



PROTOCOLE DÉTAILLÉ

1.	INTRODUCTION	page 2
2.	COMPOSITION DU KIT	page 2
3.	STOCKAGE DES REACTIFS	page 2
4.	EQUIPEMENTS ET MATERIELS REQUIS (NON FOURNIS DANS LE KIT)	page 3
5.	PRECAUTIONS D'EMPLOI	page 3
6.	PROTOCOLE DE FILTRATION D'ECHANTILLONS D'EAU ET D'EXTRACTION D'ADN.....	page 3
7.	CALCULS ET EXPRESSION DES RESULTATS	page 5
8.	PROTOCOLES ALTERNATIFS	page 6

1. INTRODUCTION

L'eau représente un milieu très propice au développement des bactéries. Bien que la plupart d'entre elles ne soient pas pathogènes, certaines, comme *Legionella pneumophila*, *Salmonella* ou des souches d'*Escherichia coli* présentent des risques de santé publique. D'après les directives de l'OMS, il est fortement recommandé d'effectuer des contrôles réguliers de la qualité microbiologique des eaux sanitaires (eaux de consommation, de piscine, d'établissement thermal, etc.) et industrielles (circuits de tour aéroréfrigérante, etc.) afin de réduire au maximum les risques. Cette surveillance porte directement sur les bactéries pathogènes ou bien sur les indicateurs de contamination fécale, comme *Escherichia coli*.

La PCR temps réel est un outil puissant et rapide pour la détection spécifique des bactéries dans les eaux. Cette méthodologie, très utilisée dans la plupart des pays, fait l'objet d'une norme NF et d'une norme ISO pour la recherche de *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* dans les eaux sanitaires et industrielles. La préparation de l'échantillon (extraction & purification de l'ADN) est l'étape la plus importante du protocole. En effet, cette phase doit permettre une élimination des inhibiteurs sans perte d'ADN extrait ; ceci pour atteindre des performances optimales.

Le kit **DNA PURE-FLASH** apporte une solution robuste et fiable qui permet une extraction optimale de l'ADN des bactéries présentes, tout en assurant l'élimination des inhibiteurs en vue d'une analyse par PCR en temps réel.

2. COMPOSITION DU KIT

Réactifs	Quantité par kit
Tube de <i>lysis buffer</i> (S1)	96 x 1,3 ml
Flacon compte-gouttes de <i>binding buffer</i> (S2)	4 x 2,0 ml
Flacon d' <i>elution buffer</i> (S3)	4 x 2,5 ml
Tube de résine WCX	96
Microtube de 2,0 ml	96
Microtube de 1,5 ml	96
Cône effilé	192
Seringue à embout long	2

3. STOCKAGE DES REACTIFS

Les réactifs *lysis buffer* (S1), *binding buffer* (S2) et *elution buffer* (S3) doivent être conservés au réfrigérateur, entre 2°C et 8°C. Dans ces conditions, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date indiquée sur l'emballage.

4. EQUIPEMENT ET MATERIEL NECESSAIRE (NON FOURNI DANS LE KIT)

- Rampe de filtration,
- Entonnoir stérile,
- Membrane en polycarbonate 0,45 µm,
- Gants,
- Micropipettes 100 µl et 1 000 µl,
- Pointes stériles pour micropipette 100 µl et 1 000 µl,
- Pince stérile,
- Thermomixer (gamme de température : 25°C - 100°C / Agitation orbital ≥ 1500 rpm),
- Microcentrifugeuse de paillasse.

Optionnel :

- Pompe à vide,
- Colonne d'ultrafiltration.

5. PRECAUTIONS

L'analyse doit être réalisée par des opérateurs ayant reçu une formation adéquate.

Il est indispensable d'utiliser *a minima* un contrôle négatif d'extraction à chaque série d'extraction, de préférence en fin de série.

Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de leur date de péremption.

6. PROTOCOLE POUR LE TRAITEMENT D'ÉCHANTILLONS D'EAU

a. Opérations préliminaires

1. Préchauffer le thermomixer ou un bain-marie à 95°C ± 5°C,
2. Préparer le nombre de tube de *lysis buffer* (S1) correspondant au nombre d'échantillon à traiter.
3. Préparer sur un portoir le nombre de tube de résine WCX correspondant au nombre d'échantillon à traiter.

b. Filtration des échantillons d'eau

1. Décontaminer la rampe par flambage à l'alcool. Avant filtration, la rampe doit être sèche et froide. Elle doit être décontaminée entre chaque filtration,
2. Placer la membrane sur le fritté et ajouter un entonnoir stérile,
3. Filtrer l'échantillon.

c. Extraction et purification d'ADN

1. Plier délicatement la membrane en huit à l'aide d'une pince stérile afin d'obtenir un cône,
2. À l'aide d'une pointe stérile (1,0 ml) et de la pince, placer la membrane dans le tube de lