — Membrane Folding Guide



Carefully fold the membrane in half three times to obtain a cone.



Using tweezers, place the membrane in a tube containing 1 ml of R1. The point of the cone formed by the membrane should be positioned toward the top of the tube.

Appendix 2 — PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes to use when preparing the PCR mix, add the total number of samples and controls to be analyzed and find the corresponding volumes of reagent B and reagent C in the table.

Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l
1	5	40	33	178	1,400	65	351	2,800
2	11	86	34	184	1,500	66	356	2,900
3	16	130	35	189	1,500	67	362	2,900
4	22	173	36	194	1,600	68	367	2,900
5	27	216	37	200	1,600	69	373	3,000
6	32	259	38	205	1,600	70	378	3,000
7	38	302	39	211	1,700	71	383	3,100
8	43	346	40	216	1,700	72	389	3,100
9	49	389	41	221	1,800	73	394	3,200
10	54	432	42	227	1,800	74	400	3,200
11	59	475	43	232	1,900	75	405	3,200
12	65	518	44	238	1,900	76	410	3,300
13	70	562	45	243	1,900	77	416	3,300
14	76	605	46	248	2,000	78	421	3,400
15	81	648	47	254	2,000	79	427	3,400
16	86	691	48	259	2,100	80	432	3,500
17	92	734	49	265	2,100	81	437	3,500
18	97	778	50	270	2,200	82	443	3,500
19	103	821	51	275	2,200	83	448	3,600
20	108	864	52	281	2,200	84	454	3,600
21	113	907	53	286	2,300	85	459	3,700
22	119	950	54	292	2,300	86	464	3,700
23	124	994	55	297	2,400	87	470	3,800
24	130	1,000	56	302	2,400	88	475	3,800
25	135	1,100	57	308	2,500	89	481	3,800
26	140	1,100	58	313	2,500	90	486	3,900
27	146	1,200	59	319	2,500	91	491	3,900
28	151	1,200	60	324	2,600	92	497	4,000
29	157	1,300	61	329	2,600	93	502	4,000
30	162	1,300	62	335	2,700	94	508	4,100
31	167	1,300	63	340	2,700	95	513	4,100
32	173	1,400	64	346	2,800	96	518	4,100

Visit [bio-rad.com/legionella](https://www.bio-rad.com/legionella) for more information.

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc.

AQUADIEN and IQ-CHECK are trademarks of Bio-Rad Europe GMBH in certain jurisdictions.

All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website [bio-rad.com](https://www.bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Aquadien DNA Extraction and Purification Kit
iQ-Check™ Screen *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

Guide d'utilisation

Tests pour l'extraction et la purification de l'ADN, la détection par PCR en temps réel et la quantification de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* dans les échantillons d'eau

N° de référence 3578121, Aquadien DNA Extraction and Purification Kit

N° de référence 3578104, iQ-Check Screen *Legionella* spp. Kit

N° de référence 3578102, iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit

N° de référence 3578105, iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit

N° de référence 3578103, iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

BIO-RAD

Sommaire

Section 1.	Introduction	1
Section 2.	Technologie iQ-Check <i>Legionella</i>	1
Section 3.	Composants du kit	2
Section 4.	Durée de conservation et stockage	3
Section 5.	Matériel requis non fourni	3
	Matériel	3
	Produits.....	4
Section 6.	Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux	4
Section 7.	Protocole	5
	A. Échantillonnage et transport.....	5
	B. Filtration de l'eau et extraction de l'ADN	6
	C. PCR en temps réel	11
	D. Analyse des données	12
Section 8.	Confirmation des résultats positifs.....	19
Section 9.	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check.....	19
Section 10.	Performance du test et validations	20
Section 11.	Références	20
Section 12.	Historique des révisions	21
	Annexe 1 — Guide de pliage de la membrane	22
	Annexe 2 — Guide de calcul du mélange de PCR.....	23

Section 1

Introduction

Les *Legionella* sont des bacilles à Gram négatif présentes dans tous les environnements aquatiques. Une infection peut entraîner une pneumonie aiguë et une légionellose (maladie des légionnaires) ; la fièvre de Pontiac constitue une forme plus modérée d'infection pulmonaire. En Europe, le nombre de cas déclarés de légionellose augmente de 25 % par an. Aux États-Unis, l'agence CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Centres pour le contrôle et la prévention des maladies) estime le nombre de cas de légionellose entre 10 000 et 20 000 par an. L'espèce *Legionella pneumophila* est responsable d'environ 90 % de l'ensemble des cas cliniques.

La surveillance régulière de la présence de *Legionella* dans les systèmes d'alimentation en eau, tels que les tours de refroidissement des systèmes de climatisation, les piscines thermales, les fontaines réfrigérées et les dispositifs d'eau chaude et froide, constitue le seul moyen de prévenir la maladie. La détection de *Legionella* est obligatoire ou fortement recommandée dans la plupart des pays développés. Les méthodes de culture classiques dédiées à la détection de *Legionella* spp. et *L. pneumophila* dans les échantillons d'eau présentent plusieurs inconvénients, notamment une faible sensibilité et de longues périodes d'incubation (10–13 jours pour les échantillons positifs).

Le kit Aquadien permet l'extraction et la purification optimales de l'ADN des bactéries présentes dans les échantillons d'eau, en vue d'une détection par PCR (amplification en chaîne par polymérase) en temps réel. Le principe de l'extraction se fonde sur une lyse alcaline des bactéries par choc thermique, suivie d'une purification de l'ADN à l'aide d'une ultrafiltration.

Les kits iQ-Check *Legionella* spp. et iQ-Check *L. pneumophila* sont formulés de façon à détecter ou quantifier rapidement les *Legionella* (spp. ou *pneumophila*) dans les échantillons d'eau. La quantification est possible grâce à l'utilisation des standards de quantification d'ADN iQ-Check *Legionella* étalonnés, au cours de l'étape d'amplification. Les résultats sont obtenus en moins de 3 hr, à la suite de l'étape de filtration et d'extraction d'ADN.

Section 2

Technologie iQ-Check *Legionella*

Les kits iQ-Check *Legionella* sont des tests qui reposent sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs de PCR prêts à l'emploi contiennent des amorces d'ADN et une sonde d'ADN spécifique de *Legionella* spp. ou *L. pneumophila*, ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour l'utilisation avec un instrument de PCR en temps réel Bio-Rad, comme les systèmes CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System et CFX Opus 96 Real-Time PCR System.

La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. Durant la PCR, la succession de cycles de chauffage et de refroidissement permet une dénaturation de l'ADN, suivie par une hybridation des amorces à la région cible puis, un allongement de l'ADN par action de l'ADN polymérase à partir de ces amorces et des désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), créant ainsi des copies de l'ADN cible. Ces copies sont appelées amplicons.

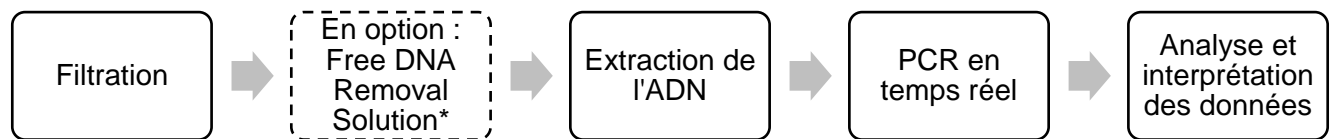
Au cours de la PCR en temps réel, des sondes spécifiques détectent l'ADN en s'hybridant avec les amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui produit une fluorescence uniquement lors d'une hybridation avec la séquence cible. Dans ce kit, FAM est le fluorophore lié à la sonde qui s'hybride à la séquence d'ADN spécifique de *Legionella* spp.– ou *L. pneumophila*. En l'absence d'ADN cible,

Section 3 Composants du kit

aucune fluorescence ne sera détectée. Étant donné que le nombre d'amplicons augmente avec chaque cycle d'amplification, l'intensité de la fluorescence augmente également. Le module optique ou détecteur mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR. Le logiciel associé à l'appareil définit la relation entre l'intensité de la fluorescence et le nombre de cycles. Cette méthode permet une détermination aisée de la présence ou de l'absence de *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* dans un échantillon.

Le mélange réactif du kit comprend un contrôle interne d'ADN synthétique. Ce contrôle est amplifié avec une sonde spécifique en même temps que la séquence d'ADN cible de *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* et est détecté par un second fluorophore (HEX). Ce processus permet de valider tout résultat négatif éventuel.

Les kits iQ-Check peuvent détecter ou quantifier *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* dans les échantillons d'eau en quatre étapes principales :



* Se référer au guide d'utilisation de la solution iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 1000058391) pour les conditions d'utilisation.

Section 3 Composants du kit

Le kit Aquadien DNA Extraction and Purification contient suffisamment de réactifs pour 96 tests (94 échantillons).

ID réactif	Réactif	Quantité fournie, ml
R1	Solution de lyse	2 flacons, 100
R2	Tampon d'élution	1 tube, 25
	Cryotube (4,5 ml)	100 tubes
	Colonne de purification	96 colonnes
	Flacons collecteurs	192 flacons

Les kits iQ-Check Screen *Legionella* spp. et *L. pneumophila* contiennent suffisamment de réactifs pour 96 tests (94 échantillons). Les kits Quanti *Legionella* spp. et *L. pneumophila* contiennent en outre suffisamment de standards de quantification pour quantifier jusqu'à 43 échantillons.

ID réactif	Réactif	Quantité fournie, ml
B	Sondes fluorescentes	1 tube, 0,55
C	Mélange d'amplification	1 tube, 4,4
D	Contrôle négatif PCR	1 tube, 0,5
E	Contrôle positif PCR	1 tube, 0,25

Qs1	Standard PCR 1	1 tube, 0,08 (bouchon blanc)
Qs2	Standard PCR 2	1 tube, 0,08 (bouchon jaune)
Qs3	Standard PCR 3	1 tube, 0,08 (bouchon orange)
Qs4	Standard PCR 4	1 tube, 0,08 (bouchon rouge)
	Matériau de référence ¹	1 tube, 0,08 (bouchon bleu)
	Carte d'étalonnage	1 carte

¹ Le matériau de référence contient un ADN étalon raccordé au matériau de référence certifié, indépendant des standards de quantification.

Section 4

Durée de conservation et stockage

Après réception, le kit doit être stocké à 2–8 °C. Les réactifs stockés à cette température peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur les tubes. Ne pas congeler les réactifs.

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Bec Bunsen
- Appareil de filtration, monté soit sur pompe à air soit sur fiole à vide
- Enceinte de sécurité biologique — Catégorie II
- Bain-marie, de préférence avec un couvercle, capable de maintenir 95 ± 5 °C
- Agitateur-mélangeur vortex
- Plaque d'agitation magnétique
- Agitateur-incubateur* capable de maintenir une température de 95 °C, avec une vitesse de mélange de 1 300 rpm
- Centrifugeuse à rotor à angles fixes, de préférence réfrigérée
 - Pour tubes de 1,5–2,0 ml, avec une capacité de rotation de 6 000 x g
 - Pour tubes de 1,5–2,0 ml, avec une capacité de rotation de 12 000 x g pour les échantillons d'eau souillée/chargée

Section 6 Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad*, par exemple CFX96 Touch Deep Well System (n° de référence 3600037) ou CFX Opus 96 Real-Time PCR System (n° de référence 17007992)

Remarque : Nous recommandons d'utiliser une alimentation sans interruption (ASI) avec le thermocycleur.

* Contacter l'assistance technique de Bio-Rad pour de plus amples informations sur les instruments recommandés.

Produits

- Aquadien Reagent W2, 5 ml, pour les échantillons d'eau souillée/chargée (n° de référence 3578119)
- Aquadien Lysis Solution R1, 100 ml (n° de référence 3578125)
- *Legionella* DNA Free Water, 1 L (n° de référence 12006823)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- Membrane filtrante en polycarbonate, porosité 0,45 µm
- Entonnoir stérile jetable, 250 ml
- Pinces métalliques en inox à bouts ronds, stériles
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Tubes stériles, 2 ml
- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Gants non poudrés
- Masque respiratoire à usage unique
- Eau de Javel, 5 %
- Alcool, 70 % Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les échantillons d'eau doivent être manipulés en tant que substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.

- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.
- La qualité des résultats dépend du respect strict des bonnes pratiques de laboratoire (par exemple, les normes ISO 8199 et ISO/TS 12869), particulièrement en ce qui concerne la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre.
 - Décontaminer le petit matériel de laboratoire utilisé pour la filtration (par exemple, pinces métalliques) avec de l'alcool après chaque extraction puis le stériliser au brûleur Bunsen.
 - Vérifier que les pinces sont bien refroidies avant utilisation.
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Il convient d'utiliser un contrôle négatif durant l'extraction d'ADN.
 - Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
 - Vortexer les réactifs du kit avant de les utiliser afin d'assurer leur homogénéité.
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments.
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée.
 - Nettoyer les surfaces de travail régulièrement avec de l'eau de Javel 5 %, puis rincer avec *Legionella* DNA Free Water et de l'alcool 70 %, ou avec d'autres agents de décontamination, tels que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.
 - Pour la quantification, il est nécessaire de tester chaque échantillon, chaque contrôle et tous les standards de quantification en double. Il convient de tester le matériau de référence conformément aux normes NF T90-471 et ISO/TS 12869. Ne pas mélanger les standards de quantification issus de différents lots.

Section 7

Protocole

Il est fortement recommandé de lire le protocole dans son intégralité avant de commencer le test.

A. Échantillonnage et transport

Il convient de prélever les échantillons d'eau conformément aux normes générales relatives à la recherche et au dénombrement des bactéries (NF T90-471 et ISO/TS 12869). La qualité des résultats dépend du respect strict des bonnes pratiques en matière d'échantillonnage de l'eau pour analyse microbiologique (par exemple, la norme ISO 19458), particulièrement en ce qui concerne la PCR.

B. Filtration de l'eau et extraction de l'ADN

Recommandations générales

- Allumer le bain-marie et/ou l'agitateur-incubateur et le régler à $95\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$. Vérifier la hauteur du niveau d'eau dans le bain-marie pour que les cryotubes 4,5 ml soient bien immergés.
- Préparer le nombre de tubes correspondant au nombre d'échantillons soumis à l'extraction d'ADN. Pipetter x ml de R1 dans chaque tube, selon le protocole choisi.

Remarque : Pipetter le R1 en mélangeant à vitesse moyenne sur une plaque d'agitation, de façon à maintenir la résine en suspension. Utiliser un embout de pipette à large ouverture (par exemple, utiliser une pipette de 1 000 µl avec l'embout correspondant).

- Préparer le nombre de colonnes de purification nécessaires en plaçant une colonne dans chaque flacon collecteur.

Filtration de l'eau

1. Rincer la rampe de filtration avec 100 ml de *Legionella* DNA Free Water puis la décontaminer par le couple flamme/alcool. S'assurer que la rampe est sèche et refroidie avant de positionner la membrane filtrante. Répéter cette opération après chaque filtration d'échantillon afin d'éviter toute contamination bactérienne ou par de l'ADN entre les filtrations.
2. Placer la membrane filtrante sur l'appareil de filtration. Placer les entonnoirs stériles.
3. Filtrer 100 ml – 1 L d'échantillon d'eau sur la membrane filtrante.

Aquadien - Extraction et purification d'ADN

1. Plier délicatement la membrane en deux, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. Annexe 1).
2. Avec les pinces, introduire la membrane dans un cryotube contenant 2 ml de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du cryotube.
3. Vortexer pendant 20 sec.

Remarque : Vérifier que la membrane reste bien totalement immergée dans la solution R1.

4. Incuber dans un bain-marie à couvercle à $95 \pm 5\text{ °C}$ pendant 15 min.
5. Vortexer pendant 20 sec.
6. À l'aide d'un embout de pipette stérile de 1 ml, retirer délicatement la membrane et l'essorer le long de la paroi du cryotube afin de récupérer la totalité du lysat. Jeter la membrane.
7. Laisser les cryotubes à température ambiante pendant 20 min. La résine de la solution R1 se déposera au fond du cryotube. Le surnageant contient 1,6 ml d'ADN extrait. Il est également possible de centrifuger les cryotubes à $900 \times g$ pendant 3 min dans une centrifugeuse adaptée aux tubes de 4,5 ml. Vérifier que les tubes sont à température ambiante avant d'entamer l'étape de purification.
8. Transférer 500 µl du surnageant vers une colonne de purification. Ne pas vortexer le lysat avant le prélèvement.

9. Sceller chaque colonne avec le bouchon du flacon collecteur.

Remarque : Ne pas pipetter la résine déposée. Si de la résine est prélevée, laisser sédimenter de nouveau la résine durant 5 min ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.

10. Centrifuger à 6 000 x g pendant 10 min. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler sur 20 °C.

Remarque : En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation sans en augmenter la vitesse.

11. Jeter le contenu du flacon collecteur.

12. Répéter l'étape 8 en pipettant de nouveau 500 µl de surnageant sur la même colonne de purification et sceller avec le bouchon.

13. Centrifuger à 6 000 x g pendant 10 min. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler sur 20 °C.

Remarque : En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation sans en augmenter la vitesse. Vérifier que la totalité du surnageant est filtrée au travers de la colonne. Si ce n'est pas le cas, centrifuger de nouveau. Si après une seconde centrifugation, la colonne reste colmatée, suivre le protocole relatif aux échantillons d'eau souillée/chargée ci-dessous.

14. Ajouter 100 µl de solution R2 dans la colonne de purification.

15. Jeter le flacon collecteur. Couvrir la colonne de purification avec un flacon collecteur propre et retourner l'ensemble.

16. Centrifuger à 1 000 x g pendant 3 min. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler sur 20 °C. Jeter la colonne de purification.

Remarque : Au cours de cette étape, le bouchon ne peut être fermé.

17. Conserver le flacon collecteur contenant les 100 µl de solution d'ADN purifié. Utiliser 5 µl de cette solution pour chaque réaction de PCR en temps réel. La solution d'ADN peut être conservée plusieurs mois à -20 °C. Le calcul du facteur Z (Z = 32) est détaillé dans la Section 7 Protocole, D. Analyse des données, Calcul de la fraction d'échantillon analysée.

Aquadien - Extraction et purification d'ADN - Protocole court

1. Plier délicatement la membrane en deux, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. Annexe 1).

2. Avec les pinces, introduire la membrane dans un tube contenant 1 ml de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du tube.

3. Incuber à 95 °C pendant 15 min à 1 300 rpm dans un agitateur-incubateur.

4. Retirer délicatement la membrane et l'essorer le long de la paroi du tube afin de récupérer tout le lysat. Jeter la membrane.

5. Centrifuger à 900 x g pendant 3 min.

6. Transférer 500 µl du surnageant vers une colonne de purification. Ne pas vortexer le lysat avant le prélèvement.

Section 7 Protocole

7. Sceller chaque colonne avec le bouchon du flacon collecteur.

Remarque : Ne pas pipetter la résine déposée. Si de la résine est prélevée, laisser sédimenter de nouveau la résine durant 5 min ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.

8. Centrifuger à 6 000 x g pendant 10 min. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler sur 20 °C.

Remarque : En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation sans en augmenter la vitesse.

9. Ajouter 100 µl de solution R2 dans la colonne de purification.

10. Jeter le flacon collecteur. Couvrir la colonne de purification avec un flacon collecteur propre et retourner l'ensemble.

11. Centrifuger à 1 000 x g pendant 3 min. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler sur 20 °C. Jeter la colonne de purification.

Remarque : Au cours de cette étape, le bouchon ne peut être fermé.

12. Conserver le flacon collecteur contenant les 100 µl de solution d'ADN purifié. Utiliser 5 µl de cette solution pour chaque réaction de PCR en temps réel. La solution d'ADN peut être conservée plusieurs mois à -20 °C. Le calcul du facteur Z (Z = 32) est détaillé dans la Section 7 Protocole, D. Analyse des données, Calcul de la fraction d'échantillon analysée.

Aquadien - Extraction et purification d'ADN - Échantillons d'eau souillée/chargée

1. Plier délicatement la membrane en deux, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. Annexe 1).

2. Avec les pinces, introduire la membrane dans le cryotube contenant 2 ml de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du cryotube.

3. Vortexer pendant 20 sec.

Remarque : Vérifier que la membrane reste bien totalement immergée dans la solution R1.

4. Incuber dans un bain-marie à couvercle à 95 ± 5 °C pendant 15 min.

5. Vortexer pendant 20 sec.

6. À l'aide d'un embout de pipette stérile de 1 ml, retirer délicatement la membrane et l'essorer le long de la paroi du cryotube afin de récupérer la totalité du lysat. Jeter la membrane.

7. Transférer l'échantillon, y compris la résine, dans un nouveau tube de 2 ml. Jeter le cryotube. Le lysat peut être stocké à 2–8 °C pendant 24–72 hr.

8. Ajouter 200 µl du tampon W2 froid (4 °C). Vortexer pendant 5 sec.

9. Laisser reposer le tube au réfrigérateur à 4 ± 2 °C pendant 15 min.

10. Centrifuger à 12 000 x g à 4 °C pendant 15 min.

11. Transférer 500 µl du surnageant vers une colonne de purification. Ne pas vortexer le lysat avant le prélèvement. Sceller chaque colonne avec le bouchon du flacon collecteur.

Remarque : Ne pas pipetter la résine déposée. Si de la résine est prélevée, laisser sédimenter de nouveau la résine durant 5 min ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.

12. Centrifuger à 6 000 x g à 20 °C pendant 10 min.

Remarque : En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation sans en augmenter la vitesse.

13. Jeter le contenu du flacon collecteur.

14. Répéter l'étape 11 en pipettant de nouveau 500 µl de surnageant sur la même colonne de purification et sceller avec le bouchon.

15. Centrifuger à 6 000 x g à 20 °C pendant 10 min.

Remarque : En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation sans en augmenter la vitesse. Vérifier que la totalité du surnageant est filtrée au travers de la colonne. Si ce n'est pas le cas, centrifuger de nouveau.

16. Jeter le contenu du flacon collecteur.

17. Ajouter 250 µl de solution R2 dans la colonne de purification.

18. Centrifuger à 6 000 x g à 20 °C pendant 5 min.

19. Ajouter 100 µl de solution R2 dans la colonne de purification.

20. Jeter le flacon collecteur. Couvrir la colonne de purification avec un flacon collecteur propre et retourner l'ensemble.

21. Centrifuger pendant 3 min à 1 000 x g à 20 °C. Jeter la colonne de purification.

Remarque : Au cours de cette étape, le bouchon ne peut être fermé.

22. Conserver le flacon collecteur contenant les 100 µl de solution d'ADN purifié. Utiliser 5 µl de cette solution pour chaque réaction de PCR en temps réel. La solution d'ADN peut être conservée plusieurs mois à -20 °C. Le calcul du facteur Z (Z = 36) est détaillé dans la Section 7 Protocole, D. Analyse des données, Calcul de la fraction d'échantillon analysée.

Aquadien - Extraction et purification d'ADN - Échantillons d'eau souillée/chargée - Protocole court

1. Plier délicatement la membrane en deux, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. Annexe 1).

2. Avec les pinces, introduire la membrane dans un tube contenant 1 ml de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du tube.

3. Incuber à 95 °C pendant 15 min et 1 300 rpm dans un agitateur-incubateur.

4. Retirer délicatement la membrane et l'essorer le long de la paroi du tube afin de récupérer la totalité du lysat. Jeter la membrane.

5. Ajouter 100 µl du tampon W2 froid (4 °C). Vortexer pendant 5 sec.

Section 7 Protocole

6. Laisser reposer le tube au réfrigérateur à 4 ± 2 °C pendant 15 min.
7. Centrifuger à 12 000 x g à 4 °C pendant 15 min.
8. Transférer 500 µl du surnageant vers une colonne de purification. Ne pas vortexer le lysat avant le prélèvement. Sceller chaque colonne avec le bouchon du flacon collecteur.

Remarque : Ne pas pipetter la résine déposée. Si de la résine est prélevée, laisser sédimenter de nouveau la résine durant 5 min ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.

9. Centrifuger à 6 000 x g à 20 °C pendant 10 min.

Remarque : En cas de colmatage de la colonne de purification, augmenter le temps de centrifugation sans en augmenter la vitesse.

10. Ajouter 125 µl de solution R2 dans la colonne de purification.
11. Centrifuger à 6 000 x g à 20 °C pendant 5 min.
12. Ajouter 100 µl de solution R2 dans la colonne de purification.
13. Jeter le flacon collecteur. Couvrir la colonne de purification avec un flacon collecteur propre et retourner l'ensemble.
14. Centrifuger pendant 3 min à 1 000 x g à 20 °C. Jeter la colonne de purification.

Remarque : Au cours de cette étape, le bouchon ne peut être fermé.

15. Conserver le flacon collecteur contenant les 100 µl de solution d'ADN purifié. Utiliser 5 µl de cette solution pour chaque réaction de PCR en temps réel. La solution d'ADN peut être conservée plusieurs mois à -20 °C. Le calcul du facteur Z ($Z = 36$) est détaillé dans la Section 7 Protocole, D. Analyse des données, Calcul de la fraction d'échantillon analysée.

Aquadien - Extraction et purification d'ADN - Traitement avec la solution FDRS (Free DNA Removal Solution)

1. Plier délicatement la membrane en deux, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. Annexe 1).
2. Avec les pinces, introduire la membrane dans un tube contenant 460 µl de *Legionella* DNA Free Water et 40 µl de solution FDRS activée. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du tube.
3. Retourner le tube plusieurs fois pour homogénéiser. Ne pas vortexer.
4. Incuber à 37 °C pendant 30 min.
5. Ajouter 500 µl de R1 pour désactiver la solution FDRS en vue de l'extraction d'ADN.
6. Vortexer pendant 10 sec.
7. Incuber à 95 °C pendant 15 min à 1 300 rpm dans un agitateur-incubateur.

8. Retirer délicatement la membrane et l'essorer le long de la paroi du tube afin de récupérer la totalité du lysat. Jeter la membrane.
9. Centrifuger à 900 x g pendant 3 min.
10. Transférer 500 µl du surnageant vers une colonne de purification. Ne pas vortexer le lysat avant le prélèvement.
11. Centrifuger à 6 000 x g pendant 10 min.
12. Ajouter 100 µl de solution R2 et jeter le flacon collecteur.
13. Jeter le flacon collecteur. Couvrir la colonne de purification avec un flacon collecteur propre et retourner l'ensemble.
14. Centrifuger à 1 000 x g pendant 3 min. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler sur 20 °C. Jeter la colonne de purification.

Remarque : Au cours de cette étape, le bouchon ne peut être fermé.

15. Conserver le flacon collecteur contenant les 100 µl de solution d'ADN purifié. Utiliser 5 µl de cette solution pour chaque réaction de PCR en temps réel. La solution d'ADN peut être conservée plusieurs mois à -20 °C. Le calcul du facteur Z (Z = 36) est détaillé dans la Section 7 Protocole, D. Analyse des données, Calcul de la fraction d'échantillon analysée.

C. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

Pour la configuration de l'instrument et du logiciel, suivre les instructions fournies dans le guide d'utilisation du système PCR en temps réel pour les kits iQ-Check.

Préparation du mélange de PCR

1. Préparer le mélange de PCR contenant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B). Le volume de mélange de PCR nécessaire dépend du nombre d'échantillons et de contrôles à analyser. Au moins un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque PCR. Utiliser le tableau de pipetage de l'Annexe 2 pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.

Remarque : Pour la quantification, il est nécessaire de tester chaque échantillon, chaque contrôle et tous les standards de quantification en double. Ne pas mélanger les standards de quantification issus de différents lots.

Remarque : Lors de l'utilisation d'iQ-Check *Legionella* spp. et d'iQ-Check *L. pneumophila* sur la même plaque, et compte tenu de la spécificité des mélanges d'amplification pour chaque méthode, il est nécessaire d'exécuter deux séries indépendantes de standards de quantification. En outre, il convient d'analyser les résultats de chaque méthode séparément.

2. Le mélange de PCR (réactifs B + C) doit être utilisé immédiatement après la préparation. Il est stable pendant 1 hr maximum à une température de 2–8 °C.
3. Pipetter 45 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.

4. Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN, de réactif D (contrôle négatif), de réactif E (contrôle positif) ou de standards de quantification. Ne pas vortexer l'échantillon avant le pipetage. Sceller hermétiquement les puits de la plaque ou les bandes de tubes. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
5. Placer la plaque ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.

Lancement de la PCR

Pour lancer la PCR, suivre les instructions fournies dans le guide d'utilisation du système PCR en temps réel pour les kits iQ-Check.

1. Définir la configuration de la plaque dans le logiciel CFX Manager Industrial Diagnostic Edition (IDE).
2. Pour les kits iQ-Check *Legionella* Screen, les échantillons et les contrôles sont testés individuellement.
3. Pour les kits iQ-Check *Legionella* Quanti, les échantillons, les contrôles et les standards de quantification sont testés en double. Indiquer la valeur de quantité pour chaque standard et pour le matériau de référence. Cette valeur est présente sur la carte d'étalonnage dans chaque boîte de standards de quantification iQ-Check *Legionella* et sur le certificat d'analyse de chaque lot de produits.

Remarque : Pour les tests de quantification, la courbe d'étalonnage générée par un lot peut être enregistrée et réutilisée jusqu'à la fin du lot. L'option « Use reduced set of QS if possible » (Utiliser si possible un jeu réduit de valeurs QS) doit être activée avant l'exécution de la PCR. À la fin de l'exécution, sélectionner « Tools » (Outils) puis cliquer sur « Save Standard Curve » (Enregistrer la courbe standard) pour enregistrer la courbe. Par la suite, un seul point de la courbe d'étalonnage doit être déposé, en double, pour chaque analyse en vue de vérifier la conformité.

4. Sélectionner le protocole thermique approprié, « Legio. spp. » ou « Legio. pneumo. », pour les kits (Screen) qualitatifs ou les kits (Quanti) quantitatifs et cliquer sur « Run ».

D. Analyse des données

Les données peuvent être analysées directement à la fin de la PCR ou ultérieurement en ouvrant le fichier de données enregistré. Suivre les instructions du manuel d'utilisation du logiciel CFX Manager IDE correspondant pour ouvrir les fichiers de données et régler les paramètres d'analyse des données.

Calcul de la fraction d'échantillon analysée (facteur Z)

Toute méthode d'analyse comprenant une étape d'extraction, suivie d'une étape de détection, doit être accompagnée du calcul de la fraction de l'échantillon traité réellement analysée au cours de la détection finale. Cette valeur est prise en compte dans le calcul de la limite de détection et de la limite de quantification de la méthode globale ; elle permet de donner un résultat final lors d'un test quantitatif. Il convient pour cela de calculer, à chaque étape du protocole (concentration, élimination, etc.), la fraction restante par rapport à l'échantillon initial. Le facteur Z correspond au dénominateur de la fraction analysée ; il est spécifique de chaque protocole d'extraction. Z représente la valeur F/V exprimée dans le tableau d'expression des résultats des normes ISO/TS 12869 et AFNOR T90-471.

Le logiciel CFX Manager Software IDE calcule automatiquement le facteur Z (Z_2 et Z_3). L'utilisateur doit modifier la valeur Z_1 dans le logiciel si le volume filtré est différent de 1 L.

1. Dans le cas où 1 L d'eau est échantillonné et 5 μ l d'ADN sont analysés par PCR, la valeur du facteur Z du protocole Aquadien et du protocole court Aquadien est 32.

Elle est calculée de la manière suivante :

- Étape de filtration de l'échantillon : 1 000 ml d'eau sont filtrés sur les 1 000 ml échantillonnés. La fraction filtrée correspond à 1/1, donc $Z_1 = 1$
- Étape d'extraction et de purification d'ADN : Protocole Aquadien = 1 ml du surnageant R1, sur les 1,6 ml générés, est traité sur la colonne. La fraction purifiée correspond à 1 issu de 1,6, donc $Z_2 = 1,6$
 - Protocole court Aquadien = 500 μ l du surnageant R1, sur les 800 μ l générés, sont traités sur la colonne. La fraction purifiée correspond à 500 μ l issus de 800 μ l, donc $Z_2 = 1,6$
- Étape d'analyse par PCR : 5 μ l sur les 100 μ l d'ADN extrait sont analysés par PCR. La fraction analysée correspond à 5/100 = 1/20, donc $Z_3 = 20$

Le facteur Z global du protocole Aquadien est $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,6 \times 20 = 32$.

Le résultat PCR brut doit être multiplié par 32 pour obtenir la quantité finale de bactéries contenues dans l'échantillon d'eau initial, exprimée en Unités Génome (UG) par litre d'eau. Si le volume d'eau filtré est différent de 1 L, il doit être pris en compte dans les calculs.

2. Dans le cas où 1 L d'eau est échantillonnée et 5 μ l d'ADN sont analysés par PCR, la valeur du facteur Z du protocole Aquadien pour échantillons souillés/chargés et du protocole court Aquadien pour échantillons souillés/chargés est 36.

Elle est calculée de la manière suivante :

- Étape de filtration de l'échantillon : 1 000 ml d'eau sont filtrés sur les 1 000 ml échantillonnés. La fraction filtrée correspond à 1/1, donc $Z_1 = 1$
- Étape d'extraction et de purification d'ADN : Protocole Aquadien = 1 ml du surnageant R1, sur les 1,8 ml générés (1,6 ml de R1 + 0,2 ml de W2), est traité sur la colonne. La fraction purifiée correspond à 1 issu de 1,8, donc $Z_2 = 1,8$
 - Protocole court Aquadien = 500 μ l du surnageant R1, sur les 900 μ l générés, sont traités sur la colonne (800 μ l de R1 + 100 μ l de W2). La fraction purifiée correspond à 500 μ l issus de 900 μ l, donc $Z_2 = 1,8$
- Étape d'analyse par PCR : 5 μ l sur les 100 μ l d'ADN extrait sont analysés par PCR. La fraction analysée correspond à 5/100 = 1/20, donc $Z_3 = 20$.

Le facteur Z global du protocole Aquadien pour les échantillons souillés/chargés est :
 $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36$.

Le résultat PCR brut doit être multiplié par 36 pour obtenir la quantité finale de bactéries contenues dans l'échantillon d'eau initial, exprimée en Unités Génome (UG) par litre d'eau. Si le volume d'eau filtré est différent de 1 L, il doit être pris en compte dans les calculs.

3. Dans le cas où 1 L d'eau est échantillonnée et 5 μ l d'ADN sont analysés par PCR, la valeur du facteur Z du protocole FDRS Aquadien est 36.

Elle est calculée de la manière suivante :

Section 7 Protocole

- Étape de filtration de l'échantillon : 1 000 ml d'eau sont filtrés sur les 1 000 ml échantillonnés. La fraction filtrée correspond à 1/1, donc $Z_1 = 1$
- Étape d'extraction et de purification d'ADN : 500 µl de surnageant, sur les 900 µl générés (460 µl d'eau et 40 µl de solution FDRS activée, avec 400 µl de R1), sont traités sur la colonne. La fraction purifiée correspond à 900/500, donc $Z_2 = 1,8$.
- Étape d'analyse par PCR : 5 µl sur les 100 µl d'ADN extrait sont analysés par PCR. La fraction analysée correspond à 5/100 = 1/20, donc $Z_3 = 20$.

Le facteur Z global du protocole FDRS Aquadien est :
 $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36$.

Le résultat PCR brut doit être multiplié par 36 pour obtenir la quantité finale de bactéries contenues dans l'échantillon d'eau initial, exprimée en Unités Génome (UG) par litre d'eau. Si le volume d'eau filtré est différent de 1 L, il doit être pris en compte dans les calculs.

Interprétation des résultats – iQ-Check Screen *Legionella*

Une fois que les paramètres d'analyse des données ont été définis, les résultats sont interprétés en analysant les valeurs Cq de chaque échantillon (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil).

Le logiciel CFX Manager IDE assure une analyse automatisée complète des systèmes de détection par PCR en temps réel de Bio-Rad.

Contrôles

Vérifier les contrôles positif et négatif avant d'interpréter les résultats de l'échantillon.

Pour que l'expérience soit valide, les contrôles doivent présenter les résultats du tableau ci-dessous. Dans le cas contraire, il faut répéter la réaction de PCR.

	Détection <i>Legionella</i> (canal FAM)	Détection contrôle interne (canal HEX)
Contrôle négatif	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Contrôle positif	$30 \leq Cq \leq 40$	N/A

* Le logiciel indique une valeur Cq (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil) N/A (non applicable) lorsque la fluorescence d'un échantillon ne dépasse pas significativement le bruit de fond, et par conséquent ne croise pas le seuil.

Si les résultats des contrôles négatif et positif diffèrent des résultats indiqués dans le tableau ci-dessus (contrôle non valide), répéter la PCR et l'analyse à partir de Section 7 Protocole, C. PCR en temps réel, Configuration de l'instrument et du logiciel.

Échantillons

L'interprétation des résultats de l'échantillon est résumée dans le tableau suivant :

Détection <i>Legionella</i> (canal FAM)	Détection contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
$Cq \geq 10$	N/A	Positif
$Cq > \text{valeur d'interception}^1$	$28 \leq Cq \leq 40$	Négatif
$Cq = \text{N/A}$	$Cq = \text{N/A}$	Inhibition ²
$Cq = \text{N/A}$	$Cq > 40$	Inhibition
$Cq = \text{N/A}$	$Cq < 28$	Problème analytique ³

¹ La valeur d'interception à prendre en considération dans le contexte d'une analyse qualitative est $Cq = 43$ (cette valeur permet de donner une indication de la valeur d'interception choisie durant la validation). L'utilisateur peut déterminer une valeur d'interception en faisant la moyenne des valeurs d'interception obtenues et en ajoutant deux écarts-types.

² Lorsque la détection pour l'échantillon et le contrôle interne donne une valeur $Cq = \text{N/A}$, l'échantillon doit être dilué à 1:10 dans un tampon d'éluion d'extraction d'ADN et testé à nouveau.

³ Vérifier que le seuil a été placé correctement ou que la courbe de données brutes est une courbe d'amplification normale. Si la courbe n'a pas de forme caractéristique, répéter le test de PCR.

Un non-respect des critères de validation peut entraîner une interprétation non valide. Vérifier les données brutes et continuer de la même façon que pour un cas d'inhibition de l'échantillon.

Limite de détection

La limite de détection de l'étape PCR (Ld PCR) pour une méthode de détection et de quantification PCR de *Legionella* est définie comme le plus faible nombre d'UG générant un résultat positif, avec une limite de confiance de 90 % (NF T90-471). La limite de détection de l'étape PCR (Ld PCR) est de 5 UG par 5 μ l d'ADN extrait. Pour calculer la limite de détection théorique de la méthode totale (Ld) pour un échantillon d'1 L, prendre en considération le facteur Z. La limite de détection Ld théorique pour la méthode totale tient compte d'un résultat de filtration et d'extraction de 100 %.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Z = fraction d'échantillon déposée dans chaque puits PCR

D = facteur de dilution si l'ADN a été dilué avant l'exécution PCR

Interprétation des résultats — iQ-Check Quanti *Legionella*

Vérifier que la courbe, en tant que données brutes, montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (une ligne de départ plane, avec une augmentation rapide de la fluorescence, puis une stabilisation). Vérifier la validité de la série de standards de quantification et des contrôles avant de lire la quantité moyenne d'UG calculée pour chaque échantillon.

Contrôles et standards

Vérifier les contrôles et les standards avant d'interpréter les résultats de l'échantillon.

Pour que l'expérience soit valide, les contrôles et les standards doivent présenter les résultats du tableau ci-dessous. Dans le cas contraire, il faut répéter la réaction de PCR.

	Détection <i>Legionella</i> (canal FAM)	Détection contrôle interne (canal HEX)
Contrôle négatif	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Efficacité PCR	$75 \% \leq \text{efficacité PCR} \leq 125 \%$	N/A
Coefficient de corrélation (r^2)	$\geq 0,99$	N/A
Qs1–Qs4	$20 \leq Cq \leq 40$	$28 \leq Cq \leq 40$

* Le logiciel indique une valeur Cq (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil) N/A (non applicable) lorsque la fluorescence d'un échantillon ne dépasse pas significativement le bruit de fond, et par conséquent ne croise pas le seuil.

Si l'un des standards de quantification se situe largement en dehors de la courbe type, il est possible de l'éliminer afin d'optimiser les résultats et d'atteindre les paramètres ci-dessus. Seul un réplicat de standard peut être éliminé. Le matériau de référence doit satisfaire aux exigences des normes NF T90-471 et ISO/TS 12869. Si les résultats des contrôles négatifs et des standards diffèrent de ceux indiqués ci-dessus, répéter le test PCR.

Échantillons

L'interprétation des résultats de l'échantillon est résumée dans le tableau suivant :

Détection <i>Legionella</i> (canal FAM)	Détection contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
Cq ≥ 10	N/A	Positif
Cq ≥ 10	$Cq \leq \text{Moyenne Cq Qs} + 3\sigma^1$	Positif
Cq ≥ 10	$Cq > \text{Moyenne Cq Qs} + 3\sigma$	Inhibition ²
Cq = N/A	$\text{Moyenne Cq Qs} - 3\sigma \leq Cq \leq \text{Moyenne Cq Qs} + 3\sigma$	Négatif
Cq = N/A	N/A	Inhibition
Cq = N/A	$Cq > \text{Moyenne Cq Qs} + 3\sigma$	Inhibition
Cq = N/A	$Cq < \text{Moyenne Cq Qs} - 3\sigma$	Problème analytique ³

¹ Moyenne Cq Qs est la moyenne des valeurs Cq HEX pour tous les Qs ; σ représente l'écart-type.

² Lorsque la détection pour l'échantillon et le contrôle interne donne une valeur Cq = N/A, l'échantillon doit être dilué à 1:10 dans un tampon d'éluion d'extraction d'ADN et testé à nouveau.

³ Vérifier que le seuil a été placé correctement ou que la courbe de données brutes est une courbe d'amplification normale. Si la courbe n'a pas de forme caractéristique, répéter le test de PCR.

Si un échantillon présente une concentration très élevée de *Legionella* ($C_{qFAM} < C_{qFAM} Qs4$), la valeur C_{qHEX} peut être supérieure à la valeur C_{qHEX} de $Qs4$. Cet échantillon se situe en dehors de la plage dynamique de quantification. Si une quantification précise est requise, diluer l'échantillon et répéter la PCR.

Un puits avec une valeur $Cq >$ valeur d'interception b , et sans inhibition, n'est pas considéré positif.

Si un résultat PCR positif et un résultat PCR négatif sont obtenus pour un échantillon, celui-ci est considéré positif.

Calcul de la concentration de *Legionella*

Les valeurs données pour chaque échantillon dans le rapport correspondent à la quantité initiale d'UG de *Legionella* présente dans 5 µl d'extrait d'ADN. Pour obtenir la concentration de *Legionella* en UG / 1 L d'échantillon d'eau, prendre en compte la valeur moyenne de quantification (« moyenne UG/puits ») calculée par le logiciel pour chaque échantillon.

$$X = \frac{\text{[Mean quantity in 5 } \mu\text{l]} \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

X = UG *Legionella* contenues dans 1 L d'échantillon d'eau
Z = fraction d'échantillon déposée dans chaque puits PCR
D = facteur de dilution si l'ADN a été dilué avant l'exécution PCR

Limite de détection

La limite de détection de l'étape PCR (Ld PCR) pour une méthode de détection et de quantification PCR de *Legionella* est définie comme le plus faible nombre d'UG générant un résultat positif, avec une limite de confiance de 90 % (NF T90-471). La limite de détection de l'étape PCR (Ld PCR) est de 5 UG par 5 µl d'ADN extrait. Pour calculer la limite de détection théorique de la méthode totale (Ld) pour un échantillon d'1 L, prendre en considération le facteur Z divisé par 2, étant donné que les échantillons sont testés en double. La limite de détection Ld théorique pour la méthode totale tient compte d'un résultat de filtration et d'extraction de 100 %.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L) } \times 2}$$

Z = fraction d'échantillon déposée dans chaque puits PCR
D = facteur de dilution si l'ADN a été dilué avant l'exécution PCR

Limite de quantification

La limite de quantification de l'étape PCR (Lq PCR) pour une méthode de quantification PCR de *Legionella* est définie comme le plus faible nombre de copies permettant une répétabilité et une précision de quantification, telles que décrites par la norme NF T90-471. $Qs1$, le premier point du standard de quantification, correspond à la limite de quantification pour chaque lot d'iQ-Check Quanti *Legionella*.

Section 7 Protocole

La valeur exacte de Qs1 pour chaque lot de standards de quantification est indiquée sur la carte d'étalonnage et sur le certificat d'analyse.

$$Lq = Qs1 \times Z$$

Si un volume d'eau autre que 1 L est filtré ou si l'extrait d'ADN doit être dilué, la valeur Lq de la méthode change.

$$Ld = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Limite de quantification supérieure

La limite de quantification supérieure (UQL) de la méthode correspond à la valeur (pour 1 L) fournie par le point le plus élevé des standards de quantification, le standard Qs4. La valeur exacte de Qs4 pour chaque lot de standards de quantification est indiquée sur la carte d'étalonnage et sur le certificat d'analyse. Pour obtenir la valeur UQL de la méthode, la valeur Qs4 doit être multipliée par la fraction d'échantillon analysée Z et par le facteur de dilution D.

$$UQL = \frac{Qs4 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Expression des résultats

Le résultat final est exprimé en UG/L avec 2 nombres significatifs (par exemple, 1 300 UG/L pour une concentration calculée de 1 256 UG/L).

Unités Génome/ Puits PCR	Interprétation	Conclusion
< 5	< Ld	Cible non détectée à la limite de détection
[5, Qs1]	< Lq	Cible présente mais non quantifiable
[Qs1–Qs4]	X	Cible présente et quantifiable
> Qs4	UQL	Quantité élevée de la cible*

*En dehors de la plage dynamique de quantification. Si une quantification précise est requise, diluer l'échantillon et répéter la PCR.

Section 8

Confirmation des résultats positifs

Se reporter aux réglementations locales.

Section 9

Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check

Les kits iQ-Check *Legionella* peuvent également être utilisés pour confirmer des colonies de *Legionella* isolées sur boîtes gélosées GVPC ou BCYE.

1. Choisir une colonie isolée avec un cure-dent, une anse stérile ou un autre consommable adapté (par exemple, un embout de pipette).
2. Remettre en suspension la colonie dans 200 µl de *Legionella* DNA Free Water dans un microtube à centrifuger. Vortexer pendant 20 sec.
3. Diviser la suspension en deux aliquotes de 100 µl (tube 1 et tube 2).
4. Incuber le tube 1 à 95 °C pendant 10 min. Utiliser 5 µl de la suspension avec 45 µl du mélange de PCR (voir Section 7 Protocole, C. PCR en temps réel) pour lancer la PCR.
5. Si $C_q >$ valeur d'interception, le résultat est négatif et il n'est pas possible de confirmer ni d'identifier la colonie.
6. Si $C_q < 30$, le résultat est positif et la colonie est confirmée et identifiée. Dans ce cas, il convient de stocker le tube 1 avec l'ADN extrait à -20 °C jusqu'à 3 mois, si la PCR doit être répétée. En outre, le tube 2 doit être stocké à 4 °C pour une éventuelle mise en culture.
7. Si la PCR présente une inhibition, diluer l'extrait d'ADN du tube 1 dans la solution stérile *Legionella* DNA Free Water (1:100) et répéter la PCR.
8. Si $30 < C_q <$ valeur d'interception, confirmer le résultat positif avec une autre méthode ou répéter le protocole avec une autre colonie isolée.

Section 10 Performance du test et validations



BRD 07/15– 12/07
BRD 07/16– 12/07

MÉTHODE POUR L'ANALYSE
DE L'EAU

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

Le kit Aquadien DNA Extraction and Purification est utilisé dans le cadre des méthodes iQ-Check *Legionella* spp. et *L. pneumophila* certifiées NF Validation, conformément au protocole de validation fondé sur la norme NF T90-471 (juin 2015) pour la détection et la quantification des *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* avec les kits PCR en temps réel iQ-Check. Le domaine de validation a été étendu à la norme ISO/TS 12869 (avril 2019) : Qualité de l'eau — Détection et quantification de *Legionella* spp. et/ou *L. pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR). Numéro de certificat : iQ-Check *Legionella* spp. BRD 07/15 – 12/07 et iQ-Check *L. pneumophila* BRD 07/16 – 12/07. Fin de validité : se reporter au certificat disponible sur le site Web AFNOR Certification.

Section 11 Références

AFNOR NF T90-471. Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification PCR.

Engleberg NC et al. (1989). DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 57,1263–1270.

ISO 11731. Qualité de l'eau — Dénombrement des *Legionella*.

ISO/TS 12869. Détection et quantification de *Legionella* spp. et/ou *L. pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)

MacDonell MT and Colwell RR. (1987). The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res* 15, 1335.

NF T 90-431. Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* — Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.

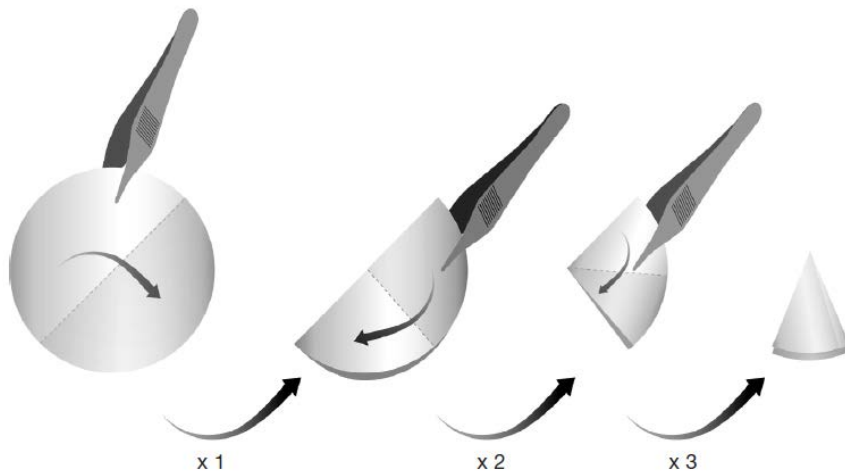
Specht T et al. (1986). Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res* 18 Suppl, 2215–2230.

Section 12

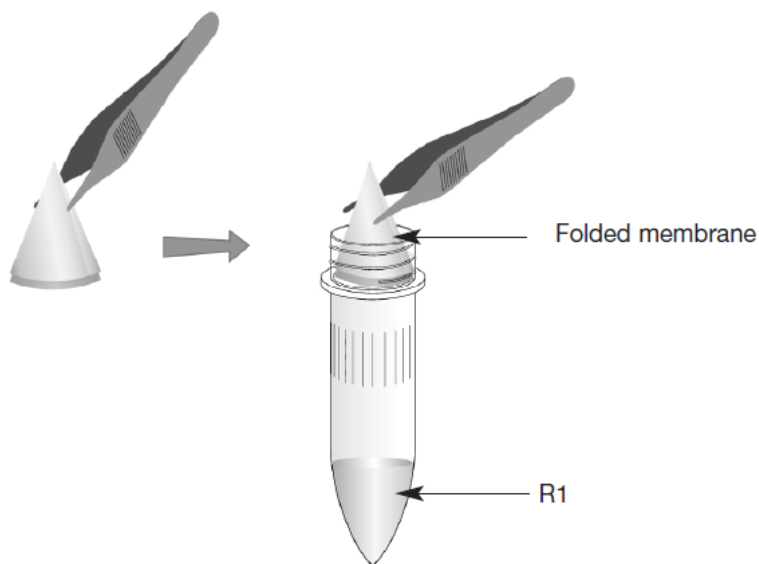
Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Octobre 2020	10000134675 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nouvelle conception de document et mise à jour des références et du contenu- Modification du numéro de document (versions précédentes : 881116 et 881117)
Juin 2023	10000134675 Ver B	<ul style="list-style-type: none">- Renouvellement et extension de la validation NF :<ul style="list-style-type: none">- CFX Opus 96 Real-Time PCR System- La courbe d'étalonnage générée par un lot peut être enregistrée et réutilisée jusqu'à la fin du lot- Mise à jour des références et du contenu

Annexe 1 — Guide de pliage de la membrane



Plier délicatement la membrane en deux, trois fois de suite afin d'obtenir un cône.



Avec les pinces, introduire la membrane dans un tube contenant 1 ml de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du tube.

Annexe 2 — Guide de calcul du mélange de PCR

Pour trouver les volumes corrects de la préparation du mélange de PCR, additionner le nombre total d'échantillons et de contrôles à analyser et trouver les volumes correspondants de réactif B et de réactif C dans le tableau.

Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl
1	5	40	33	178	1400	65	351	2800
2	11	86	34	184	1500	66	356	2900
3	16	130	35	189	1500	67	362	2900
4	22	173	36	194	1600	68	367	2900
5	27	216	37	200	1600	69	373	3000
6	32	259	38	205	1600	70	378	3000
7	38	302	39	211	1700	71	383	3100
8	43	346	40	216	1700	72	389	3100
9	49	389	41	221	1800	73	394	3200
10	54	432	42	227	1800	74	400	3200
11	59	475	43	232	1900	75	405	3200
12	65	518	44	238	1900	76	410	3300
13	70	562	45	243	1900	77	416	3300
14	76	605	46	248	2000	78	421	3400
15	81	648	47	254	2000	79	427	3400
16	86	691	48	259	2100	80	432	3500
17	92	734	49	265	2100	81	437	3500
18	97	778	50	270	2200	82	443	3500
19	103	821	51	275	2200	83	448	3600
20	108	864	52	281	2200	84	454	3600
21	113	907	53	286	2300	85	459	3700
22	119	950	54	292	2300	86	464	3700
23	124	994	55	297	2400	87	470	3800
24	130	1000	56	302	2400	88	475	3800
25	135	1100	57	308	2500	89	481	3800
26	140	1100	58	313	2500	90	486	3900
27	146	1200	59	319	2500	91	491	3900
28	151	1200	60	324	2600	92	497	4000
29	157	1300	61	329	2600	93	502	4000
30	162	1300	62	335	2700	94	508	4100
31	167	1300	63	340	2700	95	513	4100
32	173	1400	64	346	2800	96	518	4100

Visitez bio-rad.com/legionella pour plus d'informations.

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.

AQUADIEN et IQ-CHECK sont des marques déposées de Bio-Rad Europe GmbH dans certaines circonscriptions.

Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000134675 Ver B US/EG

Aquadien DNA Extraction and Purification Kit
iQ-Check™ Screen *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

Anwenderhandbuch

Tests für die Extraktion und Aufreinigung von DNA sowie zum Nachweis und zur Quantifizierung von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* in Wasserproben durch die Real-Time PCR

Katalog-Nr. 3578121, Aquadien DNA Extraction and Purification Kit
Katalog-Nr. 3578104, iQ-Check Screen *Legionella* spp. Kit
Katalog-Nr. 3578102, iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
Katalog-Nr. 3578105, iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
Katalog-Nr. 3578103, iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1.	Einleitung	1
Abschnitt 2.	iQ-Check <i>Legionella</i> Technologie.....	1
Abschnitt 3.	Zusammensetzung des Kits	2
Abschnitt 4.	Haltbarkeit und Lagerung	3
Abschnitt 5.	Zusätzlich benötigtes Material	3
	Geräte	3
	Zubehör	4
Abschnitt 6.	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse.....	4
Abschnitt 7.	Protokoll	5
	A. Gewinnung und Transport der Proben.....	5
	B. Wasserfiltration und DNA-Extraktion.....	6
	C. Real-Time PCR.....	11
	D. Datenanalyse	12
Abschnitt 8.	Bestätigung positiver Ergebnisse.....	19
Abschnitt 9.	Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit.....	19
Abschnitt 10.	Testleistung und Testvalidierungen.....	20
Abschnitt 11.	Literatur	21
Abschnitt 12.	Revisionshistorie.....	21
	Anhang 1 — Anleitung zum Falten der Membran.....	22
	Anhang 2 — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch.....	23

Abschnitt 1

Einleitung

Legionella sind gramnegative Bakterien, die in allen aquatischen Bereichen vorkommen. Eine Infektion kann eine akute Lungenentzündung, die Legionärskrankheit und eine leichtere Form der Lungeninfektion, das Pontiac-Fieber, verursachen. In Europa steigt die Zahl der gemeldeten Fälle von Legionärskrankheit pro Jahr um 25 %. Schätzungen des US-amerikanischen „Centers for Disease Control and Prevention“ zufolge gibt es in den USA pro Jahr 10.000 bis 20.000 Fälle von Legionellose. Ungefähr 90 % aller klinischen Fälle werden durch *Legionella pneumophila*-Arten verursacht.

Die einzige Möglichkeit zur Verhinderung von Erkrankungen ist die regelmäßige Überprüfung von Wasserversorgungssystemen wie Kühltürmen von Klimaanlagen, Whirlpools, Springbrunnen sowie Warm- und Kaltwassersystemen auf das Vorhandensein von *Legionella*. In den meisten Industrieländern sind Tests auf *Legionella* vorgeschrieben oder werden dringend empfohlen. Herkömmliche Kulturmethode zum Nachweis von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in Wasserproben haben mehrere Nachteile, beispielsweise ihre geringe Empfindlichkeit und lange Inkubationszeiten (10 – 13 Tage für positive Proben).

Das Aquadien Kit ermöglicht eine optimale Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Bakterien in Wasserproben für den anschließenden Nachweis durch die Real-Time PCR. Das Extraktionsprinzip basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien in Verbindung mit einem Thermoschock und der DNA-Aufreinigung mittels Ultrafiltration.

Das iQ-Check *Legionella* spp. und das iQ-Check *L. pneumophila* Kit sind für den schnellen Nachweis bzw. die Quantifizierung von *Legionella* (spp. oder *pneumophila*) in Wasserproben ausgelegt. Für die Quantifizierung werden die kalibrierten iQ-Check *Legionella* DNA Quantification Standards im Amplifikationsschritt verwendet. Die Ergebnisse liegen nach dem Filtrations- und DNA-Extraktionsschritt innerhalb von weniger als 3 Stunden vor.

Abschnitt 2

iQ-Check *Legionella* Technologie

Bei den iQ-Check *Legionella* Kits handelt es sich um Tests, die auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruhen. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien enthalten DNA-Primer und eine DNA-Sonde, die für *Legionella* spp. oder *L. pneumophila* spezifisch sind, sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR Gerätes von Bio-Rad, z. B. des CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystems und des CFX Opus 96 Real-Time PCR Systems, optimiert.

Die PCR ist eine leistungsstarke Technik, mit der viele Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden können. Während der PCR-Reaktion wird die DNA während mehrerer Zyklen des Erhitzens und Abkühlens denaturiert, um es den Primern zu ermöglichen, an die Zielregion zu binden. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

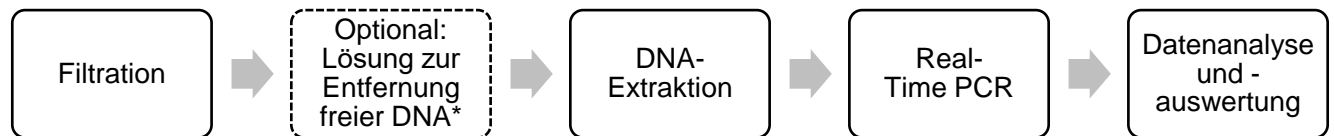
Bei der Real-Time PCR beruht der DNA-Nachweis auf der Hybridisierung spezifischer Sonden während der Amplifikation an die Amplikons. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, das nur fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Bei dem Fluorophor, das an die mit der *Legionella* spp.- oder *L. pneumophila*-spezifischen DNA-Sequenz hybridisierten Sonde gebunden ist, handelt es sich um FAM. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

Annealing-Schritt jedes PCR-Zyklus misst das optische Modul bzw. der Detektor diese Fluoreszenz. Die Software des Geräts trägt die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen auf. Diese Methode ermöglicht eine einfache Bestimmung des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins von *Legionella* spp. oder *L. pneumophila* in einer Probe.

Das Reaktionsgemisch enthält eine interne DNA-Kontrolle aus synthetischer DNA. Diese Kontrolle wird gleichzeitig mit der DNA-Zielsequenz von *Legionella* spp. bzw. *L. pneumophila* mit einer spezifischen Sonde amplifiziert und durch ein zweites Fluorophor (HEX) nachgewiesen. Dies dient der Validierung eines etwaigen negativen Ergebnisses.

Die iQ-Check Kits können *Legionella* spp. oder *L. pneumophila* in Wasserproben in vier Hauptschritten nachweisen bzw. quantifizieren:



* Die Verwendungsbedingungen sind dem Anwenderhandbuch für die iQ-Check Free DNA Removal Solution (# 10000058391) zu entnehmen.

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

Das Aquadien DNA Extraction and Purification Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests (94 Proben).

Reagenz-ID	Reagenz	Menge
R1	Lysereagenz	2 Flaschen, 100 ml
R2	Elutionspuffer	1 Röhrchen, 25 ml
	Kryoröhrchen (4,5 ml)	100 Röhrchen
	Aufreinigungssäule	96 Säulen
	Sammelgefäße	192 Gefäße

Das iQ-Check Screen *Legionella* spp. und das *L. pneumophila* Kit enthalten ausreichend Reagenzien für 96 Tests (94 Proben). Das Quanti *Legionella* spp. und das *L. pneumophila* Kit enthalten zusätzlich Quantifizierungsstandards zur Quantifizierung von bis zu 43 Proben.

Reagenz-ID	Reagenz	Menge
B	Fluoreszenzsonden	1 Röhrchen, 0,55 ml
C	Amplifikationsmix	1 Röhrchen, 4,4 ml
D	PCR-Negativkontrolle	1 Röhrchen, 0,5 ml
E	PCR-Positivkontrolle	1 Röhrchen, 0,25 ml
Qs1	PCR Standard 1	1 Röhrchen, 0,08 ml (weißer Deckel)
Qs2	PCR Standard 2	1 Röhrchen, 0,08 ml (gelber Deckel)

Qs3	PCR Standard 3	1 Röhrchen, 0,08 ml (oranger Deckel)
Qs4	PCR Standard 4	1 Röhrchen, 0,08 ml (roter Deckel)
	Referenzmaterial ¹	1 Röhrchen, 0,08 ml (blauer Deckel)
	Kalibrierungskarte	1 Karte

¹ Das Referenzmaterial enthält kalibrierte DNA im Zusammenhang mit dem Standardreferenzmaterial, unabhängig von den Quantifizierungsstandards.

Abschnitt 4

Haltbarkeit und Lagerung

Nach dem Erhalt muss das Kit bei +2°C bis -8°C aufbewahrt werden. Bei Aufbewahrung bei dieser Temperatur können die Reagenzien bis zu dem auf den Röhrchen angegebenen Verfallsdaten verwendet werden. Die Reagenzien nicht einfrieren.

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Bunsenbrenner
- Filtrationsapparat, der entweder an eine Luftpumpe oder einen Vakuumkolben angeschlossen ist
- Biosicherheitswerkbank — Klasse II
- Wasserbad, vorzugsweise mit Deckel, das eine Temperatur von 95 ± 5 °C aufrecht erhalten kann
- Vortex
- Magnetrührer
- Thermoshaker mit Heizfunktion*, der eine Temperatur von 95 °C aufrechterhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm
- Zentrifuge mit Festwinkelrotor, vorzugsweise gekühlt
 - Geeignet für 1,5 bis 2,0 ml Röhrchen mit einer Drehgeschwindigkeit von 6.000 x g
 - Geeignet für 1,5 bis 2,0 ml Röhrchen mit einer Drehgeschwindigkeit von 12.000 x g für verschmutzte Wasserproben
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Real-Time PCR System von Bio-Rad;* z. B. das CFX96 Touch Deep Well System (Katalog-Nr. 3600037) oder das CFX Opus 96 Real-Time PCR System (Katalog-Nr. 17007992)

Hinweis: Wir empfehlen die Verwendung einer unterbrechungsfreien Stromversorgung (USV) für den Thermocycler.

* Informationen zu empfohlenen Geräten erhalten Sie vom technischen Kundendienst von Bio-Rad.

Zubehör

- Aquadien Reagent W2, 5 ml, für verschmutzte Wasserproben (Katalog-Nr. 3578119)
- Aquadien Lysis Solution R1, 100 ml (Lysereagenz; Katalog-Nr. 3578125)
- *Legionella* DNA Free Water, 1 L (Katalog-Nr. 12006823)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (FDRS; Lösung zur Entfernung freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- Polycarbonatmembranfilter, Porengröße 0,45 µm
- Steriler Trichter für den Einmalgebrauch, 250 ml
- Sterile metallische INOX-Pinzette mit abgerundeten Enden
- Sterile Filterspitzen für 20 µl, 200 µl und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile Röhren, 2 ml
- PCR-Platten, -Röhren, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Ungepuderte Handschuhe
- Einweg-Atemmaske
- 5%-ige Bleichlösung
- 70%-iger Alkohol
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Dieser Test muss von geschultem Personal durchgeführt werden.
- Wasserproben sind bei der Handhabung als potenziell infektiös zu betrachten und im Einklang mit vor Ort geltenden Verordnungen und Bestimmungen zu entsorgen.
- Alle potenziell infektiösen Materialien sollten vor dem Entsorgen autoklaviert werden.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der guten Laborpraxis ab (zum Beispiel der Normen ISO 8199 und ISO/TS 12869). In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:

- Laborgeräte (Pipetten, Röhrchen usw.) nie von einem Arbeitsplatz zu einem anderen bringen.
- Die für die Filtration verwendeten kleinen Laborartikel (z. B. die Metallpinzette) nach jeder Extraktion mit Alkohol dekontaminieren und durch Abflammen auf dem Bunsenbrenner sterilisieren.
- Vor dem Gebrauch der Pinzette überprüfen, ob sie abgekühlt ist.
- Bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle verwenden.
- Bei der DNA-Extraktion sollte eine Negativkontrolle verwendet werden.
- Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Die Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch auf dem Vortex mischen, um ihre Homogenität sicherzustellen.
- Regelmäßig die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte überprüfen.
- Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
- Die Arbeitsflächen regelmäßig mit 5%-iger Bleichlösung reinigen und mit sterilem *Legionella*-DNA-freiem Wasser und 70-%igem Alkohol oder mit einem anderen Dekontaminationsmittel wie DNA AWAY abspülen.
- Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrchendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.
- Für die Quantifizierung ist es erforderlich, jede Probe, Kontrolle und alle Quantifizierungsstandards doppelt zu testen. Das Referenzmaterial sollte gemäß den Standards NF T90-471 und ISO/TS 12869 getestet werden. Keine Quantifizierungsstandards aus verschiedenen Chargen mischen.

Abschnitt 7

Protokoll

Es wird dringend empfohlen, vor Beginn des Tests das gesamte Protokoll durchzulesen.

A. Gewinnung und Transport der Proben

Wasserproben sollten gemäß den allgemeinen Normen für den Nachweis und die Zählung von Bakterien (NF T90-471 und ISO/TS 12869) entnommen werden. Die Qualität der Ergebnisse, insbesondere bei der PCR, hängt von der strikten Einhaltung der bewährten Verfahren für die Gewinnung von Wasserproben für die mikrobiologische Analyse ab (z. B. der Norm ISO 19458).

B. Wasserfiltration und DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen

- Das Wasserbad und/oder den Thermoshaker mit Heizfunktion einschalten und auf 95 ± 5 °C einstellen. Der Füllstand des Wasserbades muss ein ausreichendes Eintauchen der 4,5-ml-Kryoröhrchen ermöglichen.
- Die der Anzahl der Proben für die DNA-Extraktion entsprechende Anzahl an Röhrchen vorbereiten. In jedes Röhrchen je nach gewähltem Protokoll x ml R1 pipettieren.

Hinweis: Das Pipettieren von R1 unter Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Rührplatte durchführen, um das Harz in Suspension zu halten. Eine Pipettenspitze mit breiter Öffnung verwenden (beispielsweise eine 1000 µl Pipette mit der entsprechenden Spitze).

- Die Anzahl der erforderlichen Aufreinigungssäulen vorbereiten, indem in jedes Sammelgefäß eine Säule gegeben wird.

Wasserfiltration

1. Die Filtrationsfläche mit 100 ml *Legionella* DNA-freiem Wasser (Katalog-Nr. 12006823) abspülen und anschließend durch Abflammen mit Alkohol dekontaminieren. Darauf achten, dass die Fläche trocken und abgekühlt ist, bevor der Membranfilter hineingelegt wird. Dieser Vorgang sollte nach jeder gefilterten Probe wiederholt werden, um eine DNA- oder Bakterienkontamination zwischen den Probenfiltrationen zu vermeiden.
2. Den Membranfilter auf den Filtrationsapparat legen. Die sterilen Trichter positionieren.
3. 100 ml bis 1 L Wasserprobe durch den Membranfilter filtrieren.

Extraktion und Aufreinigung von DNA mit dem Aquadien Kit

1. Die Membran sorgfältig dreimal zur Hälfte falten, um einen Konus zu erhalten (siehe Anhang 1).
2. Die Membran mithilfe einer Pinzette in ein Kryoröhrchen mit 2 ml R1 geben. Die Spitze des von der Membran gebildeten Konus sollte im Kryoröhrchen nach oben zeigen.
3. 20 Sekunden auf dem Vortex mischen.

Hinweis: Die Membran muss vollständig mit R1-Lösung getränkt bleiben.

4. In einem abgedeckten Wasserbad 15 min bei 95 ± 5 °C inkubieren.
5. 20 Sekunden auf dem Vortex mischen.
6. Die Membran vorsichtig mit einer sterilen 1 ml Pipettenspitze mit Filter herausnehmen, indem sie an die Wand des Kryoröhrchens gedrückt wird, damit keine Lysatreste zurückbleiben. Die Membran wegwerfen.
7. Die Kryoröhrchen 20 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Das Harz der R1-Lösung bildet am Boden des Kryoröhrchens ein Pellet. Der Überstand enthält 1,6 ml extrahierte DNA. Die Kryoröhrchen können auch 3 Minuten lang bei 900 x g in einer für 4,5 ml Röhrchen geeigneten Zentrifuge zentrifugiert werden. Darauf achten, dass die Röhrchen Raumtemperatur haben, bevor mit dem Aufreinigungsschritt begonnen wird.

- 500 µl des Überstands auf eine Aufreinigungssäule überführen. Das Lysat vor dem Überführen nicht vortexen.
- Jede Säule mit dem Deckel des Sammelgefäßes verschließen.

Hinweis: Das Harzpellet nicht pipettieren. Andernfalls 5 min warten, bis das Harz wieder ein Pellet gebildet hat, oder 3 min bei 900 x g zentrifugieren.

- 10 min bei 6.000 x g zentrifugieren. Wenn die Zentrifugentemperatur programmierbar ist, auf 20 °C einstellen.

Hinweis: Wenn die Aufreinigungssäule verstopft, länger, aber ohne Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit, zentrifugieren.

- Die im Sammelgefäß enthaltene Flüssigkeit wegwerfen.
- Schritt 8 wiederholen, indem weitere 500 µl Überstand in dieselbe Aufreinigungssäule pipettiert werden und die Säule mit dem Deckel des Sammelröhrchens verschlossen wird.
- 10 min bei 6.000 x g zentrifugieren. Wenn die Zentrifugentemperatur programmierbar ist, auf 20 °C einstellen.

Hinweis: Wenn die Aufreinigungssäule verstopft, länger, aber ohne Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit, zentrifugieren. Darauf achten, dass der Überstand vollständig durch die Säule filtriert wird. Falls nicht, erneut zentrifugieren. Wenn nach einer zweiten Zentrifugation immer noch Verstopfungen auftreten, das nachstehende Protokoll für verschmutzte Wasserproben befolgen.

- 100 µl R2-Lösung in die Aufreinigungssäule geben.
- Das Sammelgefäß wegwerfen. Ein neues sauberes Sammelgefäß auf die Aufreinigungssäule aufsetzen und die ganze Einheit umdrehen.
- 3 min bei 1.000 x g zentrifugieren. Wenn die Zentrifugentemperatur programmierbar ist, auf 20 °C einstellen. Die Aufreinigungssäule wegwerfen.

Hinweis: Bei diesem Schritt darf der Deckel nicht geschlossen werden.

- Das Sammelgefäß mit 100 µl aufgereinigter DNA-Lösung aufbewahren. Für jede Real-Time PCR-Reaktion 5 µl der DNA-Lösung verwenden. Die DNA-Lösung kann mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Die Berechnung des Z-Faktors ($Z = 32$) ist in Abschnitt 7 des Protokolls, D. Datenanalyse, Berechnung der analysierten Probenfraktion, ausführlich beschrieben.

Extraktion und Aufreinigung von DNA mit dem Aquadien Kit — Kurzprotokoll

- Die Membran sorgfältig dreimal zur Hälfte falten, um einen Konus zu erhalten (siehe Anhang 1).
- Die Membran mithilfe einer Pinzette in ein Röhrchen mit 1 ml R1 geben. Die Spitze des Membrankonus sollte im Röhrchen nach oben zeigen.
- 15 min in einem Thermoshaker mit Heizfunktion bei 1.300 rpm und 95 °C inkubieren.
- Die Membran vorsichtig herausnehmen, indem sie an die Wand des Röhrchens gedrückt wird, damit keine Lysatreste zurückbleiben. Die Membran wegwerfen.
- 3 min bei 900 x g zentrifugieren.

6. 500 µl des Überstands auf eine Aufreinigungssäule überführen. Das Lysat vor dem Überführen nicht vortexen.
7. Jede Säule mit dem Deckel des Sammelgefäßes verschließen.

Hinweis: Das Harzpellet nicht pipettieren. Andernfalls 5 min warten, bis das Harz wieder ein Pellet gebildet hat, oder 3 min bei 900 x g zentrifugieren.

8. 10 min bei 6.000 x g zentrifugieren. Wenn die Zentrifugentemperatur programmierbar ist, auf 20 °C einstellen.

Hinweis: Wenn die Aufreinigungssäule verstopft, länger, aber ohne Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit, zentrifugieren.

9. 100 µl R2-Lösung in die Aufreinigungssäule geben.
10. Das Sammelgefäß wegwerfen. Ein neues sauberes Sammelgefäß auf die Aufreinigungssäule aufsetzen und die ganze Einheit umdrehen.
11. 3 min bei 1.000 x g zentrifugieren. Wenn die Zentrifugentemperatur programmierbar ist, auf 20 °C einstellen. Die Aufreinigungssäule wegwerfen.

Hinweis: Bei diesem Schritt darf der Deckel nicht geschlossen werden.

12. Das Sammelgefäß mit 100 µl aufgereinigter DNA-Lösung aufbewahren. Für jede Real-Time PCR-Reaktion 5 µl der DNA-Lösung verwenden. Die DNA-Lösung kann mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Die Berechnung des Z-Faktors ($Z = 32$) ist in Abschnitt 7 des Protokolls, D. Datenanalyse, Berechnung der analysierten Probenfraktion, ausführlich beschrieben.

Extraktion und Aufreinigung von DNA mit dem Aquadien Kit — verschmutzte Wasserproben

1. Die Membran sorgfältig dreimal zur Hälfte falten, um einen Konus zu erhalten (siehe Anhang 1).
2. Die Membran mithilfe einer Pinzette in das Kryoröhrchen mit 2 ml R1 geben. Die Spitze des von der Membran gebildeten Konus sollte im Kryoröhrchen nach oben zeigen.
3. 20 Sekunden auf dem Vortex mischen.

Hinweis: Die Membran muss vollständig mit R1-Lösung getränkt bleiben.

4. In einem abgedeckten Wasserbad 15 min bei 95 ± 5 °C inkubieren.
5. 20 Sekunden auf dem Vortex mischen.
6. Die Membran vorsichtig mit einer sterilen 1-ml-Pipettenspitze mit Filter herausnehmen, indem sie an die Wand des Kryoröhrchens gedrückt wird, damit keine Lysatreste zurückbleiben. Die Membran wegwerfen.
7. Die Probe samt Harz in ein neues 2-ml-Röhrchen überführen. Das Kryoröhrchen wegwerfen. Das Lysat kann 24–72 hr bei 2-8 °C gelagert werden.
8. 200 µl kalten (4 °C) W2-Puffer zugeben. 5 Sekunden auf dem Vortex mischen.

9. Das Röhrchen für 15 min bei 4 ± 2 °C in den Kühlschrank stellen.
10. 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugieren.
11. 500 µl des Überstands auf eine Aufreinigungssäule überführen. Das Lysat vor dem Überführen nicht vortexen. Jede Säule mit dem Deckel des Sammelgefäßes verschließen.

Hinweis: Das Harzpellet nicht pipettieren. Andernfalls 5 min warten, bis das Harz wieder ein Pellet gebildet hat, oder 3 min bei 900 x g zentrifugieren.

12. 10 min bei 20°C und 6.000 x g zentrifugieren.

Hinweis: Wenn die Aufreinigungssäule verstopft, länger, aber ohne Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit, zentrifugieren.

13. Die im Sammelgefäß enthaltene Flüssigkeit wegwerfen.
14. Schritt 11 wiederholen, indem weitere 500 µl Überstand in dieselbe Aufreinigungssäule pipettiert werden und die Säule mit dem Deckel des Sammelröhrchens verschlossen wird.
15. 10 min bei 20°C und 6.000 x g zentrifugieren.

Hinweis: Wenn die Aufreinigungssäule verstopft, länger, aber ohne Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit, zentrifugieren. Darauf achten, dass der Überstand vollständig durch die Säule filtriert wird. Falls nicht, erneut zentrifugieren.

16. Die im Sammelgefäß enthaltene Flüssigkeit wegwerfen.
17. 250 µl R2-Lösung in die Aufreinigungssäule geben.
18. 5 min bei 20°C und 6.000 x g zentrifugieren.
19. 100 µl R2-Lösung in die Aufreinigungssäule geben.
20. Das Sammelgefäß wegwerfen. Ein neues sauberes Sammelgefäß auf die Aufreinigungssäule aufsetzen und die ganze Einheit umdrehen.
21. 3 min bei 20 °C und 1.000 x g zentrifugieren. Die Aufreinigungssäule wegwerfen.

Hinweis: Bei diesem Schritt darf der Deckel nicht geschlossen werden.

22. Das Sammelgefäß mit 100 µl aufgereinigter DNA-Lösung aufbewahren. Für jede Real-Time PCR-Reaktion 5 µl der DNA-Lösung verwenden. Die DNA-Lösung kann mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Die Berechnung des Z-Faktors ($Z = 36$) ist in Abschnitt 7 des Protokolls, D. Datenanalyse, Berechnung der analysierten Probenfraktion, ausführlich beschrieben.

Extraktion und Aufreinigung von DNA mit dem Aquadien Kit — verschmutzte Wasserproben — Kurzprotokoll

1. Die Membran sorgfältig dreimal zur Hälfte falten, um einen Konus zu erhalten (siehe Anhang 1).
2. Die Membran mithilfe einer Pinzette in ein Röhrchen mit 1 ml R1 geben. Die Spitze des Membrankonus sollte im Röhrchen nach oben zeigen.

Abschnitt 7 Protokoll

3. 15 min in einem Thermoshaker bei 1.300 rpm und 95 °C inkubieren.
4. Die Membran vorsichtig herausnehmen, indem sie an die Wand des Röhrchens gedrückt wird, damit keine Lysatreste zurückbleiben. Die Membran wegwerfen.
5. 100 µl kalten (4 °C) W2-Puffer zugeben. 5 Sekunden auf dem Vortex mischen.
6. Das Röhrchen für 15 min bei 4 ± 2 °C in den Kühlschrank stellen.
7. 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugieren.
8. 500 µl des Überstands auf eine Aufreinigungssäule überführen. Das Lysat vor dem Überführen nicht vortexen. Jede Säule mit dem Deckel des Sammelgefäßes verschließen.

Hinweis: Das Harzpellet nicht pipettieren. Andernfalls 5 min warten, bis das Harz wieder ein Pellet gebildet hat, oder 3 min bei 900 x g zentrifugieren.

9. 10 min bei 20°C und 6.000 x g zentrifugieren.

Hinweis: Wenn die Aufreinigungssäule verstopft, länger, aber ohne Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit, zentrifugieren.

10. 125 µl R2-Lösung in die Aufreinigungssäule geben.
11. 5 min bei 20°C und 6.000 x g zentrifugieren.
12. 100 µl R2-Lösung in die Aufreinigungssäule geben.
13. Das Sammelgefäß wegwerfen. Ein neues sauberes Sammelgefäß auf die Aufreinigungssäule aufsetzen und die ganze Einheit umdrehen.
14. 3 min bei 20 °C und 1.000 x g zentrifugieren. Die Aufreinigungssäule wegwerfen.

Hinweis: Bei diesem Schritt darf der Deckel nicht geschlossen werden.

15. Das Sammelgefäß mit 100 µl aufgereinigter DNA-Lösung aufbewahren. Für jede Real-Time PCR-Reaktion 5 µl der DNA-Lösung verwenden. Die DNA-Lösung kann mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Die Berechnung des Z-Faktors ($Z = 36$) ist in Abschnitt 7 des Protokolls, D. Datenanalyse, Berechnung der analysierten Probenfraktion, ausführlich beschrieben.

Extraktion und Aufreinigung von DNA mit dem Aquadien Kit — Behandlung mit FDRS (Free DNA Removal Solution)

1. Die Membran sorgfältig dreimal zur Hälfte falten, um einen Konus zu erhalten (siehe Anhang 1).
2. Die Membran mit einer Pinzette in ein Röhrchen mit 460 µl *Legionella*-DNA freiem Wasser und 40 µl aktivierter FDRS (Lösung zur Entfernung freier DNA) geben. Die Spitze des Membrankonus sollte im Röhrchen nach oben zeigen.
3. Das Röhrchen mehrmals umdrehen, um den Inhalt zu homogenisieren. Nicht auf dem Vortex mischen.
4. 30 min bei 37 °C inkubieren.

5. 500 µl R1 zugeben, um die Lösung zum Entfernen freier DNA (FDRS) vor der DNA-Extraktion zu inaktivieren.
6. 10 Sekunden auf dem Vortex mischen.
7. 15 min in einem Thermoshaker bei 1.300 rpm und 95 °C inkubieren.
8. Die Membran vorsichtig herausnehmen, indem sie an die Wand des Röhrchens gedrückt wird, damit keine Lysatreste zurückbleiben. Die Membran wegwerfen.
9. 3 min bei 900 x g zentrifugieren.
10. 500 µl des Überstands auf eine Aufreinigungssäule überführen. Das Lysat vor dem Überführen nicht vortexen.
11. 10 min bei 6.000 x g zentrifugieren.
12. 100 µl R2-Lösung zugeben und das Sammelgefäß wegwerfen.
13. Das Sammelgefäß wegwerfen. Ein neues sauberes Sammelgefäß auf die Aufreinigungssäule aufsetzen und die ganze Einheit umdrehen.
14. 3 min bei 1.000 x g zentrifugieren. Wenn die Zentrifugentemperatur programmierbar ist, auf 20 °C einstellen. Die Aufreinigungssäule wegwerfen.

Hinweis: Bei diesem Schritt darf der Deckel nicht geschlossen werden.

15. Das Sammelgefäß mit 100 µl aufgereinigter DNA-Lösung aufbewahren. Für jede Real-Time PCR-Reaktion 5 µl der DNA-Lösung verwenden. Die DNA-Lösung kann mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Die Berechnung des Z-Faktors ($Z = 36$) ist in Abschnitt 7 des Protokolls, D. Datenanalyse, Berechnung der analysierten Probenfraktion, ausführlich beschrieben.

C. Real-Time PCR

Konfiguration des Geräts und der Software

Zur Konfiguration von Gerät und Software sind die Anleitungen im Anwenderhandbuch des Real-Time PCR Systems für iQ-Check Kits zu beachten.

Vorbereitung des PCR-Reaktionsgemisches

1. Das PCR-Reaktionsgemisch mit der Amplifikationslösung (Reagenz C) und den fluoreszierenden Sonden (Reagenz B) vorbereiten. Das benötigte Volumen des PCR-Reaktionsgemisches hängt von der Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen ab. In jedem PCR-Lauf müssen mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die korrekten Mengen jedes Reagenzes sind der Pipettiertabelle im Anhang 2 zu entnehmen.

Hinweis: Für die Quantifizierung ist es erforderlich, jede Probe, Kontrolle und alle Quantifizierungsstandards doppelt zu testen. Keine Quantifizierungsstandards aus verschiedenen Chargen mischen.

Hinweis: Wenn sowohl der iQ-Check *Legionella* spp. als auch der iQ-Check *L. pneumophila* Test auf derselben Platte durchgeführt werden, müssen zwei unabhängige Quantifizierungsstandardreihen

mitgeführt werden, weil für jede Methode ein spezielles Amplifikationsgemisch verwendet wird. Darüber hinaus sollten auch die Ergebnisse jeweils separat ausgewertet werden.

2. Das PCR-Reaktionsgemisch (Reagenz B + C) sofort nach der Zubereitung verwenden. Es ist bei 2–8°C maximal 1 hr stabil.
3. Aus diesem PCR-Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 45 µl in jedes Well pipettieren.
4. 5 µl DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) und Reagenz E (Positivkontrolle) oder Quantifizierungsstandards zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der Platte bzw. die Teststreifen hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Streifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
5. Die Platte bzw. die Streifen in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 oben links befindet. Das Reaktionsmodul schließen.

Die PCR durchführen

Zum Starten des PCR-Laufs ist die Anleitung im Anwenderhandbuch des Real-Time PCR Systems für die iQ-Check Kits zu beachten.

1. Die Plattenbelegung in der CFX Manager Industrial Diagnostic Edition (IDE)-Software festlegen.
2. Bei iQ-Check *Legionella* Screen Kits werden Proben und Kontrollen jeweils als Einzelbestimmung getestet.
3. Bei iQ-Check *Legionella* Quanti Kits werden Proben, Kontrollen und Quantifizierungsstandards jeweils als Doppelbestimmung getestet. Den Mengenwert für jeden Standard und für das Referenzmaterial angeben. Dieser Wert ist auf der Kalibrierungskarte in jeder Schachtel mit iQ-Check *Legionella* Quantifizierungsstandards und auf dem Analysezertifikat für jede Produktcharge zu finden.

Hinweis: Für die Quantifizierungsassays kann die mit einer Charge erstellte Kalibrierungskurve gespeichert und bis zum Ende dieser Charge immer wieder verwendet werden. Vor dem PCR-Lauf muss die Option „Use reduced set of QS if possible“ (Wenn möglich reduzierten QS-Satz verwenden) aktiviert werden. Am Ende des Laufs „Tools“ (Extras) wählen und dann auf „Save Standard Curve“ (Standardkurve speichern) klicken, um die Kurve zu speichern. Anschließend muss bei jeder Analyse an einem einzelnen Punkt im Kalibrierungsbereichs eine Doppelbestimmung durchgeführt werden, um die Konformität zu überprüfen.

4. Das geeignete Thermoprotokoll, d h. „Legio. spp.“ oder „Legio. pneumo.“ für qualitative (Screen-)Kits bzw. quantitative (Quanti-)Kits wählen und den Lauf starten.

D. Datenanalyse

Die Datenanalyse kann direkt am Ende des PCR-Laufs oder später durch Öffnen der gespeicherten Datendatei durchgeführt werden. Es sind die Anweisungen im entsprechenden Anwenderhandbuch für die CFX Manager IDE-Software zum Öffnen von Datendateien und zur Festlegung der Datenanalyseparameter zu beachten.

Berechnung der analysierten Probenfraktion (Z-Faktor)

Jede Analysemethode, die einen Extraktionsschritt gefolgt von einem Nachweisschritt umfasst, muss eine Berechnung des Anteils der aufbereiteten Probe, der während des Nachweises tatsächlich analysiert wurde, einschließen. Dieser Wert wird bei der Berechnung der Nachweisgrenze und der Quantifizierungsgrenze der Gesamtmethode berücksichtigt und verwendet, um in einem quantitativen Test ein Endergebnis zu erhalten. Dazu wird in jedem Schritt des Protokolls (Konzentration, Eliminierung usw.) der Restanteil in Bezug auf die Ausgangsprobe berechnet. Der Z-Faktor entspricht dem Nenner der analysierten Fraktion und ist für jedes Extraktionsprotokoll spezifisch. Z stellt den Wert F/V aus der Tabelle zur Angabe der Ergebnisse in den Standards ISO/TS 12869 und AFNOR T90-471 dar.

Die CFX Manager Software, IDE berechnet den Z-Faktor (Z_2 und Z_3) automatisch. Z_1 muss vom Benutzer in der Software geändert werden, wenn das gefilterte Volumen nicht 1 L beträgt.

1. Wenn 1 L Wasser entnommen und 5 µl DNA mittels PCR analysiert werden, beträgt der Z-Wert des Aquadien Protokolls und des Aquadien Kurzprotokolls 32.

Berechnung:

- Probenfiltration: Von der Wasserprobe mit 1.000 ml werden 1.000 ml Wasser gefiltert. Die filtrierte Fraktion beträgt daher 1/1, d. h. $Z_1 = 1$
- Extraktion und Aufreinigung der DNA:
 - Aquadien Protokoll = Von 1,6 ml erzeugtem R1-Überstand wird 1 ml durch die Säule filtrierte. Die aufgereinigte Fraktion beträgt daher 1/1,6 ml, d. h. $Z_2 = 1,6$.
 - Aquadien Kurzprotokoll = Von 800 µl erzeugtem R1-Überstand werden 500 µl durch die Säule filtrierte. Die aufgereinigte Fraktion beträgt daher 500/800 µl, d. h. $Z_2 = 1,6$.
- PCR-Analyse: Von 100 µl extrahierter DNA werden 5 µl mittels PCR analysiert. Die analysierte Fraktion beträgt daher $5/100 = 1/20$, d. h. $Z_3 = 20$

Der Z-Faktor für das Aquadien Protokoll beträgt demnach insgesamt $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,6 \times 20 = 32$.

Das PCR-Ergebnis muss mit 32 multipliziert werden, um die endgültige Menge an Bakterien in der ursprünglichen Wasserprobe zu erhalten. Die Angabe erfolgt in genomischen Einheiten (GU) pro Liter Wasserprobe. Wenn das gefilterte Wasservolumen nicht 1 L beträgt, muss dies in diesen Berechnungen entsprechend berücksichtigt werden.

2. Wenn jedoch 1 L Wasser entnommen und 5 µl DNA mittels PCR analysiert werden, beträgt der Z-Wert des Aquadien Protokolls für verschmutzte Proben und des Aquadien Kurzprotokolls für verschmutzte Proben jeweils 36.

Berechnung:

- Probenfiltration: Von der Wasserprobe mit 1.000 ml werden 1.000 ml Wasser gefiltert. Die filtrierte Fraktion beträgt daher 1/1, d. h. $Z_1 = 1$
- Extraktion und Aufreinigung der DNA:
 - Aquadien Protokoll = Von 1,8 ml erzeugtem R1-Überstand (1,6 ml R1 + 0,2 ml W2) wird 1 ml durch die Säule filtrierte. Die aufgereinigte Fraktion beträgt daher 1/1,8 ml, d. h. $Z_2 = 1,8$.
 - Aquadien Kurzprotokoll = Von 900 µl erzeugtem R1-Überstand (800 µl R1 + 100 µl W2) werden 500 µl durch die Säule filtrierte. Die aufgereinigte Fraktion beträgt daher 500/900 µl, d. h. $Z_2 = 1,8$.

Abschnitt 7 Protokoll

- PCR-Analyse: Von 100 µl extrahierter DNA werden 5 µl mittels PCR analysiert. Die analysierte Fraktion beträgt daher $5/100 = 1/20$, d. h. $Z_3 = 20$.

Der Z-Wert des Aquadien Protokolls für verschmutzte Proben beträgt somit insgesamt:

$$Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36.$$

Das PCR-Ergebnis muss mit 36 multipliziert werden, um die endgültige Menge an Bakterien in der ursprünglichen Wasserprobe zu erhalten. Die Angabe erfolgt in GU pro Liter Wasserprobe. Wenn das gefilterte Wasservolumen nicht 1 L beträgt, muss dies in diesen Berechnungen entsprechend berücksichtigt werden.

3. Wenn jedoch 1 L Wasser entnommen und 5 µl DNA mittels PCR analysiert werden, beträgt der Z-Wert des Aquadien FDRS Protokolls 36.

Berechnung:

- Probenfiltration: Von der Wasserprobe mit 1.000 ml werden 1.000 ml Wasser gefiltert. Die filtrierte Fraktion beträgt daher $1/1$, d. h. $Z_1 = 1$
- Extraktion und Aufreinigung der DNA: Von 900 µl erzeugtem Überstand (460 µl Wasser und 40 µl mit 400 ml R1) werden 500 µl durch die Säule filtriert. Die aufgereinigte Fraktion beträgt daher $900/500$, d. h. $Z_2 = 1,8$.
- PCR-Analyse: Von 100 µl extrahierter DNA werden 5 µl mittels PCR analysiert. Die analysierte Fraktion ist $5/100 = 1/20$, d. h. $Z_3 = 20$.

Der Z-Wert des Aquadien FDRS Protokolls beträgt somit insgesamt:

$$Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36.$$

Das PCR-Ergebnis muss mit 36 multipliziert werden, um die endgültige Menge an Bakterien in der ursprünglichen Wasserprobe zu erhalten. Die Angabe erfolgt in GU pro Liter Wasserprobe. Wenn das gefilterte Wasservolumen nicht 1 L beträgt, muss dies in diesen Berechnungen entsprechend berücksichtigt werden.

Ergebnisinterpretation – iQ-Check Screen *Legionella*

Nach Festlegung der Datenanalyseparameter werden die Ergebnisse durch Analyse der Ct-Werte jeder Probe (des Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert übersteigt) interpretiert.

Die CFX Manager IDE Software ermöglicht eine vollständige automatisierte Analyse bei Verwendung von Real-Time PCR-Nachweissystemen von Bio-Rad.

Kontrollen

Vor der Interpretation der Probenergebnisse sind die Positiv- und die Negativkontrolle zu verifizieren.

Damit das Experiment gültig ist, müssen die Kontrollergebnisse den Werten entsprechen, die in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst sind. Andernfalls muss die PCR-Reaktion wiederholt werden.

	Legionella-Nachweis (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Negativkontrolle	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positivkontrolle	30 ≤ Cq ≤ 40	N/A

* Die Software gibt als Cq-Wert (der Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet) das Ergebnis N/A (Not Applicable; nicht zutreffend) an, wenn die Fluoreszenz der Probe nicht signifikant höher ist als die des Leerwerts und daher den Schwellenwert nicht übersteigt.

Wenn die Ergebnisse der Negativ- und Positivkontrollen von denen in der obigen Tabelle abweichen (ungültige Kontrolle), müssen der Lauf und die Analyse ab Abschnitt 7 des Protokolls, C. Real-Time PCR, Konfiguration des Geräts und der Software, wiederholt werden.

Proben

Die Interpretation der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Legionella-Nachweis (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
Cq ≥ 10	N/A	Positiv
Cq > Schnittpunktwert ¹	28 ≤ Cq ≤ 40	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung ²
Cq = N/A	Cq > 40	Hemmung
Cq = N/A	Cq < 28	Analysefehler ³

¹ Der bei einer qualitativen Analyse zu berücksichtigende Schnittpunktwert ist Cq = 43 (dieser Wert wird verwendet, um den während der Validierung gewählten Schnittpunktwert anzugeben). Zur Bestimmung des Schnittpunktwerths werden die erhaltenen Schnittpunktwerthe gemittelt und zwei Standardabweichungen addiert.

² Wenn sowohl beim Probennachweis als auch beim Nachweis der internen Kontrolle ein Cq-Wert = N/A erhalten wird, muss die Probe 1:10 in DNA-Extraktionspuffer verdünnt und erneut getestet werden.

³ Es ist zu überprüfen, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve in den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Die PCR wiederholen, wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist.

Wenn Validierungskriterien nicht erfüllt sind, ist das Ergebnis unter Umständen ungültig. Die Rohdaten überprüfen und wie bei einer inhibierten Probe weiter verfahren.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des PCR-Schritts (Ld-PCR) im Rahmen einer Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von *Legionella* ist definiert als die niedrigste Anzahl von GU, die bei einer Konfidenzgrenze von 90 % ein positives Ergebnis erzeugt (NF T90-471). Die Nachweisgrenze des PCR-Schritts (Ld-PCR) beträgt 5 GU pro 5 µl extrahierter DNA. Zur Berechnung der theoretischen Nachweisgrenze der Gesamtmethode (Ld) für eine 1-L-Probe ist der Z-Faktor zu berücksichtigen. Für die theoretische Nachweisgrenze der Gesamtmethode wird eine Filtrations- und Extraktionsausbeute von 100 % angenommen.

$$L_d = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Z = Fraktion der in jedes PCR-Well pipettierten Probe
 D = Verdünnungsfaktor, wenn die DNA vor dem PCR-Lauf verdünnt wurde

Ergebnisinterpretation— iQ-Check Quanti *Legionella*

Die Rohdatenkurve muss eine typische Amplifikation aufweisen (flache Basislinie, gefolgt von einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz mit anschließender Abflachung). Vor der Ermittlung der berechneten mittleren GU-Zahl für jede Probe muss die Validität der Quantifizierungsstandards und der Kontrollen überprüft werden.

Kontrollen und Standards

Vor der Interpretation der Probenergebnisse sind die Kontrollen und Standards zu verifizieren.

Damit das Experiment gültig ist, müssen die Kontrollen und Standards die in der folgenden Tabelle zusammengefassten Ergebnisse aufweisen. Andernfalls muss die PCR-Reaktion wiederholt werden.

	Legionella-Nachweis (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Negativkontrolle	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
PCR-Effizienz	75 % ≤ PCR-Effizienz ≤ 125 %	N/A
Korrelationskoeffizient (r ²)	≥ 0,99	N/A
Qs1–Qs4	20 ≤ Cq ≤ 40	28 ≤ Cq ≤ 40

* Die Software gibt als Cq-Wert (der Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet) das Ergebnis N/A (Not Applicable; nicht zutreffend) an, wenn die Fluoreszenz der Probe nicht signifikant höher ist als die des Leerwerts und daher den Schwellenwert nicht übersteigt.

Wenn einer der Quantifizierungsstandards weit außerhalb der Standardkurve liegt, kann er ausgeschlossen werden, um die Ergebnisse zu optimieren und die vorstehenden Werte zu erreichen. Es darf nur ein Replikat eines Standards entfernt werden. Das Referenzmaterial muss den Anforderungen der Normen NF T90-471 und ISO/TS 12869 entsprechen. Wenn die Ergebnisse der Negativkontrollen und Standards von den vorstehend angegebenen abweichen, muss die PCR wiederholt werden.

Proben

Die Interpretation der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

<i>Legionella</i>-Nachweis (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
$Cq \geq 10$	N/A	Positiv
$Cq \geq 10$	$Cq \leq \text{Mittelwert } Cq_{Qs} + 3\sigma^1$	Positiv
$Cq \geq 10$	$Cq > \text{Mittelwert } Cq_{Qs} + 3\sigma$	Hemmung ²
$Cq = \text{N/A}$	$\text{Mittelwert } Cq_{Qs} - 3\sigma \leq Cq \leq \text{Mittelwert } Cq_{Qs} + 3\sigma$	Negativ
$Cq = \text{N/A}$	N/A	Hemmung
$Cq = \text{N/A}$	$Cq > \text{Mittelwert } Cq_{Qs} + 3\sigma$	Hemmung
$Cq = \text{N/A}$	$Cq < \text{Mittelwert } Cq_{Qs} - 3\sigma$	Analysefehler ³

¹Der Mittelwert Cq_{Qs} ist der Durchschnitt der HEX-Cq-Werte für alle Qs ; σ stellt die Standardabweichung dar.

² Wenn sowohl beim Probennachweis als auch beim Nachweis der internen Kontrolle ein Cq-Wert = N/A erhalten wird, muss die Probe 1:10 in DNA-Extraktionspuffer verdünnt und erneut getestet werden.

³ Es ist zu überprüfen, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve in den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Die PCR wiederholen, wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist.

Wenn eine Probe eine sehr hohe *Legionella*-Konzentration aufweist ($Cq_{FAM} < Cq_{FAM} Qs4$), ist der Cq_{HEX} -Wert möglicherweise höher als der Cq_{HEX} -Wert von $Qs4$. Diese Probe liegt außerhalb des dynamischen Quantifizierungsbereichs. Wenn eine genaue Quantifizierung erforderlich ist, muss die Probe verdünnt und die PCR wiederholt werden.

Eine Well mit einem Cq-Wert $> b$ Schnittstellenwert und ohne Hemmung gilt nicht als positiv.

Wenn für eine Probe ein positives und ein negatives PCR-Ergebnis erhalten wird, gilt die Probe als positiv.

Berechnung der *Legionella*-Konzentration

Die im Ergebnisbericht für jede Probe angegebenen Werte entsprechen der Anfangsmenge an GU von *Legionella* in 5 μ l DNA-Extrakt. Um die *Legionella*-Konzentration in GU/1 L Wasserprobe zu erhalten, muss der von der Software für jede Probe berechnete Quantifizierungsmittelwert („mittlere GU/Well“) berücksichtigt werden.

$$X = \frac{[\text{Mean quantity in } 5 \mu\text{l}] \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

X = *Legionella*-GU in 1 L Wasserprobe
Z = Fraktion der in jedes PCR-Well pipettierten Probe
D = Verdünnungsfaktor, wenn die DNA vor dem PCR-Lauf verdünnt wurde

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des PCR-Schritts (Ld-PCR) im Rahmen einer Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von *Legionella* ist definiert als die niedrigste Anzahl von GU, die bei einer Konfidenzgrenze von 90 % ein positives Ergebnis erzeugt (NF T90-471). Die Nachweisgrenze des PCR-Schritts (Ld-PCR) beträgt 5 GU pro 5 µl extrahierter DNA. Zur Berechnung der theoretischen Nachweisgrenze der Gesamtmethode (Ld) für eine 1-L-Probe wird der Z-Faktor durch 2 dividiert, da die Proben als Doppelbestimmungen getestet wurden. Für die theoretische Nachweisgrenze der Gesamtmethode wird eine Filtrations- und Extraktionsausbeute von 100 % angenommen.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L) } \times 2}$$

Z = Fraktion der in jedes PCR-Well pipettierten Probe
D = Verdünnungsfaktor, wenn die DNA vor dem PCR-Lauf verdünnt wurde

Quantifizierungsgrenze

Die Quantifizierungsgrenze des PCR-Schritts (Lq PCR) im Rahmen einer Methode zur Quantifizierung von *Legionella* mittels PCR ist definiert als die niedrigste Anzahl von Kopien, die eine Wiederholpräzision und Präzision der Quantifizierung entsprechend den Angaben in der Norm NF T90-471 ermöglicht. Qs1, der erste Punkt der Quantifizierungsstandards, entspricht der Quantifizierungsgrenze für jede Charge des iQ-Check Quanti *Legionella*. Der genaue Wert von Qs1 für jede Charge von Quantifizierungsstandards ist auf der Kalibrierungskarte und auf dem Analysezertifikat angegeben.

$$Lq = Qs1 \times Z$$

Wenn eine andere Wassermenge als 1 L gefiltert wird oder wenn der DNA-Extrakt verdünnt werden muss, ändert sich die Lq für die Methode.

$$Ld = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Obere Quantifizierungsgrenze

Die obere Quantifizierungsgrenze (UQL) der Methode entspricht dem Wert (für 1 L), der durch den höchsten Punkt der Quantifizierungsstandards, den Qs4-Standard, angegeben wird. Der genaue Wert von Qs4 für jede Charge von Quantifizierungsstandards ist auf der Kalibrierungskarte und auf dem Analysezertifikat angegeben. Um die UQL der Methode zu erhalten, muss der Qs4-Wert mit der Fraktion Z der analysierten Probe und mit dem Verdünnungsfaktor D multipliziert werden.

$$\text{UQL} = \frac{\text{Qs4} \times \text{Z} \times \text{D}}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Ergebnisse

Das Abschlussergebnis wird in GU/L mit 2 relevanten Zahlen angegeben (zum Beispiel 1.300 GU/L für eine berechnete Konzentration von 1.256 GU/L).

Genomische Einheiten (GUs)/PCR-Well	Auswertung	Schlussfolgerung
< 5	< Ld	Ziel an der Nachweisgrenze nicht erkannt
[5, Qs1]	< Lq	Ziel vorhanden, aber nicht quantifizierbar
[Qs1–Qs4]	X	Ziel vorhanden und quantifizierbar
> Qs4	UQL	Hohe Zielmenge*

* Außerhalb des dynamischen Quantifizierungsbereichs. Wenn eine genaue Quantifizierung erforderlich ist, muss die Probe verdünnt und die PCR wiederholt werden.

Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

Es sind die lokal geltenden Vorschriften zu beachten.

Abschnitt 9 Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

iQ-Check *Legionella* Kits können auch zur Bestätigung isolierter *Legionella*-Einzelkolonien auf GVPC- oder BCYE-Agarplatten verwendet werden.

1. Mit einem Zahnstocher, einer sterilen Impföse oder einem anderen geeigneten Verbrauchsartikel (z. B. einer Pipettenspitze) eine isolierte Kolonie aufnehmen.

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen

2. Die Kolonie in 200 µl *Legionella*-DNA freiem Wasser in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren. 20 Sekunden auf dem Vortex mischen
3. Die Suspension in zwei 100 µl Aliquots aufteilen (Röhrchen 1 und Röhrchen 2).
4. Röhrchen 1 10 min bei 95 °C inkubieren. Für die PCR 5 µl Suspension mit 45 µl PCR-Reaktionsgemisch verwenden (siehe Abschnitt 7 Protokoll, C. Real-Time PCR).
5. Bei $C_q > \text{Schnittstellenwert}$ ist das Ergebnis negativ und die Kolonie kann nicht bestätigt oder identifiziert werden.
6. Bei $C_q < 30$ ist das Ergebnis positiv und die Kolonie kann bestätigt und identifiziert werden. In diesem Fall sollte Röhrchen 1 mit extrahierter DNA bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden, falls die PCR wiederholt werden muss. Zusätzlich muss Röhrchen 2 bei 4 °C gelagert werden, falls Kulturen anzulegen sind.
7. Wenn eine Hemmung der PCR-Reaktion festgestellt wird, den DNA-Extrakt in Röhrchen 1 in sterilem *Legionella*-DNA-freiem Wasser verdünnen (1:100) und die PCR wiederholen.
8. Bei $30 < C_q < \text{Schnittstellenwert}$ das positive Ergebnis mit einer anderen Methode absichern oder das Protokoll mit einer anderen isolierten Kolonie wiederholen.

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen



BRD 07/15 – 12/07
BRD 07/16 – 12/07

METHOD FOR WATER
ANALYSIS

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

Das Aquadien DNA Extraction and Purification Kit wird im Rahmen der zertifizierten NF-Validierung der iQ-Check *Legionella* spp. und der *L. pneumophila* Methode nach dem Validierungsprotokoll auf der Grundlage der Norm NF T90-471 (Juni 2015) zum Nachweis und zur Quantifizierung von *Legionella* spp. oder *L. pneumophila* mit iQ-Check Real-Time PCR-Kits verwendet. Der Validierungsumfang wurde auf ISO/TS 12869 erweitert (April 2019): Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Quantifikation von *Legionella* spp. und/oder *L. pneumophila* durch Konzentration und Genamplifikation mittels einer Echtzeit-Polymerisationskettenreaktion (qPCR). Zertifikatnummer: iQ-Check *Legionella* spp. BRD 07/15 – 12/07 und iQ-Check *L. pneumophila* BRD 07/16 – 12/07. Gültig bis: Entsprechend den Angaben auf dem Zertifikat auf der Website von AFNOR CERTIFICATION.

Abschnitt 11

Literatur

AFNOR NF T90-471. Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification.

Engleberg NC et al. (1989). DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 57,1263–1270.

ISO 11731. Wasserbeschaffenheit — Zählung von *Legionella*.

ISO/TS 12869. Nachweis und Quantifikation von *Legionella* spp. und/oder *L. pneumophila* durch Konzentration und Genamplifikation mittels einer Echtzeit-Polymerisationskettenreaktion (qPCR)

MacDonell MT and Colwell RR. (1987). The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res* 15, 1335.

NF T 90-431. Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* — Verfahren durch direkte Beimpfung und nach Konzentration durch Membranfiltration oder Zentrifugation

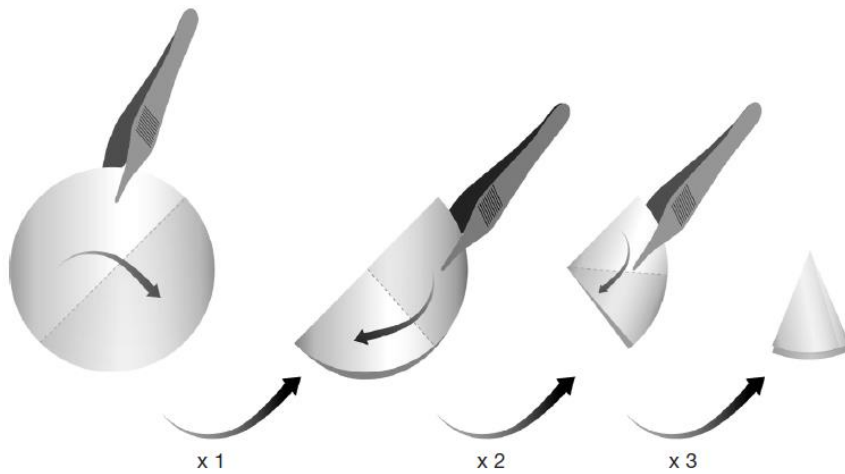
Specht T et al. (1986). Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res* 18 Suppl, 2215–2230.

Abschnitt 12

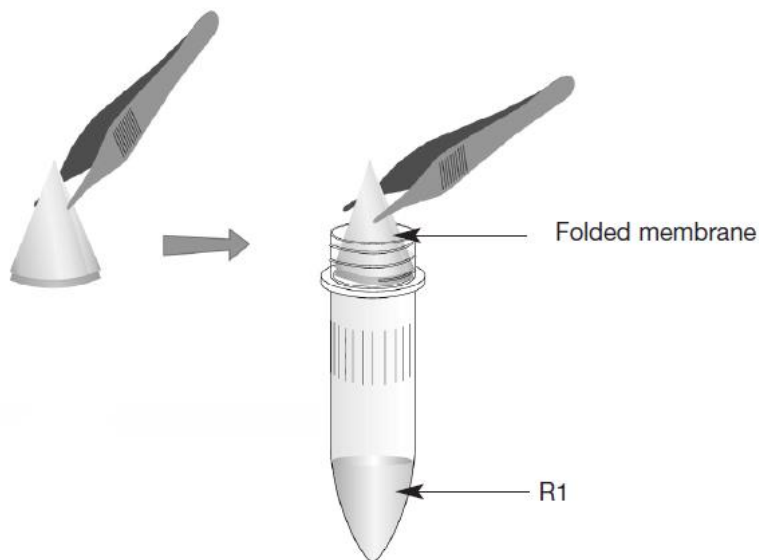
Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Oktober 2020	10000134675 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Neues Dokumentdesign und Aktualisierung der Quellenangaben und des Inhalts - Änderung der Dokumentnummer (vorhergehende Versionen waren 881116 und 881117)
Juni 2023	10000134675 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Verlängerung und Erweiterung der NF-Validierung: <ul style="list-style-type: none"> - CFX Opus 96 Real-Time PCR System - Die mit einer Charge erstellte Kalibrierungskurve kann gespeichert und bis zum Ende dieser Charge immer wieder verwendet werden. - Aktualisierung der Quellenangaben und des Inhalts.

Anhang 1 — Anleitung zum Falten der Membran



Die Membran sorgfältig dreimal zur Hälfte falten, um einen Konus zu erhalten.



Die Membran mithilfe einer Pinzette in ein Röhrchen mit 1 ml R1 geben. Die Spitze des Membrankonus sollte im Röhrchen nach oben zeigen.

Anhang 2 — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch

Die Tabelle gibt Aufschluss über die entsprechenden korrekten Mengen von Reagenz B und C zur Herstellung des PCR-Reaktionsgemisches je nach der Gesamtzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen.

Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikations mix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikations mix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikations mix Reagenz C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Weitere Informationen finden Sie auf bio-rad.com/legionella.

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.

AQUADIEN und IQ-CHECK sind in bestimmten Ländern Marken der Bio-Rad Europe GmbH.

Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000134675 Ver B US/EG

Aquadien DNA Extraction and Purification Kit
iQ-Check™ Screen *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

Manuale utente

Test per l'estrazione, la purificazione, la rilevazione e la quantificazione mediante PCR real-time del DNA di *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* nei campioni di acqua

Numero catalogo 3578121, Aquadien DNA Extraction and Purification Kit

Numero catalogo 3578104, iQ-Check Screen *Legionella* spp. Kit

Numero catalogo 3578102, iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit

Numero catalogo 3578105, iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit

Numero catalogo 3578103, iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit



Indice

Sezione 1.	Introduzione	1
Sezione 2.	Tecnologia iQ-Check <i>Legionella</i>	1
Sezione 3.	Componenti del kit	2
Sezione 4.	Validità e conservazione	3
Sezione 5.	Materiali necessari ma non forniti	3
	Apparecchiatura	3
	Materiali	4
Sezione 6.	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	4
Sezione 7.	Protocollo	5
	A. Prelievo e trasporto dei campioni	5
	B. Filtrazione dell'acqua ed estrazione del DNA	5
	C. PCR real-time	11
	D. Analisi dei dati	12
Sezione 8.	Conferma dei risultati positivi	19
Sezione 9.	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check	19
Sezione 10.	Performance del test e validazioni	20
Sezione 11.	Riferimenti	20
Sezione 12.	Cronologia delle revisioni	21
	Appendice 1 - Istruzioni per piegare la membrana	22
	Appendice 2 - Istruzioni per calcolare la miscela di PCR	23

Sezione 1

Introduzione

La *Legionella* è un batterio gram-negativo presente in tutti gli ambienti acquatici. L'infezione può causare polmonite acuta, Legionellosi e una forma più lieve di infezione polmonare, la febbre di Pontiac. In Europa il numero di casi dichiarati di Legionellosi registra un aumento del 25% all'anno. Secondo le stime dei Centres for Disease Control and Prevention (Centro per il controllo e la prevenzione delle malattie, CDC), negli Stati Uniti il numero di casi di Legionellosi si attesta tra i 10.000 e i 20.000 all'anno. Il ceppo di *Legionella pneumophila* è responsabile di circa il 90% di tutti i casi clinici.

Il controllo regolare della presenza di *Legionella* nei sistemi di distribuzione idrica, come le torri di raffreddamento dell'aria condizionata, le piscine termali, le fontane, i sistemi di acqua calda e fredda, è il solo mezzo di prevenzione della malattia. La rilevazione della *Legionella* è obbligatoria o fortemente raccomandata nella maggior parte dei paesi sviluppati. I metodi di coltura convenzionali per la rilevazione di *Legionella* spp. e *L. pneumophila* nei campioni di acqua presentano diversi inconvenienti, tra cui una scarsa sensibilità e periodi di incubazione piuttosto lunghi (10-13 giorni per i campioni positivi).

Il kit Aquadien consente di eseguire in modo ottimale l'estrazione e la purificazione del DNA dai batteri presenti nei campioni di acqua per la successiva rilevazione mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) real-time. Il principio dell'estrazione si basa sulla lisi alcalina dei batteri in presenza di uno shock termico e la purificazione del DNA mediante l'ultrafiltrazione.

I kit iQ-Check *Legionella* spp. e iQ-Check *L. pneumophila* sono formulati per rilevare o quantificare in modo rapido la *Legionella* (spp. o *pneumophila*) nei campioni di acqua. La quantificazione è possibile mediante l'utilizzo, nella fase di amplificazione, degli standard di quantificazione del DNA calibrati iQ-Check *Legionella*. I risultati si ottengono in meno di 3 ore dalla fase di filtrazione ed estrazione del DNA.

Sezione 2

Tecnologia iQ-Check *Legionella*

I kit iQ-Check *Legionella* sono test basati sull'amplificazione genica e la rilevazione mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso contengono primer di DNA e una sonda per DNA specifica per *Legionella* spp. o *L. pneumophila*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati vengono ottimizzate per l'utilizzo tramite uno strumento PCR real-time di Bio-Rad, come il sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well e Sistema PCR real-Time CFX Opus 96

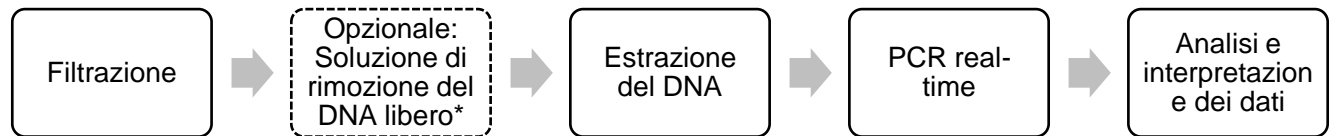
La PCR è una potente tecnica utilizzata per generare numerose copie di DNA target. Durante la reazione PCR, diversi cicli di riscaldamento e raffreddamento consentono la denaturazione del DNA, con successivo appaiamento dei primer ad una regione target specifica. A questo punto la DNA polimerasi si serve di tali primer e deossinucleosidi trifosfati (dNTP) per estendere il DNA, creando copie del DNA target. Queste copie vengono denominate ampliconi.

Nella PCR real-time, determinate sonde rilevano il DNA durante l'amplificazione tramite ibridazione degli ampliconi. Queste sonde sono collegate a un fluoroforo che emette fluorescenza solo se ibridato alla sequenza target. FAM è il fluoroforo collegato alla sonda contenuta nel presente kit che si ibrida alla sequenza specifica di DNA di *Legionella* spp. o *L. pneumophila*. In assenza di DNA target, non viene rilevata alcuna fluorescenza. Man mano che il numero di ampliconi cresce ad ogni ciclo di amplificazione, l'intensità della fluorescenza aumenta a sua volta. Nella fase di appaiamento di ogni ciclo PCR, il modulo o rilevatore ottico misura questa fluorescenza. Il software associato allo strumento rileva l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli. Tale metodo determina la presenza o l'assenza di *Legionella* spp. o *L. pneumophila* in un campione.

Sezione 3 Componenti del kit

Un DNA sintetico che serve da controllo interno è incluso nella miscela di reazione. Il controllo viene amplificato con una sonda specifica simultaneamente rispetto alla sequenza di DNA target di *Legionella* spp. o *L. pneumophila* e viene rilevato da un secondo fluoroforo (HEX). Ciò consente la validazione di eventuali risultati negativi.

I kit iQ-Check sono in grado di rilevare o quantificare la *Legionella* spp. o *L. pneumophila* nei campioni di acqua in quattro fasi principali:



* Per le condizioni d'uso, fare riferimento alle istruzioni per l'uso di iQ-Check Free DNA Removal Solution (numero 10000058391).

Sezione 3 Componenti del kit

Il kit Aquadien per l'estrazione e la purificazione del DNA contiene reagenti a sufficienza per l'esecuzione di 96 test (94 campioni).

ID reagente	Reagente	Quantità fornita, ml
R1	Soluzione di lisi	2 flaconi, 100
R2	Buffer di eluizione	1 provetta, 25
	Crioprovetta (4,5 ml)	100 provette
	Colonna di purificazione	96 colonne
	Fiale di raccolta	192 fiale

I kit iQ-Check Screen *Legionella* spp. e *L. pneumophila* contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 test (94 campioni). I kit Quanti *Legionella* spp. e *L. pneumophila* in più contengono standard di quantificazione sufficienti a quantificare fino a 43 campioni.

ID reagente	Reagente	Quantità fornita, ml
B	Sonde fluorescenti	1 provetta, 0,55
C	Miscela di amplificazione	1 provetta, 4,4
D	Controllo negativo PCR	1 provetta, 0,5
E	Controllo positivo PCR	1 provetta, 0,25
Qs1	PCR standard 1	1 provetta, 0,08 (tappo bianco)
Qs2	PCR standard 2	1 provetta, 0,08 (tappo giallo)
Qs3	PCR standard 3	1 provetta, 0,08 (tappo arancio)

Qs4	PCR standard 4	1 provetta, 0,08 (tappo rosso)
	Materiale di riferimento ¹	1 provetta, 0,08 (tappo blu)
	Scheda di calibrazione	1 scheda

¹ Il materiale di riferimento contiene un DNA calibrato correlato al materiale di riferimento standard, indipendente dagli standard di quantificazione.

Sezione 4

Validità e conservazione

Una volta ricevuto, il kit deve essere conservato a 2-8 °C. I reagenti conservati a questa temperatura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sulle provette. Non congelare i reagenti.

Sezione 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Becco di Bunsen
- Apparecchiatura di filtrazione installata su una pompa ad aria o su un contenitore sotto vuoto
- Cabina di biosicurezza - Classe II
- Bagnomaria, preferibilmente con coperchio, in grado di mantenere 95 ± 5 °C
- Vortex
- Agitatore magnetico
- Termoagitatore* in grado di mantenere 95 °C, con una velocità di miscelazione di 1.300 rpm
- Centrifuga con rotore ad angolo fisso, preferibilmente refrigerata
 - In grado di contenere provette da 1,5 - 2 ml con una capacità di rotazione di 6.000 x g
 - In grado di contenere provette da 1,5 - 2 ml con una capacità di rotazione di 12.000 x g per campioni di acqua con sporczia/ostruzioni.
- Micropipette da 20, 200, e 1.000 µl
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad*, ad esempio CFX96 Touch Deep Well (numero catalogo 3600037) o Sistema PCR Real-Time CFX Opus 96 (n. catalogo 17007992)

Nota: Con il termociclatore si consiglia di utilizzare un gruppo di continuità (UPS).

* Per informazioni sugli strumenti raccomandati, contattare il Supporto Tecnico di Bio-Rad.

Materiali

- Aquadien Reagent W2, 5 ml, per campioni di acqua con sporcizia/ostruzioni (numero catalogo 3578119)
- Aquadien Lysis Solution R1, 100 ml (numero catalogo 3578125)
- *Legionella* DNA Free Water, 1 L (numero catalogo 12006823)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (numero catalogo 3594970)
- Filtro a membrana in policarbonato, porosità da 0,45 µm
- Imbuto sterile monouso, 250 ml
- Pinzette sterili in acciaio inox con punte arrotondate
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1.000 µl
- Provette sterili, 2 ml
- Piastre PCR, provette, nastro sigillante e tappi
- Guanti senza polvere
- Maschera respiratoria monouso
- Candeggina, 5%
- Alcol, 70%
- Detergenti come DNA AWAY o RNase AWAY

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Il presente test deve essere eseguito da personale addestrato
- I campioni di acqua devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle direttive e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di laboratorio (ad esempio, le norme ISO 8199 e ISO/TS 12869), soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare mai apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra.

- Dopo ogni estrazione decontaminare con alcol il materiale da laboratorio di piccole dimensioni utilizzato per la filtrazione (ad esempio le pinzette metalliche) e sterilizzarlo con il becco di Bunsen
- Prima dell'utilizzo, verificare che le pinzette non siano calde
- Utilizzare sempre un controllo positivo e un controllo negativo per ogni serie di reazioni di amplificazione
- Durante l'estrazione del DNA utilizzare un controllo negativo
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
- Per garantirne l'omogeneità, miscelare i reagenti nel vortex prima di utilizzarli
- Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
- Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
- Pulire regolarmente gli spazi di lavoro con la candeggina al 5% e risciacquare con acqua priva di DNA di Legionella e alcol al 70% o utilizzando altri decontaminanti quali DNA away
- Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Per la quantificazione è necessario testare in duplicato tutti i campioni, i controlli e gli standard di quantificazione. Il materiale di riferimento deve essere testato in conformità alle norme NF T90-471 e ISO/TS 12869. Non miscelare gli standard di quantificazione provenienti da lotti diversi

Sezione 7

Protocollo

Si raccomanda vivamente di leggere l'intero protocollo prima di iniziare il test.

A. Prelievo e trasporto dei campioni

I campioni di acqua devono essere raccolti in conformità alle norme generali per la ricerca e la conta dei batteri (NF T90-471 e ISO/TS 12869). La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di campionamento dell'acqua per analisi microbiologiche (ad esempio, la norma ISO 19458), soprattutto in materia di PCR.

B. Filtrazione dell'acqua ed estrazione del DNA

Raccomandazioni generali

- Accendere il bagnomaria e/o il termoaggitatore e regolare su 95 ± 5 °C. Controllare il livello del bagnomaria per una corretta immersione delle crioprovette da 4,5 ml
- Preparare il numero di provette corrispondente al numero di campioni per l'estrazione del DNA. Pipettare x ml di R1 in ciascuna provetta, in base al protocollo scelto.

Nota: pipettare la R1 mentre è in atto un'agitazione a media velocità su una piastra di agitazione, al fine di mantenere la resina in sospensione. Usare un puntale per pipetta ad ampia apertura (ad esempio, utilizzare una pipetta da 1.000 µl con il puntale corrispondente).

- Preparare il numero necessario di colonne di purificazione collocando una colonna in ciascuna fiala di raccolta

Filtrazione dell'acqua

1. Sciacquare il dispositivo di filtrazione con 100 ml di acqua priva di DNA di *Legionella* e successivamente decontaminare il dispositivo mediante combustione di alcol. Assicurarsi che il dispositivo sia asciutto e freddo prima di collocarvi il filtro a membrana. Ripetere l'operazione dopo aver filtrato ogni singolo campione, per evitare contaminazioni da DNA o da batteri tra le filtrazioni dei campioni.
2. Posizionare il filtro a membrana sull'apparecchiatura di filtrazione. Posizionare gli imbuti sterili.
3. Filtrare 100 ml - 1 L di campione di acqua mediante il filtro a membrana.

Estrazione e purificazione del DNA mediante Aquadien

1. Piegare attentamente la membrana a metà per tre volte per ottenere un cono (vedere l'Appendice 1).
2. Utilizzando le pinzette, collocare la membrana in una crioprovetta contenente 2 ml di R1. La punta del cono formato dalla membrana deve trovarsi in direzione della sommità della crioprovetta.
3. Miscelare nel vortex per 20 sec.

Nota: verificare che la membrana sia ancora completamente immersa nella soluzione R1.

4. Incubare in un bagnomaria coperto a 95 ± 5 °C per 15 min.
5. Miscelare nel vortex per 20 sec.
6. Utilizzando un puntale sterile per pipette da 1 ml dotato di filtro, rimuovere con attenzione la membrana, premendola verso la parete della crioprovetta per recuperare tutto il lisato. Gettare la membrana.
7. Lasciare le crioprovette a temperatura ambiente per 20 min. La resina della soluzione R1 sedimenterà sul fondo della crioprovetta. Il surnatante contiene 1,6 ml di DNA estratto. È inoltre possibile centrifugare le crioprovette a 900 x g per 3 min in una centrifuga idonea per provette da 4,5 ml. Prima di iniziare la fase di purificazione, verificare che le provette siano a temperatura ambiente.
8. Trasferire 500 µl di surnatante nella colonna di purificazione. Non miscelare nel vortex il lisato prima della raccolta.
9. Sigillare ciascuna colonna con il tappo della fiala di raccolta.

Nota: non pipettare il pellet di resina. Se necessario, attendere 5 min che la resina si sedimenti di nuovo o centrifugare a 900 x g per 3 minuti.

10. Centrifugare a 6.000 x g per 10 min. Se la temperatura della centrifuga è programmabile, regolare a 20 °C.

Nota: se la della colonna di purificazione presenta un'ostruzione, aumentare il tempo di centrifuga senza aumentarne la velocità.

11. Gettare il liquido contenuto nella fiala di raccolta.
12. Ripetere la fase 8 pipettando altri 500 µl di surnatante nella stessa colonna di purificazione e sigillare con il tappo della fiala di raccolta.
13. Centrifugare a 6.000 x g per 10 min. Se la temperatura della centrifuga è programmabile, regolare a 20 °C.

Nota: se la della colonna di purificazione presenta un'ostruzione, aumentare il tempo di centrifuga senza aumentarne la velocità. Verificare che tutto il surnatante venga filtrato attraverso la colonna. Se ciò non avviene, centrifugare di nuovo. Se si verifica ancora un'ostruzione dopo aver centrifugato una seconda volta, seguire il seguente protocollo per i campioni di acqua con sporcizia/ostruzioni.

14. Aggiungere 100 µl di soluzione R2 nella colonna di purificazione.
15. Gettare la fiala di raccolta. Coprire la colonna di purificazione con una nuova fiala di raccolta pulita e capovolgere l'intera unità.
16. Centrifugare a 1.000 x g per 3 min. Se la temperatura della centrifuga è programmabile, regolare a 20 °C. Gettare la colonna di purificazione.

Nota: in questa fase non è possibile chiudere il tappo.

17. Conservare la fiala di raccolta contenente i 100 µl di soluzione di DNA purificato. Utilizzare 5 µl di soluzione di DNA per ciascuna reazione PCR real-time. La soluzione di DNA può essere conservata per diversi mesi a -20 °C. Il calcolo del fattore Z ($Z = 32$) è indicato nel dettaglio al paragrafo D. Analisi dei dati, Calcolo della frazione analizzata del campione, nel protocollo della Sezione 7.

Estrazione e purificazione del DNA mediante Aquadien - protocollo breve

1. Piegarne attentamente la membrana a metà per tre volte per ottenere un cono (vedere l'Appendice 1).
2. Utilizzando le pinzette, collocare la membrana in una provetta contenente 1 ml di R1. La punta del cono formato dalla membrana deve trovarsi in direzione della sommità della provetta.
3. Incubare a 95 °C per 15 min a 1.300 rpm in un termoagitatore.
4. Estrarre con attenzione la membrana, premendola verso la parete della provetta per recuperare tutto il lisato. Gettare la membrana.
5. Centrifugare a 900 x g per 3 min.
6. Trasferire 500 µl di surnatante nella colonna di purificazione. Non miscelare nel vortex il lisato prima della raccolta.
7. Sigillare ciascuna colonna con il tappo della fiala di raccolta.

Nota: non pipettare il pellet di resina. Se necessario, attendere 5 min che la resina si sedimenti di nuovo o centrifugare a 900 x g per 3 minuti.

8. Centrifugare a 6.000 x g per 10 min. Se la temperatura della centrifuga è programmabile, regolare a 20 °C.

Nota: se la della colonna di purificazione presenta un'ostruzione, aumentare il tempo di centrifuga senza aumentarne la velocità.

9. Aggiungere 100 µl di soluzione R2 nella colonna di purificazione.
10. Gettare la fiala di raccolta. Coprire la colonna di purificazione con una nuova fiala di raccolta pulita e capovolgere l'intera unità.
11. Centrifugare a 1.000 x g per 3 min. Se la temperatura della centrifuga è programmabile, regolare a 20 °C. Gettare la colonna di purificazione.

Nota: in questa fase non è possibile chiudere il tappo.

12. Conservare la fiala di raccolta contenente i 100 µl di soluzione di DNA purificato. Utilizzare 5 µl di soluzione di DNA per ciascuna reazione PCR real-time. La soluzione di DNA può essere conservata per diversi mesi a -20 °C. Il calcolo del fattore Z ($Z = 32$) è indicato nel dettaglio al paragrafo D. Analisi dei dati, Calcolo della frazione analizzata del campione, nel protocollo della Sezione 7.

Estrazione e purificazione del DNA mediante Aquadien - campioni di acqua con sporcizia/ostruzioni

1. Piegare attentamente la membrana a metà per tre volte per ottenere un cono (vedere l'Appendice 1).
2. Utilizzando le pinzette, collocare la membrana nella crioprovetta contenente 2 ml di R1. La punta del cono formato dalla membrana deve trovarsi in direzione della sommità della crioprovetta.
3. Miscelare nel vortex per 20 sec.

Nota: verificare che la membrana sia ancora completamente immersa nella soluzione R1.

4. Incubare in un bagnomaria coperto a 95 ± 5 °C per 15 min.
5. Miscelare nel vortex per 20 sec.
6. Utilizzando un puntale sterile per pipette da 1 ml dotato di filtro, rimuovere con attenzione la membrana, premendola verso la parete della crioprovetta per recuperare tutto il lisato. Gettare la membrana.
7. Trasferire il campione, compresa la resina, in una nuova provetta da 2 ml. Gettare la crioprovetta. Il lisato può essere conservato a 2 - 8 °C per 24-72 hr.
8. Aggiungere 200 µl di buffer W2 freddo (4 °C). Miscelare nel vortex per 5 sec.
9. Lasciare la provetta in frigorifero a 4 ± 2 °C per 15 min.
10. Centrifugare a 12.000 x g a 4 °C per 15 min.
11. Trasferire 500 µl di surnatante nella colonna di purificazione. Non miscelare nel vortex il lisato prima della raccolta. Sigillare ciascuna colonna con il tappo della fiala di raccolta.

Nota: non pipettare il pellet di resina. Se necessario, attendere 5 min che la resina si sedimenti di nuovo o centrifugare a 900 x g per 3 minuti.

12. Centrifugare a 6.000 x g a 20 °C per 10 min.

Nota: se la della colonna di purificazione presenta un'ostruzione, aumentare il tempo di centrifuga senza aumentarne la velocità.

13. Gettare il liquido contenuto nella fiala di raccolta.

14. Ripetere la fase 11 pipettando altri 500 µl di surnatante nella stessa colonna di purificazione e sigillare con il tappo della fiala di raccolta.

15. Centrifugare a 6.000 x g a 20 °C per 10 min.

Nota: se la della colonna di purificazione presenta un'ostruzione, aumentare il tempo di centrifuga senza aumentarne la velocità. Verificare che tutto il surnatante venga filtrato attraverso la colonna. Se ciò non avviene, centrifugare di nuovo.

16. Gettare il liquido contenuto nella fiala di raccolta.

17. Aggiungere 250 µl di soluzione R2 nella colonna di purificazione.

18. Centrifugare a 6.000 x g a 20 °C per 5 min.

19. Aggiungere 100 µl di soluzione R2 nella colonna di purificazione.

20. Gettare la fiala di raccolta, coprire la colonna di purificazione con una nuova fiala di raccolta pulita e capovolgere l'intera unità.

21. Centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 3 min. Gettare la colonna di purificazione.

Nota: in questa fase non è possibile chiudere il tappo.

22. Conservare la fiala di raccolta contenente i 100 µl di soluzione di DNA purificato. Utilizzare 5 µl di soluzione di DNA per ciascuna reazione PCR real-time. La soluzione di DNA può essere conservata per diversi mesi a -20 °C. Il calcolo del fattore Z (Z = 36) è indicato nel dettaglio al paragrafo D. Analisi dei dati, Calcolo della frazione analizzata del campione, nel protocollo della Sezione 7.

Estrazione e purificazione del DNA Aquadien - campioni di acqua con sporcizia/ostruzioni - protocollo breve

1. Piegarne attentamente la membrana a metà per tre volte per ottenere un cono (vedere l'Appendice 1).

2. Utilizzando le pinzette, collocare la membrana in una provetta contenente 1 ml di R1. La punta del cono formato dalla membrana deve trovarsi in direzione della sommità della provetta.

3. Incubare a 95 °C per 15 min a 1.300 rpm in un termoagitatore.

4. Estrarre con attenzione la membrana, premendola verso la parete della provetta per recuperare tutto il lisato. Gettare la membrana.

5. Aggiungere 100 µl di buffer W2 freddo (4 °C). Miscelare nel vortex per 5 sec.

6. Lasciare la provetta in frigorifero a 4 ± 2 °C per 15 min.

7. Centrifugare a 12.000 x g a 4 °C per 15 min.

Sezione 7 Protocollo

8. Trasferire 500 µl di surnatante nella colonna di purificazione. Non miscelare nel vortex il lisato prima della raccolta. Sigillare ciascuna colonna con il tappo della fiala di raccolta.

Nota: non pipettare il pellet di resina. Se necessario, attendere 5 min che la resina si sedimenti di nuovo o centrifugare a 900 x g per 3 minuti.

9. Centrifugare a 6.000 x g a 20 °C per 10 min.

Nota: se la della colonna di purificazione presenta un'ostruzione, aumentare il tempo di centrifuga senza aumentarne la velocità.

10. Aggiungere 125 µl di soluzione R2 nella colonna di purificazione.

11. Centrifugare a 6.000 x g a 20 °C per 5 min.

12. Aggiungere 100 µl di soluzione R2 nella colonna di purificazione.

13. Gettare la fiala di raccolta, coprire la colonna di purificazione con una nuova fiala di raccolta pulita e capovolgere l'intera unità.

14. Centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 3 min. Gettare la colonna di purificazione.

Nota: in questa fase non è possibile chiudere il tappo.

15. Conservare la fiala di raccolta contenente i 100 µl di soluzione di DNA purificato. Utilizzare 5 µl di soluzione di DNA per ciascuna reazione PCR real-time. La soluzione di DNA può essere conservata per diversi mesi a -20 °C. Il calcolo del fattore Z (Z = 36) è indicato nel dettaglio al paragrafo D. Analisi dei dati, Calcolo della frazione analizzata del campione, nel protocollo della Sezione 7.

Estrazione e purificazione del DNA mediante Aquadien - trattamento con la soluzione di rimozione del DNA libero (Free DNA Removal Solution, FDRS)

1. Pieghare attentamente la membrana a metà per tre volte per ottenere un cono (vedere l'Appendice 1).
2. Utilizzando le pinzette, collocare la membrana in una provetta contenente 460 µl di acqua priva di *Legionella* DNA Free Water e 40 µl di FDRS attivato. La punta del cono formato dalla membrana deve trovarsi in direzione della sommità della provetta.
3. Capovolgere diverse volte la provetta per omogeneizzare. Non miscelare nel vortex.
4. Incubare a 37 °C per 30 min.
5. Aggiungere 500 µl di R1 per inattivare la FDRS per l'estrazione del DNA.
6. Miscelare nel vortex per 10 sec.
7. Incubare a 95 °C per 15 min a 1.300 rpm in un termoaggitatore.
8. Estrarre con attenzione la membrana, premendola verso la parete della provetta per recuperare tutto il lisato. Gettare la membrana.
9. Centrifugare a 900 x g per 3 min.

10. Trasferire 500 µl di surnatante nella colonna di purificazione. Non miscelare nel vortex il lisato prima della raccolta.
11. Centrifugare a 6.000 x g per 10 min.
12. Aggiungere 100 µl di soluzione R2 e gettare la fiala di raccolta.
13. Gettare la fiala di raccolta. Coprire la colonna di purificazione con una nuova fiala di raccolta pulita e capovolgere l'intera unità.
14. Centrifugare a 1.000 x g per 3 min. Se la temperatura della centrifuga è programmabile, regolare a 20 °C. Gettare la colonna di purificazione.

Nota: in questa fase non è possibile chiudere il tappo.

15. Conservare la fiala di raccolta contenente i 100 µl di soluzione di DNA purificato. Utilizzare 5 µl di soluzione di DNA per ciascuna reazione PCR real-time. La soluzione di DNA può essere conservata per diversi mesi a -20 °C. Il calcolo del fattore Z ($Z = 36$) è indicato nel dettaglio al paragrafo D. Analisi dei dati, Calcolo della frazione analizzata del campione, nel protocollo della Sezione 7.

C. PCR real-time

Installazione strumento e software

Per installare strumento e software, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del sistema PCR real-time per i kit iQ-Check.

Preparazione della miscela di PCR

1. Preparare la miscela di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B). Il volume della miscela di PCR necessario dipende dal numero di campioni e controlli da analizzare. In ogni ciclo PCR devono essere inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente, consultare la tabella relativa al pipettaggio riportata in Appendice 2.

Nota: per la quantificazione è necessario testare in duplicato tutti i campioni, i controlli e gli standard di quantificazione. Non miscelare gli standard di quantificazione provenienti da lotti diversi.

Nota: quando i kit iQ-Check *Legionella* spp. e iQ-Check *L. pneumophila* sono in esecuzione sulla stessa piastra, poiché le miscele di amplificazione sono specifiche per ciascun metodo, è necessario eseguire due serie indipendenti di standard di quantificazione. Inoltre, i risultati di ognuno devono essere analizzati separatamente.

2. Utilizzare la miscela di PCR (reagenti B + C) immediatamente in seguito alla preparazione. Essa rimane stabile per massimo 1 hr a 2–8°C.
3. Pipettare 45 µl della miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
4. Aggiungere 5 µl di estratto di DNA, reagente D (controllo negativo) e reagente E (controllo positivo) o standard di quantificazione. Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra o le strip. È importante pipettare con attenzione al fine di evitare la formazione di bolle sul fondo dei pozzetti. Come passaggio facoltativo per eliminare eventuali bolle, centrifugare la piastra PCR o le strip PCR sigillate (centrifuga rapida).

5. Posizionare la piastra o le strip nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro. Chiudere il modulo di reazione.

Eeguire la PCR

Per avviare il ciclo PCR, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del sistema PCR real-time per i kit iQ-Check.

1. Definire il setup delle piastre nel software CFX Manager Industrial Diagnostic Edition (IDE).
2. Per quanto riguarda i kit iQ-Check *Legionella* Screen, i campioni e i controlli vengono testati singolarmente.
3. Per quanto riguarda i kit iQ-Check *Legionella* Quanti, i campioni, i controlli e gli standard di quantificazione vengono testati in duplicato. Indicare il valore quantitativo per ciascuno standard e per il materiale di riferimento. Tale valore è presente sulla scheda di calibrazione in ciascuna confezione degli standard di quantificazione iQ-Check *Legionella* e sul certificato di analisi per ogni lotto di prodotto.

Nota: Per i dosaggi di quantificazione, la curva di calibrazione generata da un lotto può essere salvata e riutilizzata fino al termine di tale lotto. L'opzione "Use reduced set of QS if possible" (Utilizzare un set ridotto di QS, se possibile) deve essere attivata prima del ciclo di PCR. Al termine del ciclo, selezionare "Tools" (Strumenti), quindi cliccare su "Save Standard Curve" (Salvare curva standard) per salvare la curva. In seguito, occorre eseguire, in duplicato, un singolo punto dell'intervallo di calibrazione in ciascuna analisi per verificare la conformità.

4. Selezionare il corretto protocollo termico, "Legio. spp." o "Legio. pneumo.", per i kit qualitativi (Screen) o quantitativi (Quanti) e fare clic su Ciclo.

D. Analisi dei dati

È possibile analizzare i dati direttamente al termine del ciclo PCR o in un secondo momento tramite l'apertura del file di dati memorizzato. Per aprire i file di dati e impostare i parametri dell'analisi, seguire le istruzioni contenute nel manuale d'uso del software CFX Manager IDE.

Calcolo della frazione analizzata del campione (fattore Z)

Qualsiasi metodo di analisi che comprenda una fase di estrazione seguita da una fase di rilevazione deve essere corredata dal calcolo della frazione del campione processato che è stato effettivamente analizzato durante la rilevazione finale. Tale valore viene tenuto in considerazione nel calcolo del limite di rilevazione e del limite di quantificazione del metodo generale ed è utilizzato per fornire il risultato finale in un test quantitativo. Per farlo, calcolare la frazione rimanente in relazione al campione iniziale in ciascuna fase del protocollo (concentrazione, eliminazione, ecc.). Il fattore Z corrisponde al denominatore della frazione analizzata ed è specifico per ciascun protocollo di estrazione. Z rappresenta il valore F/V indicato nella tabella dell'espressione dei risultati nelle norme ISO/TS 12869 e AFNOR T90-471

Il software CFX Manager, IDE calcola automaticamente il fattore Z (Z_2 e Z_3). Z_1 deve essere modificato dall'utente all'interno del software se il volume filtrato è diverso da 1 L.

1. Quando 1 L di acqua viene campionato e 5 μ l di DNA sono analizzati mediante PCR, il valore Z del protocollo Aquadien e del protocollo breve Aquadien è pari a 32.

Viene calcolato nel seguente modo:

- Fase di filtrazione del campione: 1.000 ml di acqua vengono filtrati dai 1.000 ml campionati. La frazione filtrata è 1/1, quindi $Z_1 = 1$
- Fase di estrazione e purificazione del DNA:
 - Protocollo Aquadien = 1 ml di surnatante R1 viene filtrato attraverso la colonna su 1,6 ml generati. La frazione purificata è 1 da 1,6, quindi $Z_2 = 1,6$.
 - Protocollo Aquadien breve = 500 µl di surnatante R1 vengono filtrati attraverso la colonna su 800 µl generati. La frazione purificata è 500 µl da 800 µl, quindi $Z_2 = 1,6$.
- Fase di analisi di PCR: 5 µl vengono analizzati mediante PCR dai 100 µl di DNA estratto. La frazione analizzata è $5/100 = 1/20$, quindi $Z_3 = 20$

Il fattore Z totale per il protocollo Aquadien è $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,6 \times 20 = 32$.

I risultati non elaborati della PCR devono essere moltiplicati per 32, al fine di ottenere la quantità finale di batteri contenuti nel campione iniziale di acqua, espresso in unità genomiche (UG) per litro di campione di acqua. Se è diverso da 1 L, il volume dell'acqua filtrata deve essere acquisito in questi calcoli.

2. Quando 1 L di acqua viene campionato e 5 µl di DNA sono analizzati mediante PCR, il valore Z del protocollo Aquadien per i campioni con sporcizia/ostruzioni e del protocollo breve Aquadien per la stessa tipologia di campioni è pari a 36.

Viene calcolato nel seguente modo:

- Fase di filtrazione del campione: 1.000 ml di acqua vengono filtrati dai 1.000 ml campionati. La frazione filtrata è 1/1, quindi $Z_1 = 1$
- Fase di estrazione e purificazione del DNA:
 - Protocollo Aquadien = 1 ml di surnatante R1 viene filtrato attraverso la colonna su 1,8 ml generati (1,6 ml di R1 + 0,2 ml di W2). La frazione purificata è 1 da 1,8, quindi $Z_2 = 1,8$.
 - Protocollo Aquadien breve = 500 µl di surnatante R1 vengono filtrati attraverso la colonna su 900 µl generati (800 µl di R1 + 100 µl di W2). La frazione purificata è 500 µl da 900 µl, quindi $Z_2 = 1,8$.
- Fase di analisi di PCR: 5 µl vengono analizzati mediante PCR dai 100 µl di DNA estratto. La frazione analizzata è $5/100 = 1/20$, quindi $Z_3 = 20$.

Il fattore Z totale per il protocollo Aquadien per i campioni con sporcizia/ostruzioni è:
 $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36$.

I risultati non elaborati della PCR devono essere moltiplicati per 36, al fine di ottenere la quantità finale di batteri contenuti nel campione iniziale di acqua, espresso in GU per litro di campione di acqua. Se è diverso da 1 L, il volume dell'acqua filtrata deve essere acquisito in questi calcoli.

3. Quando 1 L di acqua viene campionato e 5 µl di DNA sono analizzati mediante PCR, il valore Z del protocollo FDRS Aquadien è 36.

Viene calcolato nel seguente modo:

- Fase di filtrazione del campione: 1.000 ml di acqua vengono filtrati dai 1.000 ml campionati. La frazione filtrata è 1/1, quindi $Z_1 = 1$

- Fase di estrazione e purificazione del DNA: 500 µl di surnatante vengono filtrati attraverso la colonna a partire dai 900 µl iniziali (460 µl di acqua e 40 µl con 400 ml di R1). La frazione purificata è 900/500, quindi $Z_2 = 1,8$.
- Fase di analisi di PCR: 5 µl vengono analizzati mediante PCR dai 100 µl di DNA estratto. La frazione analizzata è $5/100 = 1/20$, quindi $Z_3 = 20$.

Il fattore Z totale del protocollo FDRS Aquadien è:

$$Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36.$$

I risultati non elaborati della PCR devono essere moltiplicati per 36, al fine di ottenere la quantità finale di batteri contenuti nel campione iniziale di acqua, espresso in UG per litro di campione di acqua. Se è diverso da 1 L, il volume dell'acqua filtrata deve essere acquisito in questi calcoli.

Interpretazione dei risultati - iQ-Check Screen *Legionella*

Dopo aver impostato i parametri dell'analisi dati, i risultati vengono interpretati analizzando i valori Cq di ogni campione (il ciclo nel quale la curva di amplificazione supera la soglia).

Il software CFX Manager IDE consente l'analisi interamente automatizzata dei sistemi di rilevazione Bio-Rad mediante PCR real-time.

Controlli

Prima di interpretare i risultati dei campioni, verificare i controlli positivi e negativi.

Perché l'esperimento sia valido, i controlli devono rispettare i risultati seguenti, come riepilogato nella tabella sottostante. In caso contrario, la reazione PCR deve essere ripetuta.

	Rilevazione della <i>Legionella</i> (Canale FAM)	Rilevazione controllo interno (Canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Controllo positivo	$30 \leq Cq \leq 40$	N/A

* Il software indica un valore Cq (il ciclo nel quale la curva di amplificazione supera la soglia) di N/A (non applicabile) quando la fluorescenza di un campione non aumenta in maniera significativa sopra il rumore di fondo non superando quindi la soglia.

Se i risultati dei controlli positivo e negativo differiscono da quelli indicati nella tabella sopra riportata (controllo non valido), ripetere il ciclo e l'analisi a partire dal paragrafo C. PCR real-time, Installazione strumento e software, nel protocollo della Sezione 7.

Campioni

L'interpretazione dei risultati del campione viene riepilogata nella tabella seguente:

Rilevazione della <i>Legionella</i> (Canale FAM)	Rilevazione controllo interno (Canale HEX)	Interpretazione
$Cq \geq 10$	N/A	Positivo
$Cq > \text{Valore dell'intercetta}^1$	$28 \leq Cq \leq 40$	Negativo
$Cq = \text{N/A}$	$Cq = \text{N/A}$	Inibizione ²
$Cq = \text{N/A}$	$Cq > 40$	Inibizione
$Cq = \text{N/A}$	$Cq < 28$	Problema analitico ³

¹ Il valore dell'intercetta da considerare nel contesto di un'analisi qualitativa è $Cq = 43$ (tale valore viene utilizzato per fornire un'indicazione del valore dell'intercetta scelto durante la validazione). Un valore dell'intercetta può essere determinato facendo la media dei valori dell'intercetta ottenuti e aggiungendo due deviazioni standard.

² Qualora la rilevazione produca un valore $Cq = \text{N/A}$ sia per il campione sia per il controllo interno, il campione deve essere diluito 1:10 nel buffer di eluizione per l'estrazione del DNA e testato nuovamente.

³ Verificare che la soglia sia posizionata correttamente o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non presenta una forma caratteristica, ripetere il test PCR.

È possibile fornire un'interpretazione non valida quando i criteri di validazione non vengono soddisfatti. Controllare i dati non elaborati e procedere come se il campione fosse inibito.

Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione della fase di PCR (Ld PCR) per un metodo di rilevazione e quantificazione della *Legionella* tramite PCR è definito come il numero più piccolo di UG che produce un risultato positivo alla soglia di confidenza del 90%

(NF T90-471). Il limite di rilevazione della fase di PCR (Ld PCR) è pari a 5 UG per 5 µl di DNA estratto. Per calcolare il limite di rilevazione teorico del metodo complessivo (Ld) per un campione da 1 L, occorre prendere in considerazione il fattore Z. Il valore di Ld teorico per il metodo complessivo prende in considerazione un risultato di filtrazione ed estrazione pari al 100%.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Z = frazione del campione depositato in ciascun pozzetto PCR

D = fattore di diluizione se il DNA è stato diluito prima del ciclo PCR

Interpretazione dei risultati - iQ-Check Quanti *Legionella*

Verificare che la curva dei dati non elaborati presenti un'amplificazione regolare (linea di base piatta seguita da un aumento esponenziale della fluorescenza e infine da un secondo appiattimento). Prima di procedere con la lettura della quantità media di UG calcolata per ciascun campione, verificare la validità delle serie di standard di quantificazione e dei controlli.

Controlli e standard

Prima di interpretare i risultati dei campioni, verificare i controlli e gli standard.

Perché l'esperimento sia valido, i controlli e gli standard devono rispettare i risultati seguenti, come riepilogato nella tabella sottostante. In caso contrario, la reazione PCR deve essere ripetuta.

	Rilevazione della <i>Legionella</i> (Canale FAM)	Rilevazione controllo interno (Canale HEX)
Controllo negativo	$Cq = N/A^*$	$28 \leq Cq \leq 40$
Efficienza della PCR	$75\% \leq \text{efficienza della PCR} \leq 125\%$	N/A
Coefficiente di correlazione (r^2)	$\geq 0,99$	N/A
Qs1–Qs4	$20 \leq Cq \leq 40$	$28 \leq Cq \leq 40$

* Il software indica un valore Cq (il ciclo nel quale la curva di amplificazione supera la soglia) di N/A (non applicabile) quando la fluorescenza di un campione non aumenta in maniera significativa sopra il rumore di fondo non superando quindi la soglia.

Se uno degli standard di quantificazione si trova significativamente al di fuori della curva standard, può essere eliminato per ottimizzare i risultati e raggiungere i parametri sopra indicati. È possibile eliminare una sola replica di standard. Il materiale di riferimento deve seguire i requisiti delle norme NF T90-471 e ISO/TS 12869. Se i risultati degli standard e dei controlli negativi differiscono da quelli indicati sopra, ripetere il test PCR.

Campioni

L'interpretazione dei risultati del campione viene riepilogata nella tabella seguente:

Rilevazione della <i>Legionella</i> (Canale FAM)	Rilevazione controllo interno (Canale HEX)	Interpretazione
$Cq \geq 10$	N/A	Positivo
$Cq \geq 10$	$Cq \leq \text{Valore medio } Cq \text{ } Qs + 3\sigma^1$	Positivo
$Cq \geq 10$	$Cq > \text{Valore medio } Cq \text{ } Qs + 3\sigma$	Inibizione ²
$Cq = N/A$	$\text{Valore medio } Cq \text{ } Qs - 3\sigma \leq Cq \leq \text{Valore medio } Cq \text{ } Qs + 3\sigma$	Negativo
$Cq = N/A$	N/A	Inibizione
$Cq = N/A$	$Cq > \text{Valore medio } Cq \text{ } Qs + 3\sigma$	Inibizione
$Cq = N/A$	$Cq < \text{Valore medio } Cq \text{ } Qs - 3\sigma$	Problema analitico ³

¹Il Valore medio Cq Qs corrisponde alla media dei valori HEX Cq per tutti i valori Qs; σ rappresenta la deviazione standard.

² Qualora la rilevazione produca un valore Cq = N/A sia per il campione sia per il controllo interno, il campione deve essere diluito 1:10 nel buffer di eluizione per l'estrazione del DNA e testato nuovamente.

³ Verificare che la soglia sia posizionata correttamente o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non presenta una forma caratteristica, ripetere il test PCR.

Se un campione presenta una concentrazione molto alta di *Legionella* ($C_{qFAM} < C_{qFAM} Qs4$), il suo C_{qHEX} potrebbe essere più alto del C_{qHEX} del $Qs4$. Tale campione si trova al di fuori del range dinamico di quantificazione. Se è richiesta una quantificazione precisa, diluire il campione e ripetere la PCR.

Un pozzetto con un valore $C_q >$ rispetto al valore dell'intercetta b e privo di inibizione non è considerato positivo.

Se per un campione uno dei risultati della PCR è positivo e l'altro negativo, il campione è considerato positivo.

Calcolo della concentrazione di *Legionella*

I valori indicati nel report per ciascun campione corrispondono alla quantità iniziale di UG di *Legionella* presenti in 5 µl di estratto di DNA. Per ottenere la concentrazione di *Legionella* in UG/1 L di campione di acqua, tenere conto del valore medio di quantificazione ("UG media/pozzetto") calcolato dal software per ciascuno dei campioni.

$$X = \frac{[\text{Mean quantity in 5 } \mu\text{l}] \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

X = UG di *Legionella* contenuta in 1 L di campione di acqua
Z = frazione del campione depositato in ciascun pozzetto PCR
D = fattore di diluizione se il DNA è stato diluito prima del ciclo PCR

Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione della fase di PCR (L_d PCR) per un metodo di rilevazione e quantificazione della *Legionella* tramite PCR è definito come il numero più piccolo di UG che produce un risultato positivo alla soglia di confidenza del 90% (NF T90-471). Il limite di rilevazione della fase di PCR (L_d PCR) è pari a 5 UG per 5 µl di DNA estratto. Per calcolare il limite di rilevazione teorico del metodo complessivo (L_d) per un campione da 1 L, occorre prendere in considerazione il fattore Z diviso per 2, poiché i campioni vengono testati in duplicato. Il valore di L_d teorico per il metodo complessivo prende in considerazione un risultato di filtrazione ed estrazione pari al 100%.

$$L_d = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L) } \times 2}$$

Z = frazione del campione depositato in ciascun pozzetto PCR
D = fattore di diluizione se il DNA è stato diluito prima del ciclo PCR

Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione della fase di PCR (L_q PCR) di un metodo di quantificazione della *Legionella* tramite PCR è definito come il numero minimo di copie necessario per consentire la ripetibilità e la precisione di quantificazione descritte nella norma NF T90-471. $Qs1$, il primo punto sullo standard di quantificazione, corrisponde al limite di quantificazione per ciascun lotto di iQ-Check Quanti *Legionella*.

Il valore esatto del Qs1 per ciascun lotto di standard di quantificazione è indicato sulla scheda di calibrazione e sul certificato di analisi.

$$Lq = Qs1 \times Z$$

Se viene filtrato un volume di acqua diverso da 1 L o se l'estratto di DNA deve essere diluito, il valore Lq per il metodo cambia.

$$Ld = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Limite superiore di quantificazione

Il limite superiore di quantificazione (Upper quantification limit, UQL) del metodo corrisponde al valore (per 1 L) dato dal punto più alto degli standard di quantificazione, cioè lo standard Qs4. Il valore esatto del Qs4 per ciascun lotto di standard di quantificazione è indicato sulla scheda di calibrazione e sul certificato di analisi. Per ottenere il valore UQL del metodo, occorre moltiplicare il valore dello standard Qs4 per la frazione del campione analizzato Z e per il fattore di diluizione D.

$$UQL = \frac{Qs4 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Espressione dei risultati

Il risultato finale è espresso in UG/L con 2 cifre significative (ad esempio, 1.300 GU/L per una concentrazione calcolata di 1.256 UG/L).

Unità genomiche/ pozzetto PCR	Interpretazione	Conclusione
<5	<Ld	Target non rilevato al limite di rilevazione
[5, Qs1]	<Lq	Target presente ma non quantificabile
[Qs1–Qs4]	X	Target presente e quantificabile
> Qs4	UQL	Forte presenta del target*

* Al di fuori del range dinamico di quantificazione. Se è richiesta una quantificazione precisa, diluire il campione e ripetere la PCR.

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

Fare riferimento ai regolamenti locali.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

I kit iQ-Check *Legionella* possono essere utilizzati anche per la conferma di singole colonie isolate di *Legionella* su piastre di agar GVPC o BCYE.

1. Prelevare una colonia isolata servendosi di uno stuzzicandenti, di un'ansa sterile o altri prodotti di consumo adattati (ad esempio, un puntale per pipetta).
2. Risospendere la colonia in 200 µl di acqua priva di DNA di *Legionella* in una provetta per microcentrifuga. Miscelare nel vortex per 20 sec.
3. Dividere la sospensione in due aliquote da 100 µl (provetta 1 e provetta 2).
4. Incubare la provetta 1 a 95 °C per 10 min. Utilizzare 5 µl della sospensione con 45 µl di miscela PCR (vedere il paragrafo C. PCR real-time, nel protocollo della Sezione 7) per eseguire la PCR.
5. Se $C_q >$ rispetto al valore dell'intercetta, il risultato è negativo e la colonia non può essere né confermata né identificata.
6. Se $C_q < 30$, il risultato è positivo e la colonia viene confermata e identificata. In questo caso, se la PCR deve essere ripetuta, conservare la provetta 1 con il DNA estratto a -20 °C per un massimo di 3 mesi. Conservare inoltre la provetta 2 a 4 °C per un'eventuale coltura.
7. Se la PCR è inibita, diluire l'estratto di DNA contenuto nella provetta 1 in acqua sterile priva di DNA di *Legionella* (1:100) e ripetere la PCR.
8. Se $30 < C_q <$ rispetto al valore dell'intercetta, confermare il risultato positivo con un altro metodo o ripetere il protocollo con un'altra colonia isolata.

Sezione 10 Performance del test e validazioni



BRD 07/15 – 12/07
BRD 07/16 – 12/07

METHOD FOR WATER
ANALYSIS

<http://nf-validation.afnor.org>

Validazione NF

Il kit Aquadien per l'estrazione e la purificazione del DNA viene impiegato nell'ambito di applicazione dei metodi iQ-Check *Legionella* spp. e *L. pneumophila* certificati dalla validazione NF in conformità al protocollo di validazione basato sulla norma NF T90-471 (giugno 2015) per la rilevazione e la quantificazione della *Legionella* spp. o della *L. pneumophila* mediante i kit iQ-Check Real-Time PCR. L'ambito della validazione è stato esteso alla norma ISO/TS 12869 (aprile 2019): Water quality – Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *L. pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Numero di certificato: iQ-Check *Legionella* spp. BRD 07/15 – 12/07 e iQ-Check *L. pneumophila* BRD 07/16 – 12/07. Periodo di validità: Fare riferimento al certificato disponibile sul sito web di AFNOR.

Sezione 11 Riferimenti

AFNOR NF T90-471. Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification.

Engleberg NC et al. (1989). DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 57, 1263–1270.

ISO 11731. Qualità dell'acqua — Conteggio di *Legionella*.

ISO/TS 12869. Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

MacDonell MT e Colwell RR. (1987). The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res* 15, 1335.

NF T 90-431. Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* — Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration or centrifugation.

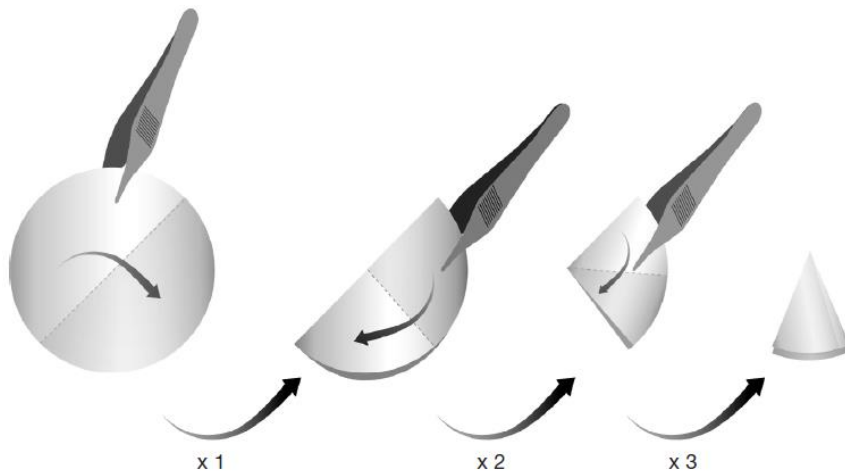
Specht T et al. (1986). Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res* 18 Suppl, 2215–2230.

Sezione 12

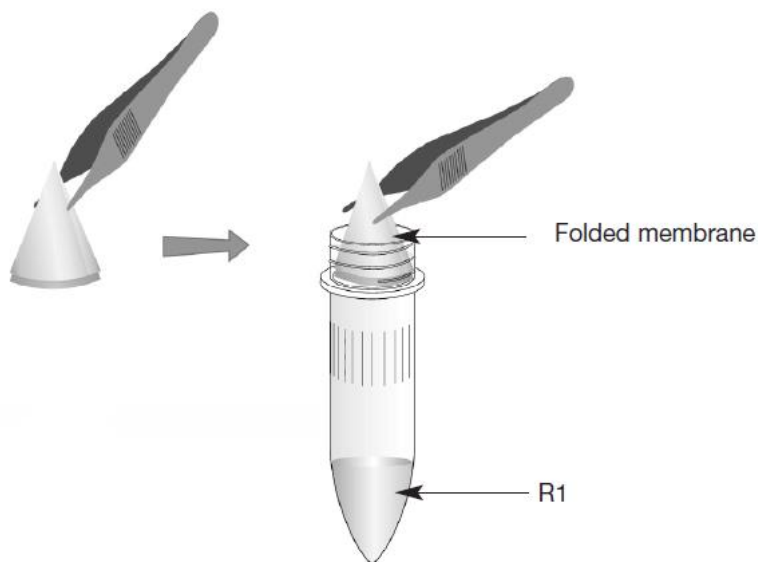
Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Ottobre 2020	10000134675 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nuova struttura del documento e aggiornamento di riferimenti e contenuto- Modifica del numero documento (le versioni precedenti erano la 881116 e la 881117)
Giugno 2023	10000134675 Ver B	<ul style="list-style-type: none">- Rinnovo ed estensione della validazione NF:<ul style="list-style-type: none">- Sistema PCR Real-Time CFX Opus 96- La curva di calibrazione generata da un lotto può essere salvata e riutilizzata al termine di tale lotto- Aggiornamento di riferimenti e contenuti

Appendice 1 - Istruzioni per piegare la membrana



Piegare attentamente la membrana a metà per tre volte per ottenere un cono.



Utilizzando le pinzette, collocare la membrana in una provetta contenente 1 ml di R1. La punta del cono formato dalla membrana deve trovarsi in direzione della sommità della provetta.

Appendice 2 - Istruzioni per calcolare la miscela di PCR

Al fine di trovare i volumi corretti da utilizzare per la preparazione della miscela di PCR, aggiungere il numero totale di campioni e controlli da analizzare e trovare i volumi corrispondenti del reagente B e del reagente C nella tabella.

Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela di amplificazione Reagente C, µl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela di amplificazione Reagente C, µl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela di amplificazione Reagente C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Per maggiori informazioni, visitare il sito bio-rad.com/legionella.

Bio-Rad è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.

AQUADIEN e IQ-CHECK sono marchi registrati di Bio-Rad Europe GMBH in determinate giurisdizioni.

Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



Aquadien DNA Extraction and Purification Kit
iQ-Check™ Screen *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

Guia do usuário

Testes para extração de DNA, purificação e detecção e quantificação por PCR em tempo real de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* em amostras de água

Nº do catálogo 3578121, Aquadien DNA Extraction and Purification Kit

Nº do catálogo 3578104, iQ-Check Screen *Legionella* spp. Kit

Nº do catálogo 3578102, iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit

Nº do catálogo 3578105, iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit

Nº do catálogo 3578103, iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução.....	1
Seção 2	Tecnologia iQ-Check <i>Legionella</i>	1
Seção 3	Componentes do Kit	2
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento.....	3
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	3
	Equipamento.....	3
	Suprimentos.....	3
Seção 6	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados	4
Seção 7	Protocolo.....	5
	A. Amostragem e Transporte.....	5
	B. Filtragem de Água e Extração de DNA	5
	C. PCR em Tempo Real	10
	D. Análise de dados	11
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos.....	18
Seção 9	Confirmação de Colônias Isoladas usando o Kit iQ-Check.....	18
Seção 10	Desempenho e validação do teste	18
Seção 11	Referências.....	19
Seção 12	Histórico de Revisão.....	19
	Apêndice 1 - Guia de dobra da membrana	20
	Apêndice 2 - Guia para o cálculo da mistura de PCR.....	21

Seção 1

Introdução

Legionella são bactérias gram-negativas presentes em todos os ambientes aquáticos. A infecção pode causar pneumonia aguda, Legionelose e uma forma mais branda de infecção pulmonar, a febre de Pontiac. Na Europa, o número de casos declarados de Legionelose aumenta 25% ao ano. Nos Estados Unidos, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças estimam o número de casos de Legionelose entre 10.000 e 20.000 por ano. A espécie *Legionella pneumophila* é responsável por aproximadamente 90% de todos os casos clínicos.

O controle regular da presença de *Legionella* nos sistemas de abastecimento de água como torres de resfriamento de ar condicionado, piscinas de spa, fontes, sistemas de água quente e fria, é a única forma de prevenir a doença. A detecção de *Legionella* é obrigatória ou fortemente recomendada na maioria dos países desenvolvidos. Métodos convencionais de cultura para detecção de *Legionella* spp. e *L. pneumophila* em amostras de água apresentam várias desvantagens, incluindo baixa sensibilidade e longos períodos de incubação (10–13 dias para amostras positivas).

O Kit Aquadien permite uma extração e purificação ideal de DNA de bactérias presentes em amostras de água para posterior detecção de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR). O princípio da extração é baseado na lise alcalina de bactérias na presença de choque térmico e na purificação do DNA por ultrafiltração.

Os kits iQ-Check *Legionella* spp. e iQ-Check *L. pneumophila* são formulados para detecção ou quantificação rápida de *Legionella* (spp. ou *pneumophila*) em amostras de água. A quantificação é possível com o uso dos Padrões de Quantificação de DNA iQ-Check *Legionella* calibrados na etapa de amplificação. Os resultados são obtidos em menos de 3 hr após a etapa de filtragem e extração de DNA.

Seção 2

Tecnologia iQ-Check *Legionella*

Os kits iQ-Check *Legionella* são testes baseados na amplificação e detecção de genes por PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso contêm iniciadores de DNA e uma sonda de DNA específica para *Legionella* spp. ou *L. pneumophila*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são otimizadas para uso com um instrumento de PCR em tempo real da Bio-Rad, como o sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus 96.

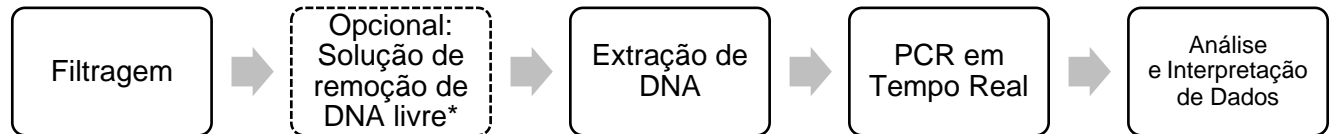
A PCR é uma poderosa técnica utilizada para gerar muitas cópias do DNA alvo. Durante a reação de PCR, vários ciclos de aquecimento e resfriamento desnaturam o DNA. Os primers então se anelam na região alvo, onde a DNA polimerase usa os primers e os desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) para estender o DNA, criando cópias do DNA alvo. Essas cópias se chamam amplicons.

Na PCR em tempo real, sondas específicas detectam o DNA durante a amplificação por hibridação dos amplicons. Estas sondas estão ligadas a um fluoróforo, que apresenta fluorescência apenas quando hibridizado à sequência-alvo. FAM é o fluoróforo ligado à sonda neste kit que se hibridiza com a sequência de DNA específica de *Legionella* spp.– ou *L. pneumophila*. Na ausência de DNA-alvo, não será observada fluorescência. Como o número de amplicons aumenta em cada rodada de amplificação, a intensidade da fluorescência aumenta também. Na fase de hibridação (annealing) de cada ciclo de PCR, o módulo óptico ou detector mede essa fluorescência. O software associado ao instrumento plota a intensidade da fluorescência em relação ao número de ciclos. Este método permite a determinação simples da presença ou ausência de *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* em uma amostra.

Seção 3 Componentes do Kit

Um controle interno de DNA sintético é incluído na mistura da reação. Este controle é amplificado com uma sonda específica ao mesmo tempo que a sequência de DNA alvo de *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* e é detectada por um segundo fluoróforo (HEX). Isso permite a validação de qualquer resultado negativo.

Os kits iQ-Check podem detectar ou quantificar *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* em amostras de água em quatro etapas principais:



* Consulte o guia do usuário da solução de remoção de DNA iQ-Check Free (#10000058391) para as condições de uso.

Seção 3 Componentes do Kit

O Kit Aquadien DNA Extraction and Purification contém reagentes suficientes para 96 testes (94 amostras).

ID do Reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
R1	Solução de lise	2 frascos, 100
R2	Tampão de eluição	1 tubo, 25
	Criotubo (4,5 ml)	100 tubos
	Coluna de purificação	96 colunas
	Ampolas de coletor	192 ampolas

Os Kits iQ-Check Screen *Legionella* spp. e *L. pneumophila* contêm reagentes suficientes para 96 testes (94 amostras). Os Kits Quanti *Legionella* spp. e *L. pneumophila* adicionalmente contêm padrões de quantificação suficientes para quantificar até 43 amostras.

ID do Reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mistura de amplificação	1 tubo, 4,4
D	Controle de PCR negativo	1 tubo, 0,5
E	Controle de PCR positivo	1 tubo, 0,25
Qs1	PCR padrão 1	1 tubo, 0,08 (tampa branca)
Qs2	PCR padrão 2	1 tubo, 0,08 (tampa amarela)
Qs3	PCR padrão 3	1 tubo, 0,08 (tampa laranja)
Qs4	PCR padrão 4	1 tubo, 0,08 (tampa vermelha)
	Material de referência ¹	1 tubo, 0,08 (tampa azul)
	Cartão de calibração	1 cartão

¹ O material de referência contém DNA calibrado conectado ao material de referência padrão, independente dos padrões de quantificação.

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

Uma vez recebido, o kit deve ser armazenado a 2–8 °C. Os reagentes armazenados a esta temperatura podem ser utilizados até o prazo de validade indicado nos tubos. Não congelar os reagentes.

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Bico de Bunsen
- Dispositivo de filtragem montado em uma bomba de ar ou frasco de vácuo
- Gabinete de biossegurança - Classe II
- Banho-maria, de preferência com tampa, capaz de manter $95 \pm 5^\circ\text{C}$
- Agitador
- Placa de agitação magnética
- Termoventilador de aquecimento* capaz de manter 95°C , com uma velocidade de mistura de 1.300 rpm
- Centrífuga com rotor de ângulo fixo, de preferência refrigerada
 - Capaz de conter tubos de 1,5-2,0 ml com capacidade de rotação de 6.000 x g
 - Capaz de conter tubos de 1,5-2,0 ml com uma capacidade de rotação de 12.000 x g para amostras de água suja/ com coágulos
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000 μl
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad;* por exemplo, CFX96 Touch Deep Well System (nº do catálogo 3600037) ou CFX Opus Deepwell (nº do catálogo 17007992)

Nota: Recomendamos o uso de uma fonte de alimentação ininterrupta (UPS) com o termociclador e os sistemas iQ-Check Prep System.

* Entre em contato com o suporte técnico da Bio-Rad para obter informações sobre os instrumentos recomendados.

Suprimentos

- Aquadien Reagent W2, 5 ml, para amostras de água suja/com coágulos (nº do catálogo 3578119)
- Aquadien Lysis Solution R1, 100 ml (nº do catálogo 3578125)
- *Legionella* DNA Free Water, 1 L (nº do catálogo 12006823)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- Filtro de membrana de policarbonato, porosidade de 0,45 μm

Seção 6 Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Funil estéril descartável, 250 ml
- Pinça metálica de inox estéril com pontas arredondadas
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Tubos estéreis, 2 ml
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Luvas sem talco
- Máscara respiratória descartável
- Alvejante, 5%
- Álcool, 70%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

Seção 6

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- As amostras de água devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, as normas ISO 8199 e ISO/TS 12869), especialmente em relação ao PCR:
 - Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Descontamine com álcool o pequeno material de laboratório usado para a filtração (por exemplo, as pinças de metal) após cada extração e esterilize queimando no bico de Bunsen
 - Certifique-se de que as pinças não estão quentes antes de usar
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Um controle negativo deve ser usado durante a extração de DNA
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos

- Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
- Limpe os espaços de trabalho periodicamente com alvejante 5% e enxágue com Água Livre de DNA de *Legionella* e álcool 70% ou com outros agentes descontaminantes, como o DNA AWAY
- Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem com a aquisição de dados
- Para a quantificação, é necessário testar cada amostra, controle e todos os padrões de quantificação em duplicata. O material de referência deve ser testado de acordo com os padrões NF T90-471 e ISO/TS 12869. Não misture padrões de quantificação de lotes diferentes

Seção 7

Protocolo

É altamente recomendável ler o protocolo inteiro antes de iniciar o teste.

A. Amostragem e Transporte

As amostras de água devem ser coletadas de acordo com os padrões gerais para detecção e contagem de bactérias (NF T90-471 e ISO/TS 12869). A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das boas práticas de amostragem de água para análises microbiológicas (por exemplo, a norma ISO 19458), especialmente no que diz respeito à PCR.

B. Filtragem de Água e Extração de DNA

Recomendações gerais

- Ligue o banho-maria e/ou o agitador térmico de aquecimento e ajuste-o para $95 \pm 5^\circ\text{C}$. Verifique o nível do banho-maria para submersão adequada dos criotubos de 4,5 ml
- Prepare o número de tubos correspondente ao número de amostras para extração de DNA. Pipete x ml de R1 em cada tubo, dependendo do protocolo escolhido.

Nota: Pipete R1 agitando em velocidade média em uma placa de agitação para manter a resina em suspensão. Use uma ponta de pipeta com uma abertura larga (por exemplo, use uma pipeta de 1000 µl com a ponta correspondente).

- Prepare o número de colunas de purificação necessárias, colocando uma coluna em cada ampola coletora

Filtragem de água

1. Enxágue a rampa de filtragem com 100 ml de *Legionella* DNA Free Water e depois descontamine a rampa queimando com álcool. Certifique-se de que a rampa esteja seca e fria antes de posicionar o filtro de membrana. Esta operação deve ser repetida após cada amostra filtrada para evitar contaminação por DNA ou bactéria entre as filtragens da amostra.
2. Coloque o filtro de membrana no aparelho de filtragem. Coloque os funis estéreis.
3. Filtre 100 ml - 1 L de amostra de água sobre o filtro de membrana.

Extração e purificação de DNA Aquadien

1. Dobre cuidadosamente a membrana ao meio três vezes para obter um cone (consulte o Apêndice 1).
2. Usando uma pinça, coloque a membrana em um criotubo contendo 2 ml de R1. A ponta do cone formado pela membrana deve ser posicionada em direção ao topo do criotubo.
3. Agite por 20 sec.

Nota: Verifique se a membrana ainda está totalmente imersa na solução R1.

4. Deixe incubar em banho-maria coberto a $95 \pm 5^\circ\text{C}$ por 15 min.
5. Agite por 20 sec.
6. Usando uma ponta de pipeta filtrada estéril de 1 ml, remova cuidadosamente a membrana, pressionando-a contra a parede do criotubo para recuperar todo o lisado. Jogue fora a membrana.
7. Deixe os criotubos em temperatura ambiente por 20 min. A resina da solução R1 se aglomerará no fundo do criotubo. O sobrenadante contém 1,6 ml de DNA extraído. Também é possível centrifugar os criotubos a $900 \times g$ por 3 min em uma centrífuga adaptada para tubos de 4,5 ml. Certifique-se de que os tubos estão em temperatura ambiente antes de iniciar a etapa de purificação.
8. Transfira 500 μl do sobrenadante para uma coluna de purificação. Não agite o lisado antes da coleta.
9. Vede cada coluna com a tampa da ampola coletora.

Nota: Não pipete o sedimento de resina. Se isso ocorrer, espere 5 min para que a resina sedimente novamente ou centrifugue a $900 \times g$ por 3 min.

10. Centrifugue a $6.000 \times g$ por 10 min. Se a temperatura da centrífuga for programável, defina para 20°C .

Nota: Se ocorrer entupimento da coluna de purificação, aumente o tempo de centrifugação sem aumentar a velocidade de centrifugação.

11. Jogue fora o líquido contido na ampola coletora.
12. Repita a etapa 8 pipetando 500 μl adicionais do sobrenadante na mesma coluna de purificação e sele com a tampa do coletor.
13. Centrifugue a $6.000 \times g$ por 10 min. Se a temperatura da centrífuga for programável, defina para 20°C .

Nota: Se ocorrer entupimento da coluna de purificação, aumente o tempo de centrifugação sem aumentar a velocidade de centrifugação. Verifique se todo o sobrenadante é filtrado pela coluna. Caso contrário, centrifugue novamente. Se o entupimento ainda ocorrer após uma segunda centrifugação, siga o protocolo para amostras de água suja/com coágulos abaixo.

14. Adicione 100 μl de solução R2 na coluna de purificação.
15. Jogue fora a ampola coletora. Cubra a coluna de purificação com uma nova ampola coletora limpa e vire toda a unidade de cabeça para baixo.
16. Centrifugue a $1.000 \times g$ por 3 min. Se a temperatura da centrífuga for programável, defina para 20°C . Jogue fora a coluna de purificação.

Nota: Nesta etapa, a tampa não pode ser fechada.

17. Armazene a ampola coletora contendo 100 µl de solução de DNA purificado. Use 5 µl da solução de DNA para cada reação de PCR em tempo real. A solução de DNA pode ser armazenada por vários meses a -20°C. O cálculo do fator Z ($Z = 32$) é detalhado na Seção 7 Protocolo, D. Análise de Dados, Cálculo da Fração Analisada da Amostra.

Extração e purificação de DNA Aquadien - protocolo abreviado

1. Dobre cuidadosamente a membrana ao meio três vezes para obter um cone (consulte o Apêndice 1).
2. Usando uma pinça, coloque a membrana em um tubo contendo 1 ml de R1. A ponta do cone formado pela membrana deve ser posicionada em direção ao topo do tubo.
3. Deixe incubar a 95°C por 15 min a 1.300 rpm em um agitador térmico de aquecimento.
4. Retire a membrana com cuidado, pressionando-a contra a parede do tubo para recuperar todo o lisado. Jogue fora a membrana.
5. Centrifugue a 900 x g por 3 min.
6. Transfira 500 µl do sobrenadante para uma coluna de purificação. Não agite o lisado antes da coleta.
7. Vede cada coluna com a tampa da ampola coletora.

Nota: Não pipete o sedimento de resina. Se isso ocorrer, espere 5 min para que a resina sedimente novamente ou centrifugue a 900 x g por 3 min.

8. Centrifugue a 6.000 x g por 10 min. Se a temperatura da centrífuga for programável, defina para 20°C.

Nota: Se ocorrer entupimento da coluna de purificação, aumente o tempo de centrifugação sem aumentar a velocidade de centrifugação.

9. Adicione 100 µl de solução R2 na coluna de purificação.
10. Jogue fora a ampola coletora. Cubra a coluna de purificação com uma nova ampola coletora limpa e vire toda a unidade de cabeça para baixo.
11. Centrifugue a 1.000 x g por 3 min. Se a temperatura da centrífuga for programável, defina para 20°C. Jogue fora a coluna de purificação.

Nota: Nesta etapa, a tampa não pode ser fechada.

12. Armazene a ampola coletora contendo 100 µl de solução de DNA purificado. Use 5 µl da solução de DNA para cada reação de PCR em tempo real. A solução de DNA pode ser armazenada por vários meses a -20°C. O cálculo do fator Z ($Z = 32$) é detalhado na Seção 7 Protocolo, D. Análise de Dados, Cálculo da Fração Analisada da Amostra.

Extração e purificação de DNA Aquadien - amostras de água suja/ com coágulos

1. Dobre cuidadosamente a membrana ao meio três vezes para obter um cone (consulte o Apêndice 1).
2. Usando uma pinça, coloque a membrana no criotubo contendo 2 ml de R1. A ponta do cone formado pela membrana deve ser posicionada em direção ao topo do criotubo.

Seção 7 Protocolo

3. Agite 20 sec.

Nota: Verifique se a membrana ainda está totalmente submersa na solução R1.

4. Deixe incubar em banho-maria coberto a $95 \pm 5^\circ\text{C}$ por 15 min.

5. Agite 20 sec.

6. Usando uma ponta de pipeta filtrada estéril de 1 ml, remova cuidadosamente a membrana, pressionando-a contra a parede do criotubo para recuperar todo o lisado. Jogue fora a membrana.

7. Transfira a amostra, incluindo a resina, para um novo tubo de 2 ml. Jogue fora o criotubo. O lisado pode ser armazenado a $2-8^\circ\text{C}$ por 24-72 hr.

8. Adicione 200 μl de tampão W2 frio (4°C). Agite 5 sec.

9. Deixe o tubo descansar em uma geladeira a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 min

10. Centrifugue a 12.000 x g em 4°C por 15 min.

11. Transfira 500 μl do sobrenadante para uma coluna de purificação. Não agite o lisado antes da coleta. Vede cada coluna com a tampa da ampola coletora.

Nota: Não pipete o sedimento de resina. Se isso ocorrer, espere 5 min para que a resina sedimente novamente ou centrifugue a 900 x g por 3 min.

12. Centrifugue a 6.000 x g em 20°C por 10 min.

Nota: Se ocorrer entupimento da coluna de purificação, aumente o tempo de centrifugação sem aumentar a velocidade de centrifugação.

13. Jogue fora o líquido contido na ampola coletora.

14. Repita a etapa 11 pipetando 500 μl adicionais do sobrenadante na mesma coluna de purificação e sele com a tampa do coletor.

15. Centrifugue a 6.000 x g em 20°C por 10 min.

Nota: Se ocorrer entupimento da coluna de purificação, aumente o tempo de centrifugação sem aumentar a velocidade de centrifugação. Verifique se todo o sobrenadante é filtrado pela coluna. Caso contrário, centrifugue novamente.

16. Jogue fora o líquido contido na ampola coletora.

17. Adicione 250 μl de solução R2 na coluna de purificação.

18. Centrifugue a 6.000 x g em 20°C por 5 min.

19. Adicione 100 μl de solução R2 na coluna de purificação.

20. Jogue fora a ampola coletora e cubra a coluna de purificação com uma nova ampola coletora limpa e vire toda a unidade de cabeça para baixo.

21. Centrifugue a 1.000 x g em 20°C por 3 min. Jogue fora a coluna de purificação.

Nota: Nesta etapa, a tampa não pode ser fechada.

22. Armazene a ampola coletora contendo 100 µl de solução de DNA purificado. Use 5 µl da solução de DNA para cada reação de PCR em tempo real. A solução de DNA pode ser armazenada por vários meses a -20°C. O cálculo do fator Z ($Z = 36$) é detalhado na Seção 7 Protocolo, D. Análise de Dados, Cálculo da Fração Analisada da Amostra.

Extração e purificação de DNA Aquadien - amostras de água suja/com coágulos - protocolo abreviado

1. Dobre cuidadosamente a membrana ao meio três vezes para obter um cone (consulte o Apêndice 1).
2. Usando uma pinça, coloque a membrana em um tubo contendo 1 ml de R1. A ponta do cone formado pela membrana deve ser posicionada em direção ao topo do tubo.
3. Deixe incubar a 95°C por 15 min a 1.300 rpm em um agitador térmico.
4. Retire a membrana com cuidado, pressionando-a contra a parede do tubo para recuperar todo o lisado. Jogue fora a membrana.
5. Adicione 100 µl de tampão W2 frio (4°C). Agite 5 sec.
6. Deixe o tubo descansar em uma geladeira a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 min.
7. Centrifugue a 12.000 x g em 4°C por 15 min.
8. Transfira 500 µl do sobrenadante para uma coluna de purificação. Não agite o lisado antes da coleta. Vede cada coluna com a tampa da ampola coletora.

Nota: Não pipete o sedimento de resina. Se isso ocorrer, espere 5 min para que a resina sedimente novamente ou centrifugue a 900 x g por 3 min.

9. Centrifugue a 6.000 x g em 20°C por 10 min.

Nota: Se ocorrer entupimento da coluna de purificação, aumente o tempo de centrifugação sem aumentar a velocidade de centrifugação.

10. Adicione 125 µl de solução R2 na coluna de purificação.
11. Centrifugue a 6.000 x g em 20°C por 5 min.
12. Adicione 100 µl de solução R2 na coluna de purificação.
13. Jogue fora a ampola coletora e cubra a coluna de purificação com uma nova ampola coletora limpa e vire toda a unidade de cabeça para baixo.
14. Centrifugue a 1.000 x g em 20°C por 3 min. Jogue fora a coluna de purificação.

Nota: Nesta etapa, a tampa não pode ser fechada.

15. Armazene a ampola coletora contendo 100 µl de solução de DNA purificado. Use 5 µl da solução de DNA para cada reação de PCR em tempo real. A solução de DNA pode ser armazenada por vários meses a -20°C. O cálculo do fator Z ($Z = 36$) é detalhado na Seção 7 Protocolo, D. Análise de Dados, Cálculo da Fração Analisada da Amostra.

Extração e purificação de DNA Aquadien - tratamento com iQ-Check Free DNA Removal Solution (FDRS)

1. Dobre cuidadosamente a membrana ao meio três vezes para obter um cone (consulte o Apêndice 1).
 2. Usando uma pinça, coloque a membrana em um tubo contendo 460 µl de Água Livre de DNA de *Legionella* e FDRS ativado de 40 µl. A ponta do cone formado pela membrana deve ser posicionada em direção ao topo do tubo.
 3. Inverta o tubo várias vezes para homogeneizar. Não agite.
 4. Deixe incubar a 37°C por 30 min.
 5. Adicione 500 µl R1 para inativar o FDRS para extração de DNA.
 6. Agite por 10 sec.
 7. Deixe incubar a 95°C por 15 min a 1.300 rpm em um agitador térmico.
 8. Retire a membrana com cuidado, pressionando-a contra a parede do tubo para recuperar todo o lisado. Jogue fora a membrana.
 9. Centrifugue a 900 x g por 3 min.
 10. Transfira 500 µl do sobrenadante para uma coluna de purificação. Não agite o lisado antes da coleta.
 11. Centrifugue a 6.000 x g por 10 min.
 12. Adicione 100 µl de solução R2 e jogue fora a ampola coletora.
 13. Jogue fora a ampola coletora. Cubra a coluna de purificação com uma nova ampola coletora limpa e vire toda a unidade de cabeça para baixo.
 14. Centrifugue a 1.000 x g por 3 min. Se a temperatura da centrífuga for programável, defina para 20°C. Jogue fora a coluna de purificação.
- Nota:** Nesta etapa, a tampa não pode ser fechada.
15. Armazene a ampola coletora contendo 100 µl de solução de DNA purificado. Use 5 µl da solução de DNA para cada reação de PCR em tempo real. A solução de DNA pode ser armazenada por vários meses a -20°C. O cálculo do fator Z ($Z = 36$) é detalhado na Seção 7 Protocolo, D. Análise de Dados, Cálculo da Fração Analisada da Amostra.

C. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

Para a configuração do instrumento e do software, siga as instruções do guia do usuário do sistema PCR em tempo real para kits iQ-Check.

Preparação da mistura de PCR

1. Prepare a mistura de PCR contendo a solução de amplificação (reagente C) e as sondas fluorescentes (reagente B). O volume de mistura de PCR necessário depende do número de amostras e controles a serem analisados. Devem ser incluídos pelo menos um controle positivo e um controle negativo em cada execução da PCR. Use a tabela de pipetagem no Apêndice 2 para encontrar os volumes corretos a serem usados para cada reagente.

Nota: Para a quantificação, é necessário testar cada amostra, controle e todos os padrões de quantificação em duplicata. Não misture padrões de quantificação de lotes diferentes.

Nota: Ao executar o iQ-Check *Legionella* spp. e iQ-Check *L. pneumophila* na mesma placa, porque as misturas de amplificação são específicas para cada método, é necessário executar duas séries independentes de padrões de quantificação. Além disso, os resultados de cada um devem ser analisados separadamente.

2. Use a mistura de PCR (reagentes B + C) imediatamente após a preparação. Ela é estável por 1 hr no máximo a 2–8°C.
3. Pipete 45 µl da mistura de PCR para cada poço, de acordo com a configuração da placa.
4. Adicione 5 µl de extrato de DNA, reagente D (controle negativo) e reagente E (controle positivo) ou padrões de quantificação. Não agite a amostra em vortex antes da pipetagem. Vede hermeticamente os poços da placa ou das tiras. É importante evitar a formação de bolhas no fundo dos poços, o que é conseguido fazendo a pipetagem cuidadosamente. Como passo opcional para eliminar quaisquer bolhas, centrifugue a placa de PCR ou as tiras de PCR vedadas (centrifugação rápida).
5. Coloque a placa ou as tiras no termociclador. Certifique-se de colocar a placa com o poço A1 no canto superior esquerdo. Feche o módulo de reação.

Execute a PCR

Para iniciar a execução da PCR, siga as instruções do guia do usuário do sistema PCR em tempo real para os kits iQ-Check.

1. Defina a configuração da placa no software CFX Manager Industrial Diagnostic Edition (IDE).
2. Para os kits iQ-Check *Legionella* Screen, as amostras e os controles são testados individualmente.
3. Para kits iQ-Check *Legionella* Quanti, amostras, controles e padrões de quantificação são testados em duplicata. Indique o valor da quantidade para cada padrão e para o material de referência. Este valor é encontrado no cartão de calibração em cada caixa dos Padrões de Quantificação iQ-Check *Legionella* e no certificado de análise para cada lote de produto.

Nota: Para ensaios de quantificação, a curva de calibração gerada por um lote pode ser salva e reutilizada até o final desse lote. A opção “Use reduced set of QS if possible” (Usar o conjunto reduzido de QS se possível) precisa ser ativada antes da execução do PCR. Ao final da execução, selecione “Tools” (Ferramentas) e clique em “Save Standard Curve” (Salvar curva padrão) para salvar a curva. Posteriormente, um único ponto da faixa de calibração precisa ser executado, em duplicata, em cada análise para verificar a conformidade.

4. Selecione o protocolo térmico apropriado, “Legio. spp.” ou “Legio. pneumo.,” para kits qualitativos (Screen) ou kits quantitativos (Quanti) e clique em Executar.

D. Análise de dados

Os dados podem ser analisados diretamente no final da execução da PCR ou posteriormente, abrindo o arquivo de dados armazenados. Siga as instruções no manual do usuário do software CFX Manager IDE correspondente para abrir arquivos de dados e definir os parâmetros de análise de dados.

Cálculo da Fração Analisada da Amostra (Fator Z)

Qualquer método de análise que inclua uma etapa de extração seguida por uma etapa de detecção deve ser acompanhado por um cálculo da fração da amostra processada que foi realmente analisada durante a detecção final. Este valor é levado em consideração no cálculo do limite de detecção e do limite de quantificação do método geral e é usado para dar um resultado em um teste quantitativo. Para fazer isso, calcule a fração restante em relação à amostra inicial em cada etapa do protocolo (concentração, eliminação etc.). O fator Z corresponde ao denominador da fração analisada e é específico para cada protocolo de extração. Z representa o valor F/V expresso na tabela de expressão de resultado nos padrões ISO TS 12869 e AFNOR T90-471.

O CFX Manager Software, IDE calcula automaticamente o fator Z (Z_2 e Z_3). O Z_1 precisa ser modificado pelo usuário no software se o volume filtrado for diferente de 1 L.

1. Quando 1 L de água é amostrado e 5 µl de DNA são analisados usando PCR, o valor Z do protocolo Aquadien e do protocolo abreviado Aquadien é 32.

É calculado da seguinte forma:

- Etapa de filtragem da amostra: 1.000 ml de água são filtrados dos 1.000 ml da amostra. A fração filtrada é 1/1 então $Z_1 = 1$
- Etapa de extração e purificação de DNA:
 - Protocolo Aquadien = 1 ml de sobrenadante R1 é processado pela coluna a partir dos 1,6 ml gerados. A fração purificada é 1 de 1,6 então $Z_2 = 1,6$
 - Protocolo curto Aquadien = 500 µl de sobrenadante R1 são processados através da coluna a partir dos 800 µl gerados. A fração purificada é de 500 µl de 800 µl, portanto $Z_2 = 1,6$
- Etapa de análise de PCR: 5 µl são analisados por PCR de 100 µl de DNA extraído. A fração analisada é $5/100 = 1/20$, então $Z_3 = 20$

O fator Z geral para o protocolo Aquadien é $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,6 \times 20 = 32$.

O resultado bruto da PCR deve ser multiplicado por 32 para obter a quantidade final de bactérias contidas na amostra de água inicial, expressa em unidades genômicas (UG) por litro de amostra de água. Se o volume de água filtrada for diferente de 1 L, ele deve ser capturado nesses cálculos.

2. Quando 1 L de água é amostrado e 5 µl de DNA são analisados usando PCR, o valor Z do protocolo Aquadien para amostras sujas/**com coágulos** e o protocolo Aquadien abreviado para amostras sujas/**com coágulos** é 36.

É calculado da seguinte forma:

- Etapa de filtragem da amostra: 1.000 ml da água são filtrados dos 1.000 ml da amostra. A fração filtrada é 1/1 então $Z_1 = 1$
- Etapa de extração e purificação de DNA:
 - Protocolo Aquadien = 1 ml do sobrenadante de R1 é processado pela coluna a partir dos 1,8 ml gerados (1,6 ml de R1 + 0,2 ml de W2). A fração purificada é 1 de 1,8 então $Z_2 = 1,8$
 - Protocolo curto Aquadien = 500 µl de sobrenadante R1 são processados pela coluna dos 900 µl gerados (800 µl de R1 + 100 µl de W2). A fração purificada é de 500 µl de 900 µl, portanto $Z_2 = 1,8$
- Etapa de análise de PCR: 5 µl são analisados por PCR de 100 µl de DNA extraído. A fração analisada é $5/100 = 1/20$, então $Z_3 = 20$.

O fator Z geral do protocolo Aquadien para amostras sujas/com coágulos é:
 $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36$.

O resultado bruto da PCR deve ser multiplicado por 36 para obter a quantidade final de bactérias contidas na amostra de água inicial, expressa em UG por litro de amostra de água. Se o volume de água filtrada for diferente de 1 L, ele deve ser capturado nesses cálculos.

- Quando 1 L de água é amostrado e 5 µl de DNA são analisados usando PCR, o valor Z do protocolo Aquadien FDRS é 36.

É calculado da seguinte forma:

- Etapa de filtragem da amostra: 1.000 ml da água são filtrados dos 1.000 ml da amostra. A fração filtrada é 1/1 então $Z_1 = 1$
- Etapa de extração e purificação de DNA: 500 µl de sobrenadante são processados através da coluna dos 900 µl gerados (460 µl de água e 40 µl com 400 ml de R1). A fração purificada é 900/500 então $Z_2 = 1,8$.
- Etapa de análise de PCR: 5 µl são analisados por PCR de 100 µl de DNA extraído. A fração analisada é $5/100 = 1/20$, então $Z_3 = 20$.

O fator Z geral do protocolo Aquadien FDRS é:
 $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36$.

O resultado bruto da PCR deve ser multiplicado por 36 para obter a quantidade final de bactérias contidas na amostra de água inicial, expressa em UG por litro de amostra de água. Se o volume de água filtrada for diferente de 1 L, ele deve ser capturado nesses cálculos.

Interpretando Resultados - iQ-Check Screen *Legionella*

Depois que os parâmetros de análise de dados forem definidos, os resultados serão interpretados através da análise dos valores Cq de cada amostra (o ciclo no qual a curva de amplificação cruza o limite).

O software CFX Manager IDE permite análises automatizadas completas para sistemas de detecção de PCR em tempo real da Bio-Rad.

Controles

Verifique os controles positivo e negativo antes de interpretar os resultados da amostra.

Para a experiência ser válida, os controles devem apresentar os resultados sumarizados na tabela abaixo. Caso contrário, a reação de PCR deve ser repetida.

	Detecção de <i>Legionella</i> (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)
Controle negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Controle positivo	$30 \leq Cq \leq 40$	N/A

* O software indica um valor de Cq (o ciclo no qual a curva de amplificação ultrapassa o limite) de N/A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não aumenta significativamente acima do ruído de fundo e, portanto, não ultrapassa o limite.

Seção 7 Protocolo

Se os resultados dos controles negativos e positivos diferirem dos da tabela acima (controle inválido), repita a execução e a análise a partir da Seção 7 do Protocolo, C. PCR em Tempo Real, Configuração de Instrumentos e Software.

Amostras

A interpretação dos resultados da amostra é resumida na seguinte tabela:

Detecção de <i>Legionella</i> (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
$Cq \geq 10$	N/A	Positivo
$Cq > \text{Valor de interceptação}^1$	$28 \leq Cq \leq 40$	Negativo
$Cq = \text{N/A}$	$Cq = \text{N/A}$	Inibição ²
$Cq = \text{N/A}$	$Cq > 40$	Inibição
$Cq = \text{N/A}$	$Cq < 28$	Questão analítica ³

¹ O valor de interceptação a ser considerado no contexto de uma análise qualitativa é $Cq = 43$ (este valor é usado para dar uma indicação do valor de interceptação escolhido durante a validação). Um valor de interceptação pode ser determinado pelo usuário calculando a média dos valores de interceptação obtidos e adicionando dois desvios padrão.

² Quando a detecção da amostra e do controle interno fornecem um valor $Cq = \text{N/A}$, a amostra deve ser diluída 1:10 em tampão de eluição de extração de DNA e testada novamente.

³ Confirme se o limite foi corretamente colocado, ou se a curva, como dados brutos, é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, repita o teste de PCR.

Uma interpretação inválida pode ser fornecida quando os critérios de validação não são atendidos. Verifique os dados brutos e proceda como se a amostra estivesse inibida.

Limite de detecção

O limite de detecção da etapa de PCR (L_d PCR) para um método de detecção e quantificação de *Legionella* PCR é definido como o menor número de UG que gera um resultado positivo com um limite de confiança de 90% (NF T90-471). O limite de detecção da etapa de PCR (L_d PCR) é de 5 GU por 5 μ l de DNA extraído. Para calcular o limite de detecção teórico do método total (L_d) para uma amostra de 1 L, leve em consideração o fator Z. O L_d teórico para o método total leva em consideração um rendimento de filtragem e extração de 100%.

$$L_d = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Z = Fração da amostra depositada em cada poço de PCR

D = Fator de diluição se o DNA foi diluído antes da execução da PCR

Interpretando Resultados - iQ-Check Quanti *Legionella*

Certifique-se de que a curva de dados brutos tem uma amplificação típica (linha de base plana seguida por um aumento exponencial da fluorescência e depois um achatamento). Verifique a validade das séries de padrões de quantificação e dos controles antes de ler a quantidade média de UG calculada para cada amostra.

Controles e padrões

Verifique os controles e padrões antes de interpretar os resultados da amostra.

Para a experiência ser válida, os controles e padrões devem apresentar os resultados sumarizados na tabela abaixo. Caso contrário, a reação de PCR deve ser repetida.

	Detecção de <i>Legionella</i> (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)
Controle negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Eficiência de PCR	$75\% \leq \text{Eficiência de PCR} \leq 125\%$	N/A
Coefficiente de correlação (r^2)	$\geq 0,99$	N/A
Qs1–Qs4	$20 \leq Cq \leq 40$	$28 \leq Cq \leq 40$

* O software indica um valor de Cq (o ciclo no qual a curva de amplificação ultrapassa o limite) de N/A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não aumenta significativamente acima do ruído de fundo e, portanto, não ultrapassa o limite.

Se um dos padrões de quantificação estiver significativamente fora da curva padrão, ele pode ser eliminado para otimizar os resultados e atingir os parâmetros acima. Apenas uma réplica padrão pode ser eliminada. O material de referência deve seguir os requisitos das normas NF T90-471 e ISO/TS 12869. Se os resultados dos controles e padrões negativos forem diferentes dos dados acima, repita o teste de PCR.

Amostras

A interpretação dos resultados da amostra é resumida na seguinte tabela:

Detecção de <i>Legionella</i> (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
$Cq \geq 10$	N/A	Positivo
$Cq \geq 10$	$Cq \leq \text{Média } Cq \text{ } Qs + 3\sigma^1$	Positivo
$Cq \geq 10$	$Cq > \text{Média } Cq \text{ } Qs + 3\sigma$	Inibição ²
$Cq = \text{N/A}$	$\text{Média } Cq \text{ } Qs - 3\sigma \leq Cq \leq \text{Média } Cq \text{ } Qs + 3\sigma$	Negativo
$Cq = \text{N/A}$	N/A	Inibição

Seção 7 Protocolo

Cq = N/A	Cq > Média Cq Qs + 3σ	Inibição
Cq = N/A	Cq < Média Cq Qs – 3σ	Questão analítica ³

¹Média Cq Qs é a média dos valores HEX Cq para todos os Qs; σ representa o desvio padrão.

² Quando a detecção da amostra e do controle interno fornecem um valor Cq = N/A, a amostra deve ser diluída 1:10 em tampão de eluição de extração de DNA e testada novamente.

³ Confirme se o limite foi corretamente colocado, ou se a curva, como dados brutos, é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, repita o teste de PCR.

Se uma amostra tiver uma concentração muito alta de *Legionella* (Cq_{FAM} < Cq_{FAM} Qs4), o Cq_{HEX} pode ser maior do que o Cq_{HEX} de Qs4. Esta amostra está fora da faixa dinâmica de quantificação. Se for necessária uma quantificação precisa, dilua a amostra e repita a PCR.

Um poço com um valor Cq > valor de interceptação b e sem inibição não é considerado positivo.

Se um resultado de PCR positivo e um negativo for obtido para uma amostra, a amostra é considerada positiva.

Cálculo da concentração de *Legionella*

Os valores dados para cada amostra no relatório correspondem à quantidade inicial de UG de *Legionella* presente em 5 µl de extrato de DNA. Para obter a concentração de *Legionella* em UG/1 L de amostra de água, leve em consideração o valor médio de quantificação (“UG média/poço”) calculado pelo software para cada amostra.

$$X = \frac{\text{[Mean quantity in 5 } \mu\text{l]} \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

X = UG de *Legionella* contida em 1 L de amostra de água

Z = Fração da amostra depositada em cada poço de PCR

D = Fator de diluição se o DNA foi diluído antes da execução da PCR

Limite de detecção

O limite de detecção da etapa de PCR (Ld PCR) para um método de detecção e quantificação de *Legionella* PCR é definido como o menor número de UG que gera um resultado positivo com um limite de confiança de 90% (NF T90-471). O limite de detecção da etapa de PCR (Ld PCR) é de 5 GU por 5 µl de DNA extraído. Para calcular o limite de detecção teórico do método total (Ld) para uma amostra de 1 L, leve em consideração o fator Z dividido por 2, uma vez que as amostras são testadas em duplicata. O Ld teórico para o método total leva em consideração um rendimento de filtragem e extração de 100%.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)} \times 2}$$

Z = Fração da amostra depositada em cada poço de PCR

D = Fator de diluição se o DNA foi diluído antes da execução da PCR

Limite de quantificação

O limite de quantificação da etapa de PCR (Lq PCR) de um método de quantificação de *Legionella* PCR é definido como o menor número de cópias que permite a repetibilidade e a precisão da quantificação, conforme descrito no padrão NF T90-471 . Qs1, o primeiro ponto no padrão de quantificação, corresponde ao limite de quantificação para cada lote de iQ-Check Quanti *Legionella*. O valor exato de Qs1 para cada lote de padrões de quantificação está indicado no cartão de calibração e no certificado de análise.

$$Lq = Qs1 \times Z$$

Se um volume de água diferente de 1 L for filtrado ou se o extrato de DNA tiver que ser diluído, o Lq do método muda.

$$Ld = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Limite de quantificação superior

O limite de quantificação superior (UQL) do método corresponde ao valor (para 1 L) dado pelo ponto mais alto dos padrões de quantificação, o padrão Qs4. O valor exato de Qs4 para cada lote de padrões de quantificação está indicado no cartão de calibração e no certificado de análise. Para obter o UQL do método, o valor de Qs4 deve ser multiplicado pela fração da amostra analisada Z e pelo fator de diluição D.

$$UQL = \frac{Qs4 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Expressando Resultados

O resultado é expresso em UG/L com 2 algarismos significativos (por exemplo, 1.300 UG/L para uma concentração calculada de 1.256 UG/L).

Unidades genômicas/ Poço de PCR	Interpretação	Conclusão
<5	<Ld	Alvo não detectado no limite de detecção
[5, Qs1]	<Lq	Alvo presente, mas não quantificável
[Qs1–Qs4]	X	Alvo presente e quantificável
> Qs4	UQL	Grande quantidade de alvo*

* Fora da faixa dinâmica de quantificação. Se for necessária uma quantificação precisa, dilua a amostra e repita a PCR.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

Consulte as regulamentações locais.

Seção 9 Confirmação de Colônias Isoladas usando o Kit iQ-Check

Os kits iQ-Check *Legionella Legionella* também podem ser usados para confirmar colônias isoladas de *Legionella* em placas de ágar GVPC ou BCYE.

1. Escolha uma colônia isolada com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma ponta de pipeta).
2. Ressuspenda a colônia em 200 mL de Água Livre de DNA de *Legionella* em um tubo de microcentrífuga. Agite por 20 sec.
3. Divida a suspensão em duas alíquotas de 100 µl (tubo 1 e tubo 2).
4. Deixe incubar o tubo 1 a 95°C por 10 min. Use 5 µl da suspensão com 45 µl de mistura de PCR (consulte a Seção 7 Protocolo, C. PCR em tempo real) para executar a PCR.
5. Se $Cq >$ valor de interceptação, o resultado é negativo e a colônia não pode ser confirmada ou identificada.
6. Se $Cq < 30$, o resultado é positivo e a colônia é confirmada e identificada. Nesse caso, o tubo 1 com DNA extraído deve ser armazenado a -20°C por até 3 meses, se a PCR precisar ser repetida. Além disso, o tubo 2 deve ser armazenado a 4°C para possível cultura.
7. Se a PCR for inibida, dilua o extrato de DNA do tubo 1 em Água Livre de DNA de *Legionella* estéril (1:100) e repita a PCR.
8. Se $30 < Cq <$ valor de interceptação, confirme o resultado positivo com outro método ou repita o protocolo com outra colônia isolada.

Seção 10 Desempenho e validação do teste



BRD 07/15 – 12/07
BRD 07/16 – 12/07

MÉTODO PARA ANÁLISE
DE ÁGUA

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

O kit de extração e purificação de DNA Aquadien é usado no escopo do iQ-Check *Legionella* spp. e métodos de *L. pneumophila* certificados de Validação NF de acordo com o protocolo de validação baseado na norma NF T90-471 (junho de 2015) para a detecção e quantificação de *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* com kits de PCR em tempo real iQ-Check. O escopo de validação foi estendido para a ISO/TS 12869 (abril de 2019): Water quality – Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *L. pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Número do certificado: iQ-Check *Legionella* spp. BRD 15/07 - 07/12 e iQ-Check *L. pneumophila* BRD 16/07 - 07/12. Válido até: Consulte o certificado disponível no site da AFNOR Certification.

Seção 11

Referências

AFNOR NF T90-471. Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification.

Engleberg NC et al. (1989). DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 57,1263–1270.

ISO 11731. Water quality — Enumeration of *Legionella*.

ISO/TS 12869. Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

MacDonell MT and Colwell RR. (1987). The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res* 15, 1335.

NF T 90-431. Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* — Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration or centrifugation.

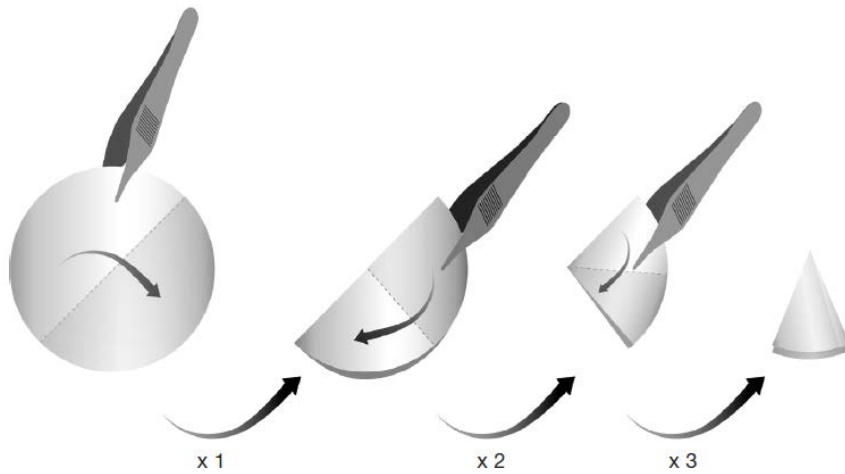
Specht T et al. (1986). Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res* 18 Suppl, 2215–2230.

Seção 12

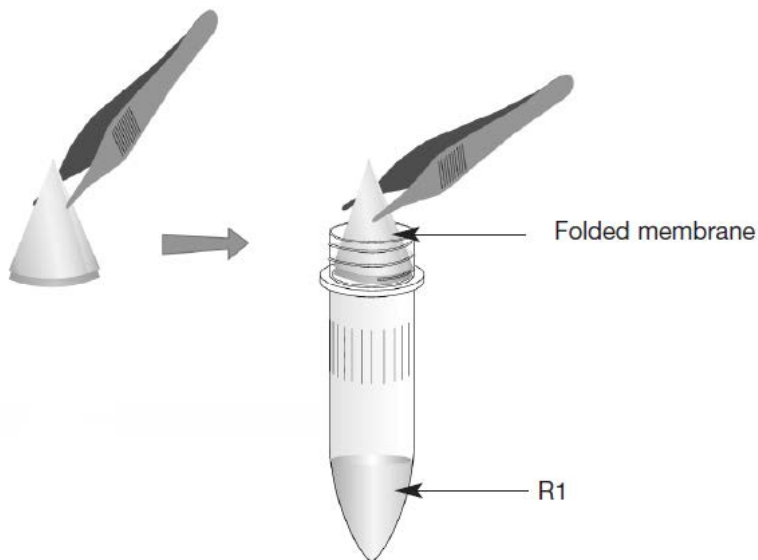
Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Outubro de 2020	10000134675 Ver A	- Novo design de documento e atualização de referências e conteúdo - Alteração do número do documento (as versões anteriores eram 881116 e 881117)
Junho de 2023	10000134675 Ver B	- Renovação e extensão da validação NF: - Sistemas de PCR em tempo real CFX Opus 96 - A curva de calibração gerada por um lote pode ser salva e reutilizada até o final desse lote - Atualização de referências e conteúdo

Apêndice 1 - Guia de dobra da membrana



Dobre cuidadosamente a membrana ao meio três vezes para obter um cone.



Usando uma pinça, coloque a membrana em um tubo contendo 1 ml de R1. A ponta do cone formado pela membrana deve ser posicionada em direção ao topo do tubo.

Apêndice 2 - Guia para o cálculo da mistura de PCR

Para encontrar os volumes corretos para a preparação da mistura de PCR, adicione o número total de amostras e de controles a serem analisados e encontre os volumes correspondentes de reagente B e de reagente C na tabela.

Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Mistura de amplificação Reagente C, µl	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Mistura de amplificação Reagente C, µl	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Mistura de amplificação Reagente C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Visite bio-rad.com/legionella para maiores informações.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc.

AQUADIEN e IQ-CHECK são marcas comerciais da Bio-Rad Europe GMBH em certas jurisdições.

Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000134675 Ver B US/EG

Aquadien DNA Extraction and Purification Kit
iQ-Check™ Screen *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit
iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit
iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

Manual del usuario

Reactivos para la extracción y purificación de ADN, y el análisis de detección y cuantificación por PCR en tiempo real de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* en muestras de agua

Referencia #3578121, Aquadien DNA Extraction and Purification Kit

Referencia #3578104, iQ-Check Screen *Legionella* spp. Kit

Referencia #3578102, iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Kit

Referencia #3578105, iQ-Check Screen *L. pneumophila* Kit

Referencia #3578103, iQ-Check Quanti *L. pneumophila* Kit

BIO-RAD

Tabla de contenidos

Apartado 1.	Introducción	1
Apartado 2.	Tecnología de iQ-Check <i>Legionella</i>	1
Apartado 3.	Componentes del kit.....	2
Apartado 4.	Vida útil y conservación.....	3
Apartado 5.	Materiales necesarios, no suministrados	3
	Equipos	3
	Fungibles.....	4
Apartado 6.	Precauciones y recomendaciones de seguridad para la obtención de resultados óptimos.....	4
Apartado 7.	Protocolo	5
	A. Toma de muestras y transporte	5
	B. Filtración del agua y extracción de ADN.....	5
	C. PCR en tiempo real	11
	D. Análisis de los datos.....	12
Apartado 8.	Confirmación de los resultados positivos.....	19
Apartado 9.	Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check.....	19
Apartado 10.	Aplicación del ensayo y validaciones.....	20
Apartado 11.	Referencias	20
Apartado 12.	Historial de revisiones	21
	Apéndice 1 — Guía para el plegado de la membrana	22
	Apéndice 2 — Guía de cálculo de la mix de PCR	23

Apartado 1

Introducción

La *Legionella* es una bacteria Gram negativa presente en todos los ambientes acuáticos. La infección puede causar neumonía aguda, enfermedad del legionario, y una forma más leve de infección pulmonar, la fiebre de Pontiac. En Europa, el número de casos registrados de legionelosis aumenta un 25 % al año. En los Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades estiman que el número de casos de legionelosis oscila entre 10.000 y 20.000 por año. La especie *Legionella pneumophila* es responsable de aproximadamente el 90 % de todos los casos clínicos.

El control regular de la presencia de *Legionella* en los sistemas de saneamiento, como torres de refrigeración de aire acondicionado, piscinas de balnearios, fuentes y sistemas de agua caliente y fría, es la única manera de prevenir la enfermedad. La detección de la *Legionella* es obligatoria o muy recomendada en la mayoría de los países desarrollados. Los métodos de cultivo convencionales para la detección de *Legionella* spp. y *L. pneumophila* en muestras de agua presentan varias desventajas, entre ellas la baja sensibilidad y los largos períodos de incubación (de 10 a 13 días para las muestras positivas).

El kit Aquadien permite una extracción y purificación óptima- del ADN de las bacterias presentes en las muestras de agua para su posterior detección en tiempo real mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El principio de la extracción se basa en la lisis alcalina y choque térmico de las bacterias presentes en la muestra y la purificación del ADN mediante ultrafiltración.

Los kits iQ-Check *Legionella* spp. e iQ-Check *L. pneumophila* se han formulado para la detección o cuantificación rápida de *Legionella* (spp. o *pneumophila*, respectivamente) en muestras de agua. La cuantificación es posible empleando en el proceso de amplificación los patrones iQ-Check de cuantificación de ADN de *Legionella* calibrados. Los resultados se obtienen en menos de 3 hr después del proceso de filtración y extracción de ADN.

Apartado 2

Tecnología de iQ-Check *Legionella*

Los kits iQ-Check *Legionella* se basan en la amplificación y detección de genes por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen cebadores y sondas de ADN específicos para *Legionella* spp. o *L. pneumophila*, así como ADN polimerasas y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el CFX96 Touch Deep Well System y CFX Opus 96 System.

La PCR es una técnica potente que se utiliza para generar muchas copias del ADN diana. Durante la reacción de PCR, varios ciclos de calentamiento y enfriamiento promueven la desnaturalización del ADN, seguido de la unión de los cebadores a la región diana. La ADN polimerasa utiliza dichos cebadores y desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs) para extender el ADN, creando copias del ADN diana. Estas copias se llaman amplicones.

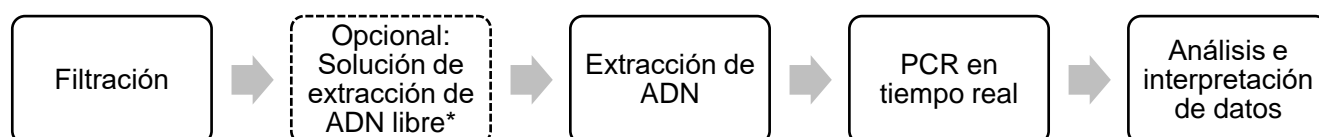
En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. El FAM es el fluoróforo unido a la sonda presente en este kit, que hibrida con la secuencia de ADN específica de *Legionella* spp. o *L. pneumophila*. En ausencia de ADN diana, no se detectará ninguna fluorescencia. A medida que el número de amplicones aumenta con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia también aumenta. En el paso de hibridación de cada ciclo de PCR, el módulo óptico o detector mide esta fluorescencia. El software asociado al instrumento traza la intensidad de la fluorescencia en función del número de

Apartado 3 Componentes del kit

ciclos. Este método permite una simple determinación de la presencia o ausencia de *Legionella* spp. o *L. pneumophila* en una muestra.

En la mix de reacción se incluye un control interno de ADN sintético. Este control se amplifica con una sonda específica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana de *Legionella* spp. o *L. pneumophila* y se detecta por un segundo fluoróforo (HEX). Esto permite la validación de cualquier resultado negativo.

Los kits iQ-Check permiten la detección o recuento de *Legionella* spp. o *L. pneumophila* en muestras de agua en cuatro pasos principales:



* Por favor, consulte el manual del usuario del producto iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391), para conocer las condiciones de uso.

Apartado 3 Componentes del kit

El kit Aquadien DNA Extraction and Purification contiene suficientes reactivos para 96 pruebas (94 muestras).

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
R1	Solución de lisis	2 frascos, 100
R2	Tampón de elución	1 tubo, 25
	Criotubo (4,5 ml)	100 tubos
	Columna de purificación	96 columnas
	Viales colectores	192 viales

Los kits iQ-Check Screen *Legionella* spp. y *L. pneumophila* contienen suficientes reactivos para 96 pruebas (94 muestras). Los kits iQ-Check Quanti *Legionella* spp. y *L. pneumophila* contienen además patrones de cuantificación suficientes para la cuantificación de hasta 43 muestras.

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mix de amplificación	1 tubo, 4,4
D	Control negativo PCR	1 tubo, 0,5
E	Control positivo PCR	1 tubo, 0,25
Qs1	Patrón de PCR 1	1 tubo, 0,08 (tapón blanco)
Qs2	Patrón de PCR 2	1 tubo, 0,08 (tapón amarillo)
Qs3	Patrón de PCR 3	1 tubo, 0,08 (tapón naranja)

Qs4	Patrón de PCR 4	1 tubo, 0,08 (tapón rojo)
	Material de referencia ¹	1 tubo, 0,08 (tapón azul)
	Tarjeta de calibración	1 tarjeta

¹ El material de referencia contiene ADN calibrado vinculado al material de referencia estándar, independiente de los patrones de cuantificación.

Apartado 4

Vida útil y conservación

Una vez recibido, el kit debe ser almacenado a 2–8 °C. Los reactivos almacenados a esta temperatura pueden usarse hasta la fecha de caducidad indicada en los tubos. No congele los reactivos.

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipos

- Mechero Bunsen
- Aparato de filtración montado en una bomba de aire o en un frasco de vacío
- Cabina de seguridad biológica — Clase II
- Baño termostático, preferiblemente con tapa, capaz de mantener 95 ± 5 °C
- Agitador vórtex
- Placa agitadora magnética
- Calefactor térmico con agitación* con capacidad para mantener 95 °C, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm.
- Centrífuga con rotor de ángulo fijo, preferiblemente refrigerada
 - Con posibilidad de alojar tubos de 1,5-2,0 ml con una capacidad de rotación de 6.000 x g
 - Con posibilidad de alojar tubos de 1,5-2,0 ml con una capacidad de rotación de 12.000 x g para muestras de agua sucia/colmatante
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Sistema PCR en tiempo real Bio-Rad*; por ejemplo, el CFX96 Touch Deep Well System (referencia #3600037) o CFX Opus 96 (referencia #17007992)

Nota: recomendamos usar un suministro de alimentación ininterrumpida (SAI) con el termociclador.

* Si desea obtener más información sobre los instrumentos recomendados, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Bio-Rad.

Fungibles

- Reactivo Aquadien W2, 5 ml, para muestras de agua sucia/colmatante (referencia #3578119)
- Aquadien Lysis Solution R1, 100 ml (referencia #3578125)
- *Legionella* DNA Free Water, 1 L (referencia #12006823)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- Filtro de membrana de policarbonato, porosidad de 0,45 µm
- Embudo estéril desechable, 250 ml
- Pinzas estériles de acero inoxidable con extremos redondeados
- Puntas estériles con filtro adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Tubos estériles, 2 ml
- Placas, tubos, film de sellado y tapas de PCR
- Guantes sin polvo
- Mascarilla respiratoria de un solo uso
- Lejía, 5 %
- Alcohol, 70 %
- Agente descontaminante, como DNA away o RNase AWAY

Apartado 6

Precauciones y recomendaciones de seguridad para la obtención de resultados óptimos

- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado.
- Las muestras de agua deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales.
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación.
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, las normas ISO 8199 e ISO/TS 12869), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe intercambiarse entre un puesto de trabajo y otro.

- Descontamine con alcohol el pequeño material de laboratorio utilizado para la filtración (por ejemplo, las pinzas metálicas) después de cada extracción y esterilícelo quemándolo en el mechero Bunsen.
- Asegúrese de que las pinzas no estén calientes antes de usarlas.
- Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación.
- Durante la extracción de ADN se deberá utilizar un control negativo.
- No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.
- Agite (mediante vórtex) los reactivos del kit antes de usarlos para asegurar su homogeneidad.
- Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos.
- Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados.
- Limpie periódicamente los espacios de trabajo con lejía al 5% , enjuagando con *Legionella* DNA Free Water estéril y alcohol al 70% o con otros agentes descontaminantes, como DNA AWAY.
- Use guantes sin polvo y evite las huellas dactilares, así como escribir en los tapones de los tubos. Ello podría interferir en la correcta adquisición de datos.
- Para la cuantificación, es necesario analizar cada muestra, control y todos los patrones de cuantificación por duplicado. Se deberá analizar el material de referencia según las normas NF T90-471 e ISO/TS 12869. No mezcle los patrones de cuantificación de lotes diferentes. .

Apartado 7

Protocolo

Se recomienda encarecidamente leer completa y detenidamente el protocolo antes de iniciar la prueba.

A. Toma de muestras y transporte

Las muestras de agua deben recogerse de acuerdo con las normas generales de detección y recuento de bacterias (NF T90-471 e ISO/TS 12869). La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas en la toma de muestras de agua para el análisis microbiológico (por ejemplo, la norma ISO 19458), especialmente en lo que respecta a la PCR.

B. Filtración del agua y extracción de ADN

Recomendaciones generales

- Encienda el baño de agua y/o calefactor térmico con agitación y ajústelo a 95 ± 5 °C. Compruebe el nivel del baño de agua para una adecuada inmersión de los criotubos de 4,5 ml.
- Prepare el número de tubos correspondiente al número de muestras para la extracción de ADN. Pipetee x ml de R1 en cada tubo, según el protocolo elegido.

Apartado 7 Protocolo

Nota: Pipetee el reactivo R1 mientras se agita a velocidad media en una placa de agitación para mantener la resina en suspensión. Utilice una punta de pipeta con una abertura ancha (por ejemplo, utilice una pipeta 1.000 µl con la punta correspondiente).

- Prepare el número de columnas de purificación necesarias, según el número de muestras, colocando una columna en cada vial colector.

Filtración del agua

1. Enjuague la rampa de filtración con 100 ml de *Legionella* DNA Free Water y luego descontamine la rampa quemándola con alcohol. Asegúrese de que la rampa esté seca y fría antes de colocar el filtro de membrana. Esta operación debe repetirse cada vez que se filtre una muestra para evitar la contaminación con ADN o bacterias entre las filtraciones de las muestras.
2. Coloque el filtro de membrana en el dispositivo de filtrado. Coloque los embudos estériles.
3. Filtre desde 100 ml a 1 L de muestra de agua a través del filtro de membrana.

Extracción y purificación de ADN con el kit Aquadien

1. Con cuidado, doble la membrana por la mitad tres veces hasta formar un cono (véase el Apéndice 1).
2. Empleando unas pinzas, coloque la membrana en un criotubo que contenga 2 ml de R1. La punta del cono formado por la membrana debe situarse en la parte superior del criotubo.
3. Someta a agitación con vórtex durante 20 sec.

Nota: Compruebe que la membrana sigue totalmente sumergida en la solución R1, corríjalo de ser necesario.

4. Incube en un baño de agua cubierto a 95 ± 5 °C durante 15 min.
5. Someta a agitación con vórtex durante 20 sec.
6. Utilizando unas pinzas previamente esterilizadas o una punta de pipeta estéril con filtro de 1 ml, retire cuidadosamente la membrana presionándola contra la pared del criotubo para recuperar todo el lisado. Deseche la membrana.
7. Deje los criotubos a temperatura ambiente durante 20 minutos. La resina de la solución R1 precipitará en el fondo del criotubo. El sobrenadante contendrá 1,6 ml de extracto de ADN. También es posible centrifugar los criotubos a 900 x g durante 3 min en una centrífuga adaptada para tubos de 4,5 ml. Verifique que los tubos se encuentren a temperatura ambiente antes de iniciar el paso de purificación.
8. Transfiera 500 µl del sobrenadante a una columna de purificación. No agite con vórtex el lisado antes de la recolección.
9. Cierre cada columna con la tapa del vial colector.

Nota: No pipetee el decantado de resina. Si esto ocurre, espere 5 minutos para que la resina vuelva a decantar o centrifugue a 900 x g durante 3 minutos.

10. Centrifugue a 6.000 x g durante 10 min. Si fuese posible programar la temperatura de la centrífuga, ajústela a 20 °C.

Nota: Si se produce una obstrucción de la columna de purificación, aumente el tiempo de centrifugación sin aumentar la velocidad de centrifugación.

11. Deseche el líquido recuperado en el vial colector.

12. Repita el paso 8 pipeteando otros 500 µl de sobrenadante en la misma columna de purificación y cierre con la tapa del colector.

13. Centrifugue a 6.000 x g durante 10 min. Si fuese posible programar la temperatura de la centrífuga, ajústela a 20 °C.

Nota: Si se produce una obstrucción de la columna de purificación, aumente el tiempo de centrifugación sin aumentar la velocidad de centrifugación. Compruebe que todo el sobrenadante se haya filtrado a través de la columna. De lo contrario, vuelva a centrifugar. Si la obstrucción sigue produciéndose después de una segunda centrifugación, siga el protocolo para muestras de agua sucia/colmatante que figura a continuación.

14. Añada 100 µl de solución R2 en la columna de purificación.

15. Deseche el vial colector. Cubra la columna de purificación con un nuevo vial colector limpio y dé la vuelta a toda la unidad.

16. Centrifugue a 1.000 x g durante 3 min. Si fuese posible programar la temperatura de la centrífuga, ajústela a 20 °C.

Nota: En este pasola tapa no puede cerrarse. Deseche la columna de purificación

17. Guarde el vial colector que contiene los 100 µl de solución de ADN purificado. Utilice 5 µl de la solución de ADN para cada reacción de PCR en tiempo real. La solución de ADN puede almacenarse durante varios meses a -20 °C. El cálculo del factor Z ($Z = 32$) se detalla en el apartado 7 Protocolo, D. Análisis de datos, Cálculo de la fracción analizada de la muestra.

Extracción y purificación de ADN con el kit Aquadien — protocolo corto

1. Con cuidado, doble la membrana por la mitad tres veces hasta formar un cono (véase el Apéndice 1).
2. Empleando unas pinzas, coloque la membrana en un tubo que contenga 1 ml de R1. La punta del cono formado por la membrana debe situarse hacia la parte superior del tubo.
3. Incube a 95 °C durante 15 minutos a 1.300 rpm en un calefactor térmico con agitación.
4. Retire cuidadosamente la membrana presionándola contra la pared del tubo para recuperar todo el lisado. Deseche la membrana.
5. Centrifugue a 900 x g durante 3 min.
6. Transfiera 500 µl del sobrenadante a una columna de purificación. No agite con vórtex el lisado antes de la recolección.
7. Cierre cada columna con la tapa del vial colector.

Apartado 7 Protocolo

Nota: No pipetee el decantado de resina. Si esto ocurre, espere 5 minutos para que la resina vuelva a decantar o centrifugue a 900 x g durante 3 minutos.

8. Centrifugue a 6.000 x g durante 10 min. Si fuese posible programar la temperatura de la centrifuga, ajústela a 20 °C.

Nota: Si se produce una obstrucción de la columna de purificación, aumente el tiempo de centrifugación sin aumentar la velocidad de centrifugación.

9. Añada 100 µl de solución R2 en la columna de purificación.
10. Deseche el vial colector. Cubra la columna de purificación con un nuevo vial colector limpio y dé la vuelta a toda la unidad.
11. Centrifugue a 1.000 x g durante 3 min. Si fuese posible programar la temperatura de la centrifuga, ajústela a 20 °C.

Nota: En este paso la tapa no puede cerrarse. Deseche la columna de purificación

12. Guarde el vial colector que contiene los 100 µl de solución de ADN purificado. Utilice 5 µl de la solución de ADN para cada reacción de PCR en tiempo real. La solución de ADN puede almacenarse durante varios meses a -20 °C. El cálculo del factor Z ($Z = 32$) se detalla en el apartado 7 Protocolo, D. Análisis de datos, Cálculo de la fracción analizada de la muestra.

Extracción y purificación de ADN con el kit Aquadien — muestras de agua sucia/colmatante

1. Con cuidado, doble la membrana por la mitad tres veces hasta formar un cono (véase el Apéndice 1).
2. Empleando unas pinzas, coloque la membrana en un criotubo que contenga 2 ml de R1. La punta del cono formado por la membrana debe situarse en la parte superior del criotubo.
3. Someta a agitación con vórtex durante 20 sec.

Nota: Compruebe que la membrana sigue totalmente sumergida en la solución R1, corríjalo de ser necesario.

4. Incube en un baño de agua cubierto a 95 ± 5 °C durante 15 min.
5. Someta a agitación con vórtex durante 20 sec.
6. Utilizando unas pinzas previamente esterilizadas o una punta de pipeta estéril con filtro de 1 ml, retire cuidadosamente la membrana presionándola contra la pared del criotubo para recuperar todo el lisado. Deseche la membrana.
7. Transfiera la muestra, incluyendo la resina, a un nuevo tubo de 2 ml. Deseche el criotubo. El lisado puede almacenarse a 2-8 °C durante 24-72 hr.
8. Añada 200 µl de tampón W2 frío (4 °C). Someta a agitación con vórtex durante 5 sec.
9. Deje reposar el tubo en nevera a 4 ± 2 °C durante 15 min.
10. Centrifugue a 12.000 x g a 4 °C durante 15 min.

11. Transfiera 500 µl del sobrenadante a una columna de purificación. No agite con vórtex el lisado antes de la recolección. Cierre cada columna con la tapa del vial colector.

Nota: No pipetee el decantado de resina. Si esto ocurre, espere 5 minutos para que la resina vuelva a decantar o centrifugue a 900 x g durante 3 minutos.

12. Centrifugue a 6.000 x g a 20 °C durante 10 min.

Nota: Si se produce una obstrucción de la columna de purificación, aumente el tiempo de centrifugación sin aumentar la velocidad de centrifugación.

13. Deseche el líquido recuperado en el vial colector.

14. Repita el paso 11 pipeteando otros 500 µl de sobrenadante en la misma columna de purificación y cierre con la tapa del colector.

15. Centrifugue a 6.000 x g a 20 °C durante 10 min.

Nota: Si se produce una obstrucción de la columna de purificación, aumente el tiempo de centrifugación sin aumentar la velocidad de centrifugación. Compruebe que todo el sobrenadante se haya filtrado a través de la columna. De lo contrario, vuelva a centrifugar.

16. Deseche el líquido recuperado en el vial colector.

17. Añada 250 µl de solución R2 en la columna de purificación.

18. Centrifugue a 6.000 x g a 20 °C durante 5 min.

19. Añada 100 µl de solución R2 en la columna de purificación.

20. Deseche el vial colector y cubra la columna de purificación con un nuevo vial colector limpio y dé la vuelta a toda la unidad.

21. Centrifugue a 1.000 x g a 20 °C durante 3 min.

Nota: En este paso la tapa no puede cerrarse.

Deseche la columna de purificación.

22. Guarde el vial colector que contiene los 100 µl de solución de ADN purificado. Utilice 5 µl de la solución de ADN para cada reacción de PCR en tiempo real. La solución de ADN puede almacenarse durante varios meses a -20 °C. El cálculo del factor Z ($Z = 36$) se detalla en el apartado 7 Protocolo, D. Análisis de datos, Cálculo de la fracción analizada de la muestra.

Extracción y purificación de ADN con el kit Aquadien — muestras de agua sucia/colmatante — protocolo corto

1. Con cuidado, doble la membrana por la mitad tres veces hasta formar un cono (véase el Apéndice 1).
2. Empleando unas pinzas, coloque la membrana en un tubo que contenga 1 ml de R1. La punta del cono formado por la membrana debe situarse hacia la parte superior del tubo.
3. Incube a 95 °C durante 15 minutos a 1.300 rpm en un calefactor térmico con agitación.

Apartado 7 Protocolo

4. Retire cuidadosamente la membrana presionándola contra la pared del tubo para recuperar todo el lisado. Deseche la membrana.
5. Añada 100 µl de tampón W2 frío (4 °C). Someta a agitación con vórtex durante 5 sec.
6. Deje reposar el tubo en nevera a 4 ± 2 °C durante 15 min.
7. Centrifugue a 12.000 x g a 4 °C durante 15 min.
8. Transfiera 500 µl del sobrenadante a una columna de purificación. No agite con vórtex el lisado antes de la recolección. Cierre cada columna con la tapa del vial colector.

Nota: No pipetee el decantado de resina. Si esto ocurre, espere 5 minutos para que la resina vuelva a decantar o centrifugue a 900 x g durante 3 minutos.

9. Centrifugue a 6.000 x g a 20 °C durante 10 min.

Nota: Si se produce una obstrucción de la columna de purificación, aumente el tiempo de centrifugación sin aumentar la velocidad de centrifugación.

10. Añada 125 µl de solución R2 en la columna de purificación.
11. Centrifugue a 6.000 x g a 20 °C durante 5 min.
12. Añada 100 µl de solución R2 en la columna de purificación.
13. Deseche el vial colector y cubra la columna de purificación con un nuevo vial colector limpio y dé la vuelta a toda la unidad.
14. Centrifugue a 1.000 x g a 20 °C durante 3 min.

Nota: En este paso la tapa no puede cerrarse. Deseche la columna de purificación

15. Guarde el vial colector que contiene los 100 µl de solución de ADN purificado. Utilice 5 µl de la solución de ADN para cada reacción de PCR en tiempo real. La solución de ADN puede almacenarse durante varios meses a -20 °C. El cálculo del factor Z ($Z = 36$) se detalla en el apartado 7 Protocolo, D. Análisis de datos, Cálculo de la fracción analizada de la muestra.

Extracción y purificación de DNA con el kit Aquadien — tratamiento con solución para la eliminación de ADN libre (FDRS, Free DNA Removal Solution)

1. Con cuidado, doble la membrana por la mitad tres veces hasta formar un cono (véase el Apéndice 1).
2. Con unas pinzas, coloque la membrana en un tubo que contenga 460 µl de *Legionella* DNA Free Water y 40 µl de FDRS activado. La punta del cono formado por la membrana debe situarse hacia la parte superior del tubo.
3. Invierta el tubo varias veces para homogeneizarlo. No agite con vórtex.
4. Incube a 37 °C durante 30 min.
5. Añada 500 µl R1 para inactivar el FDRS (Free DNA Removal Solution) para la eliminación de ADN.

6. Someta a agitación con vórtex durante 10 sec.
7. Incube a 95 °C durante 15 minutos a 1.300 rpm en un calefactor térmico con agitación.
8. Retire cuidadosamente la membrana presionándola contra la pared del tubo para recuperar todo el lisado. Deseche la membrana.
9. Centrifugue a 900 x g durante 3 min.
10. Transfiera 500 µl del sobrenadante a una columna de purificación. No agite con vórtex el lisado antes de la recolección.
11. Centrifugue a 6.000 x g durante 10 min.
12. Añada 100 µl de solución R2 y deseche el vial colector.
13. Cubra la columna de purificación con un nuevo vial colector limpio y dé la vuelta a toda la unidad.
14. Centrifugue a 1.000 x g durante 3 min. Si fuese posible programar la temperatura de la centrifuga, ajústela a 20 °C.

Nota: En este pasola tapa no puede cerrarse. Deseche la columna de purificación

15. Guarde el vial colector que contiene los 100 µl de solución de ADN purificado. Utilice 5 µl de la solución de ADN para cada reacción de PCR en tiempo real. La solución de ADN puede almacenarse durante varios meses a -20 °C. El cálculo del factor Z ($Z = 36$) se detalla en el apartado 7 Protocolo, D. Análisis de datos, Cálculo de la fracción analizada de la muestra.

C. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

Para la configuración del instrumento y del software, siga las instrucciones del manual del usuario del sistema de PCR en tiempo real para los kits iQ-Check.

Preparación de la mix de PCR

1. Prepare la mix de PCR que contenga la solución de amplificación (reactivo C) y las sondas fluorescentes (reactivo B). El volumen de mix de PCR necesario depende del número de muestras y controles a analizar. Se debe incluir al menos un control positivo y uno negativo en cada run de PCR. Utilice la tabla de pipeteo del Apéndice 2 para obtener los volúmenes correctos a utilizar para cada reactivo.

Nota: Para la cuantificación, es necesario analizar cada muestra, control y todos los patrones de cuantificación por duplicado. No mezcle los patrones de cuantificación de lotes diferentes.

Nota: Al procesar conjuntamente el iQ-Check *Legionella* spp. y iQ-Check *L. pneumophila* en la misma placa, y debido a que cada mix de amplificación es específica para cada método, es necesario ejecutar dos series independientes de patrones de cuantificación. Adicionalmente, deben analizarse los resultados de cada uno por separado.

2. Utilice la mix de PCR (reactivos B + C) inmediatamente después de su preparación. La mix permanecerá estable durante 1 hr como máximo a 2–8 °C.

Apartado 7 Protocolo

3. Pipetee 45 µl de mix de PCR en cada pocillo según la configuración de su placa.
4. Añada 5 µl de extracto de ADN, reactivo D (control negativo) y reactivo E (control positivo) o patrones de cuantificación. No agite con vórtex la muestra antes del pipeteo. Selle herméticamente los pocillos de la placa o de las tiras de PCR. Es importante evitar la formación de burbujas en el fondo de los pocillos pipeteando con cuidado. Como paso opcional para eliminar cualquier burbuja, centrifugue la placa sellada de PCR o las tiras de PCR (quick spin).
5. Coloque la placa de PCR o las tiras de tubos en el termociclador. Asegúrese de colocar la placa con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Cierre el módulo de reacción.

Run de PCR

Para iniciar el run de PCR, siga las instrucciones del manual de usuario del sistema de PCR en tiempo real del kit iQ-Check.

1. Defina la configuración de la placa en el software CFX Manager Industrial Diagnostic Edition (IDE).
2. Para los kits iQ-Check *Legionella* Screen, las muestras y los controles se analizan individualmente en cada pocillo.
3. Para los kits iQ-Check *Legionella* Quanti, las muestras, los controles y los patrones de cuantificación se analizan por duplicado. Indique el valor de la concentración para cada patrón y para el material de referencia. Este valor se encuentra en la tarjeta de calibración de cada caja de los iQ-Check *Legionella* Quantification Standards y en el certificado de análisis de cada lote de productos.

Nota: para los ensayos de cuantificación, la curva de calibración generada por un lote puede guardarse y reutilizarse hasta el final de dicho lote. La opción "Use reduced set of QS if possible" (utilizar un conjunto reducido de EQ si es posible) debe activarse antes de la ejecución de la PCR. Al final de la ejecución, seleccione "Tools" (Herramientas) y, a continuación, haga clic en "Save Standard Curve" (guardar curva estándar) para guardar la curva. Posteriormente, es necesario ejecutar un único punto del intervalo de calibración, por duplicado, en cada análisis para verificar la conformidad.

4. Seleccione el protocolo térmico apropiado, "Legio. spp." o "Legio. pneumo.", para los kits cualitativos (Screen) o cuantitativos (Quanti) y haga clic en Run.

D. Análisis de los datos

Los datos pueden ser analizados directamente al final del run de PCR o en un momento posterior abriendo el archivo de datos almacenados. Siga las instrucciones del correspondiente manual de usuario del software CFX Manager IDE para abrir los archivos de datos y configurar los parámetros de análisis de datos.

Cálculo de la fracción analizada de la muestra (factor Z)

Cualquier método de análisis que incluya un paso de extracción seguido de una detección debe ir acompañado de un cálculo de la fracción de la muestra procesada que se analizó realmente durante la detección final. Este valor se tiene en cuenta en el cálculo del límite de detección y el límite de cuantificación del método global y se utiliza para obtener un resultado final en un análisis cuantitativo. Para ello, calcule la fracción restante con respecto a la muestra inicial en cada paso del protocolo (concentración, eliminación, etc.). El factor Z corresponde al denominador de la fracción analizada y es específico para cada protocolo de extracción. Z representa el valor F/V expresado en la tabla de expresión de resultados de las normas ISO/TS 12869 y AFNOR T90-471.

El software CFX Manager, IDE calcula automáticamente el factor Z (Z_2 y Z_3). El valor Z_1 debe ser modificado por el usuario en el software si el volumen filtrado es diferente de 1 L.

1. Cuando se parte de una muestra de 1 L de agua y se analizan 5 μ l de ADN mediante PCR, el valor Z del protocolo Aquadien y el protocolo corto Aquadien es 32.

Ello se calcula de la siguiente manera:

- Paso de filtración de la muestra: se filtran 1.000 ml de agua de los 1.000 ml muestreados. La fracción filtrada es 1/1 por lo que $Z_1 = 1$
- Paso de extracción y purificación de ADN:
 - Protocolo Aquadien = 1 ml de sobrenadante R1 se procesa a través de la columna de los 1,6 ml generados. La fracción purificada es 1 de 1,6, por lo que $Z_2 = 1,6$
 - Protocolo corto Aquadien = 500 μ l del sobrenadante R1 se procesan a través de la columna de los 800 μ l generados. La fracción purificada es de 500 μ l a partir de 800 μ l, por lo que $Z_2 = 1,6$
- Paso de análisis de PCR: se analizan 5 μ l por PCR de los 100 μ l de ADN extraído. La fracción analizada es $5/100 = 1/20$ por lo que $Z_3 = 20$

El factor Z general para el protocolo Aquadien es $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,6 \times 20 = 32$.

El resultado en bruto de la PCR debe multiplicarse por 32 para obtener la cantidad final de bacterias contenida en la muestra inicial de agua, expresada en unidades genómicas (UG) por litro de muestra de agua. Si el volumen de agua filtrada es diferente a 1 L, debe ser incluido en estos cálculos.

2. Cuando se parte de una muestra de 1 L de agua y se analizan 5 μ l de ADN mediante PCR, el valor Z del protocolo Aquadien para las muestras de agua sucia/colmatante y el protocolo corto Aquadien para las muestras de agua sucia/colmatante es 36.

Ello se calcula de la siguiente manera:

- Paso de filtración de la muestra: se filtran 1.000 ml de agua de los 1.000 ml muestreados. La fracción filtrada es 1/1 por lo que $Z_1 = 1$
- Paso de extracción y purificación de ADN:
 - Protocolo Aquadien = 1 ml de sobrenadante R1 se procesa a través de la columna de los 1,8 ml generados (1,6 ml de R1 + 0,2 ml de W2). La fracción purificada es 1 de 1,8, por lo que $Z_2 = 1,8$
 - Protocolo corto Aquadien = 500 μ l del sobrenadante R1 se procesan a través de la columna de los 900 μ l generados (800 μ l de R1 + 100 μ l de W2). La fracción purificada es de 500 μ l a partir de 900 μ l, por lo que $Z_2 = 1,8$
- Paso de análisis de PCR: se analizan 5 μ l por PCR de los 100 μ l de ADN extraído. La fracción analizada es $5/100 = 1/20$ por lo que $Z_3 = 20$.

El factor Z general del protocolo Aquadien para las muestras sucias/colmatantes es:

$$Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36.$$

El resultado en bruto de la PCR debe multiplicarse por 36 para obtener la cantidad final de bacterias contenida en la muestra inicial de agua, expresada en unidades genómicas (UG) por litro de muestra de agua. Si el volumen de agua filtrada es diferente a 1 L, debe ser incluido en estos cálculos.

Apartado 7 Protocolo

3. Cuando se muestrea 1 L de agua y se analizan 5 µl de ADN mediante PCR, el valor Z del protocolo Aquadien FDRS es 36.

Ello se calcula de la siguiente manera:

- Paso de filtración de la muestra: se filtran 1.000 ml de agua de los 1.000 ml muestreados. La fracción filtrada es 1/1 por lo que $Z_1 = 1$
- Paso de extracción y purificación de ADN: se procesan 500 µl de sobrenadante a través de la columna de los 900 µl obtenidos (460 µl de agua y 40 µl de FDRS activado con 400 µl de R1). La fracción purificada es 900/500 por lo que $Z_2 = 1,8$.
- Paso de análisis de la PCR: se analizan 5 µl por PCR de 100 µl de ADN extraído. La fracción analizada es $5/100 = 1/20$ por lo que $Z_3 = 20$.

El factor Z general del protocolo FDRS Aquadien es:

$$Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,8 \times 20 = 36.$$

El resultado en bruto de la PCR debe multiplicarse por 36 para obtener la cantidad final de bacterias contenida en la muestra inicial de agua, expresada en unidades genómicas (UG) por litro de muestra de agua. Si el volumen de agua filtrada es diferente a 1 L, debe ser incluido en estos cálculos.

Interpretación de los resultados – iQ-Check Screen *Legionella*

Una vez establecidos los parámetros de análisis de los datos, los resultados se interpretan analizando los valores Cq de cada muestra (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral).

El software CFX Manager IDE permite un análisis completamente automático para los sistemas de detección por PCR en tiempo real de Bio-Rad.

Controles

Verifique los controles positivo y negativo antes de interpretar los resultados de las muestras.

Para que el ensayo sea válido, los controles deben presentar los resultados resumidos en la siguiente tabla. De lo contrario, deberá repetirse la reacción.

	Detección de <i>Legionella</i> (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Control positivo	$30 \leq Cq \leq 40$	N/A

* El programa informático indica un valor Cq (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral) de N/A (no aplicable) cuando la fluorescencia de una muestra no se eleva significativamente por encima del ruido de fondo, y por lo tanto no cruza el umbral.

Si los resultados de los controles negativos y positivos difieren de los de la tabla anterior (control inválido), repita el run y el análisis a partir del apartado 7 Protocolo, C. PCR en tiempo real, configuración del instrumento y del software.

Muestras

La interpretación de los resultados de las muestras se resume en la siguiente tabla.

Detección de <i>Legionella</i> (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)	Interpretación
$Cq \geq 10$	N/A	Positivo
$Cq > \text{Valor de intersección}^1$	$28 \leq Cq \leq 40$	Negativo
$Cq = \text{N/A}$	$Cq = \text{N/A}$	Inhibición ²
$Cq = \text{N/A}$	$Cq > 40$	Inhibición
$Cq = \text{N/A}$	$Cq < 28$	Cuestión analítica ³

¹ El valor de intersección que debe considerarse en el contexto de un análisis cualitativo es $Cq = 43$ (este valor se utiliza para dar una indicación del valor de intersección elegido durante la validación). El usuario puede determinar un valor de intersección calculando el promedio de los valores de intersección obtenidos y añadiendo dos desviaciones estándar.

² Si tanto la detección de la muestra como la del control interno dan un valor $Cq = \text{N/A}$, es necesario diluir la muestra 1:10 en solución tampón de elución de ADN y volver a analizarla.

³ Verifique el posicionamiento correcto del umbral, y que la curva presente una amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir la prueba de PCR.

Si no se cumplen los criterios de validación, se puede dar una interpretación errónea. Compruebe los datos en bruto y proceda como si la muestra se hubiera inhibido.

Límite de detección

El límite de detección del paso de PCR (Ld PCR) para un método de detección y cuantificación de *Legionella* por PCR se define como el número más bajo de UG (unidad genómica) que genera un resultado positivo con un límite de confianza del 90 % (NF T90-471). El límite de detección del paso de PCR (Ld PCR) es de 5 GU por 5 μl de extracto de ADN. Para calcular el límite de detección teórico del método total (Ld) para una muestra de 1 L, tome en consideración el factor Z. El límite de detección (Ld) teórico para el método total tiene en cuenta un rendimiento de filtración y de extracción del 100 %.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Z = Fracción de la muestra depositada en cada pocillo de PCR

D = Factor de dilución si el ADN ha sido diluido antes del run de PCR

Interpretación de los resultados — iQ-Check Quanti *Legionella*

Verifique que la curva de datos sin procesar tenga una amplificación típica (línea de base plana seguida de un aumento exponencial de la fluorescencia y luego un aplanamiento). Compruebe la validez de la serie de patrones de cuantificación y de los controles antes de leer la cantidad media de unidades genómicas (UG) calculada para cada muestra.

Apartado 7 Protocolo

Controles y patrones

Verifique los controles y patrones antes de interpretar los resultados de las muestras.

Para que el ensayo sea válido, los controles y los patrones deben presentar los resultados resumidos en la siguiente tabla. De lo contrario, deberá repetirse la reacción.

	Detección de <i>Legionella</i> (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	$Cq = N/A^*$	$28 \leq Cq \leq 40$
Eficiencia de la PCR	$75 \% \leq \text{eficiencia PCR} \leq 125 \%$	N/A
Coefficiente de correlación (r^2)	$\geq 0,99$	N/A
Qs1–Qs4	$20 \leq Cq \leq 40$	$28 \leq Cq \leq 40$

* El programa informático indica un valor Cq (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral) de N/A (no aplicable) cuando la fluorescencia de una muestra no se eleva significativamente por encima del ruido de fondo, y por lo tanto no cruza el umbral.

Si uno de los patrones de cuantificación se encuentra notablemente desviado de la curva patrón, éste puede ser eliminado para optimizar los resultados y alcanzar los parámetros anteriores. Sólo puede eliminarse una réplica del patrón. El material de referencia debe seguir las exigencias de las normas NF T90-471 e ISO/TS 12869. Si los resultados de los controles negativos y patrones difieren de los anteriores, repita la prueba de PCR.

Muestras

La interpretación de los resultados de las muestras se resume en la siguiente tabla.

Detección de <i>Legionella</i> (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)	Interpretación
$Cq \geq 10$	N/A	Positivo
$Cq \geq 10$	$Cq \leq \text{Media } Cq \text{ Qs} + 3\sigma^1$	Positivo
$Cq \geq 10$	$Cq > \text{Media } Cq \text{ Qs} + 3\sigma$	Inhibición ²
$Cq = N/A$	$\text{Media } Cq \text{ Qs} - 3\sigma \leq Cq \leq \text{Media } Cq \text{ Qs} + 3\sigma$	Negativo
$Cq = N/A$	N/A	Inhibición
$Cq = N/A$	$Cq > \text{Media } Cq \text{ Qs} + 3\sigma$	Inhibición
$Cq = N/A$	$Cq < \text{Media } Cq \text{ Qs} - 3\sigma$	Cuestión analítica ³

¹Media $Cq \text{ Qs}$ es el promedio de los valores HEX Cq para todos los Qs; σ representa la desviación estándar.

² Si tanto la detección de la muestra como la del control interno dan un valor $Cq = N/A$, es necesario diluir la muestra a 1:10 en solución tampón de elución de ADN y volver a analizarla.

³ Verifique el posicionamiento correcto del umbral, y que la curva presente una amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir la prueba de PCR.

Si una muestra presenta una concentración muy alta de *Legionella* ($C_{qFAM} < C_{qFAM} Q_{s4}$), el C_{qHEX} podría ser mayor que C_{qHEX} de Q_{s4} . Esta muestra se encuentra fuera del rango dinámico de cuantificación. Si se requiere una cuantificación precisa, diluya la muestra y repita la PCR.

Un pocillo con un valor $C_q >$ valor intersección b y sin inhibición no se considera como positivo.

Si para una muestra se obtiene un resultado de PCR positivo y otro negativo, la muestra se considera positiva.

Cálculo de la concentración de *Legionella*

Los valores indicados para cada muestra en el informe corresponden a la cantidad inicial de unidades genómicas (UG) de *Legionella* presentes en 5 μ l de extracto de ADN. Para obtener la concentración de *Legionella* en UG/1 L de muestra de agua, se debe tener en cuenta el valor medio de cuantificación ("media UG/pocillo") calculado por el software para cada muestra.

$$X = \frac{[\text{Mean quantity in 5 } \mu\text{l}] \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

X = UG *Legionella* UG contenida en 1 L de muestra de agua

Z = Fracción de la muestra depositada en cada pocillo de PCR

D = Factor de dilución si el ADN ha sido diluido antes del run de PCR

Límite de detección

El límite de detección del paso de PCR (L_d PCR) para un método de detección y cuantificación de *Legionella* por PCR se define como el número más bajo de UG (unidad genómica) que genera un resultado positivo con un límite de confianza del 90 % (NF T90-471). El límite de detección del paso de PCR (L_d PCR) es de 5 GU por 5 μ l de extracto de ADN. Para calcular el límite de detección teórico del método total (L_d) para una muestra de 1 L, tome en consideración el factor Z dividido por 2, ya que las muestras se analizan por duplicado. El límite de detección (L_d) teórico para el método total tiene en cuenta un rendimiento de filtración y de extracción del 100 %.

$$L_d = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L) \times 2}}$$

Z = Fracción de la muestra depositada en cada pocillo de PCR

D = Factor de dilución si el ADN ha sido diluido antes de del run de PCR

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de la etapa de PCR (L_q PCR) para un método de detección y cuantificación de *Legionella* por PCR se define como el número más bajo de copias que permite la repetibilidad y la precisión de la cuantificación, tal como se describe en la norma NF T90-471. Q_{s1} , el primer punto de la curva de cuantificación, corresponde al límite de cuantificación de cada lote de iQ-Check Quanti *Legionella*. El valor exacto de Q_{s1} para cada lote de patrones de cuantificación se indica en la tarjeta de calibración y en el certificado de análisis.

$$Lq = Qs1 \times Z$$

Si se filtra un volumen de agua diferente a 1 L o si se debe diluir el extracto de ADN, cambiará el Lq del método.

$$Ld = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Límite de cuantificación superior

El límite de cuantificación superior (UQL) del método corresponde al valor (para 1 L) dado por el punto más alto de los patrones de cuantificación, el estándar Qs4. El valor exacto de Qs4 para cada lote de patrones de cuantificación se indica en la tarjeta de calibración y en el certificado de análisis. Para obtener el UQL del método, el valor Qs4 debe multiplicarse por la fracción de muestra analizada Z y por el factor de dilución D.

$$UQL = \frac{Qs4 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (L)}}$$

Expresión de los resultados

El resultado final se expresa en UG/L con 2 cifras significativas (por ejemplo, 1.300 GU/L para una concentración calculada de 1.256 UG/L).

Unidades genómicas/ pocillo PCR	Interpretación	Conclusión
<5	<Ld	Diana no detectada en el límite de detección
[5, Qs1]	<Lq	Diana presente pero no cuantificable
[Qs1–Qs4]	X	Diana presente y cuantificable
> Qs4	UQL	Elevada cantidad de diana*

* Fuera del rango dinámico de cuantificación. Si se requiere una cuantificación precisa, diluya la muestra y repita la PCR.

Apartado 8

Confirmación de los resultados positivos

Consulte la normativa local.

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

Los kits iQ-Check *Legionella* también pueden utilizarse para confirmar colonias de *Legionella* aisladas en placas de agar de GVPC o BCYE.

1. Recoja una colonia aislada con un palillo, un asa estéril u otro consumible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspenda la colonia en 200 µl de *Legionella* DNA Free Water en un tubo de microcentrifuga. Somete a agitación con vórtex durante 20 segundos.
3. Divida la suspensión en dos alícuotas de 100 µl (tubo 1 y tubo 2).
4. Incube el tubo 1 a 95 °C durante 10 min. Utilice 5 µl de la suspensión con 45 µl de mix de PCR (ver el apartado 7 Protocolo, C. PCR en tiempo real) para ejecutar la PCR.
5. Si $C_q >$ valor de intersección, el resultado es negativo y la colonia no podrá ser confirmada o identificada.
6. Si $C_q < 30$, el resultado es positivo y la colonia se confirma e identifica. En este caso, el tubo 1 con el ADN extraído puede almacenarse a -20 °C hasta durante 3 meses, en caso de que haya que repetir la PCR. Adicionalmente, se debe almacenar el tubo 2 a 4 °C para un posible cultivo.
7. Si se inhibe la PCR, diluya el extracto de ADN del tubo 1 en *Legionella* DNA Free Water estéril (1:100) y repita la PCR.
8. Si $30 < C_q <$ valor de intersección, confirme el resultado positivo con otro método o repita el protocolo con otra colonia aislada.

Apartado 10

Aplicación del ensayo y validaciones



BRD 07/15 – 12/07
BRD 07/16 – 12/07

MÉTODO PARA EL ANÁLISIS
DEL AGUA

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

El Aquadien DNA Extraction and Purification kit se utiliza en el ámbito de los métodos iQCheck- *Legionella* spp. y *L. pneumophila* certificados por la validación NF según el protocolo de validación basado en la norma NF T90-471 (junio de 2015) para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. o *L. pneumophila* con los kits iQ-Check Real-Time PCR. El alcance de la validación se ha ampliado a la norma ISO/TS 12869 (abril de 2019): Water Quality – Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Número de certificado: iQCheck- *Legionella* spp. BRD 07/15 – 12/07 y iQ-Check *L. pneumophila* BRD 07/16 – 12/07. Válido hasta: Consulte el certificado disponible en el sitio web de AFNOR Certification.

Apartado 11

Referencias

AFNOR NF T90-471. Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification.

Engleberg NC et al. 1989 DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 57,1263–1270.

ISO 11731. Water quality — Enumeration of *Legionella*.

ISO/TS 12869. Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

MacDonell MT and Colwell RR. (1987). The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res* 15, 1335.

NF T 90-431. Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* — Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration or centrifugation.

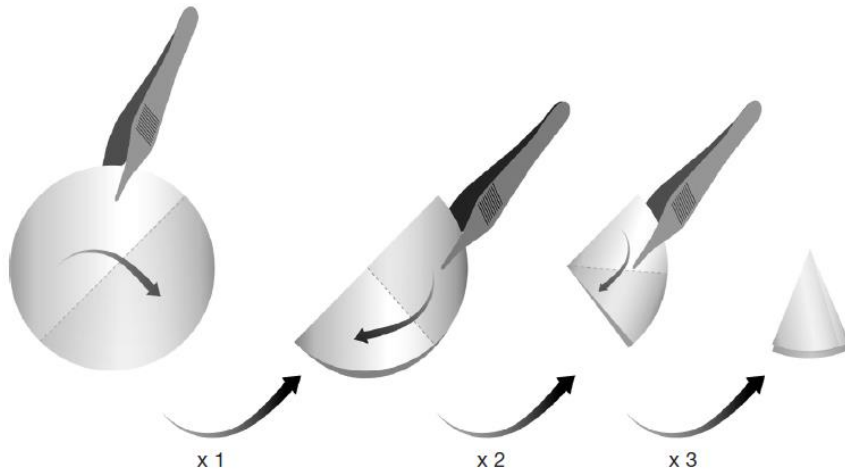
Specht T et al. (1986). Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res* 18 Suppl, 2215–2230.

Apartado 12

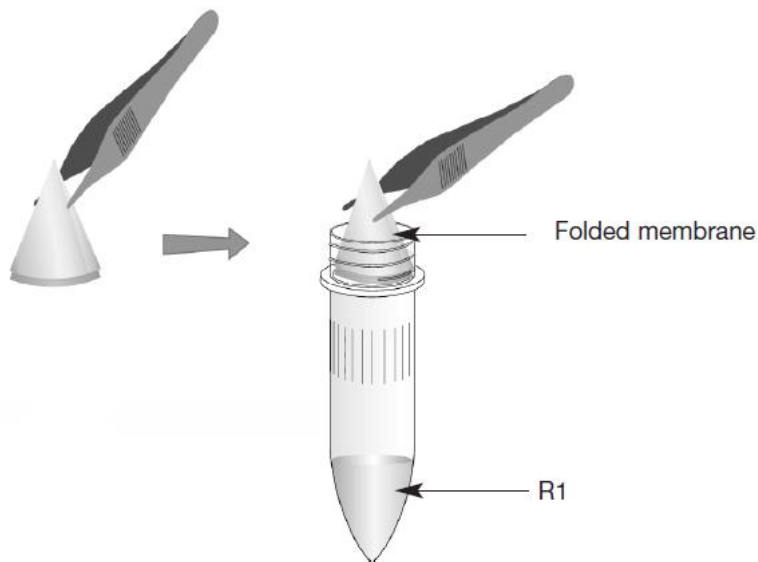
Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Octubre de 2020	10000134675 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nuevo diseño del documento y actualización de las referencias y el contenido- Cambio en el número de documento (las versiones anteriores eran 881116 y 881117)
Junio de 2023	10000134675 Ver B	<ul style="list-style-type: none">- Renovación y ampliación de la validación NF:<ul style="list-style-type: none">- Sistema de PCR en tiempo real CFX Opus 96- La curva de calibración generada por un lote puede guardarse y reutilizarse hasta el final de dicho lote.- Actualización de referencias y contenidos

Apéndice 1 — Guía para el plegado de la membrana



Con cuidado, doble la membrana por la mitad tres veces hasta formar un cono.



Mediante unas pinzas, coloque la membrana en un tubo que contenga la cantidad apropiada de R1 atendiendo al protocolo seleccionado. La punta del cono formado por la membrana debe situarse hacia la parte superior del tubo.

Apéndice 2 — Guía de cálculo de la mix de PCR

Para obtener los volúmenes correctos a usar en la preparación de la mix de PCR, sume el número total de muestras y controles a analizar y localice los volúmenes correspondientes del reactivo B y del reactivo C en la tabla.

Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl
1	5	40	33	178	1400	65	351	2800
2	11	86	34	184	1500	66	356	2900
3	16	130	35	189	1500	67	362	2900
4	22	173	36	194	1600	68	367	2900
5	27	216	37	200	1600	69	373	3000
6	32	259	38	205	1600	70	378	3000
7	38	302	39	211	1700	71	383	3100
8	43	346	40	216	1700	72	389	3100
9	49	389	41	221	1800	73	394	3200
10	54	432	42	227	1800	74	400	3200
11	59	475	43	232	1900	75	405	3200
12	65	518	44	238	1900	76	410	3300
13	70	562	45	243	1900	77	416	3300
14	76	605	46	248	2000	78	421	3400
15	81	648	47	254	2000	79	427	3400
16	86	691	48	259	2100	80	432	3500
17	92	734	49	265	2100	81	437	3500
18	97	778	50	270	2200	82	443	3500
19	103	821	51	275	2200	83	448	3600
20	108	864	52	281	2200	84	454	3600
21	113	907	53	286	2300	85	459	3700
22	119	950	54	292	2300	86	464	3700
23	124	994	55	297	2400	87	470	3800
24	130	1000	56	302	2400	88	475	3800
25	135	1100	57	308	2500	89	481	3800
26	140	1100	58	313	2500	90	486	3900
27	146	1200	59	319	2500	91	491	3900
28	151	1200	60	324	2600	92	497	4000
29	157	1300	61	329	2600	93	502	4000
30	162	1300	62	335	2700	94	508	4100
31	167	1300	63	340	2700	95	513	4100
32	173	1400	64	346	2800	96	518	4100

Visite bio-rad.com/legionella para más información.

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.

AQUADIEN e IQ-CHECK son marcas registradas de Bio-Rad Europe GmbH en diversos países.

Todas las marcas comerciales utilizadas en el presente documento son propiedad de sus respectivos dueños.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220

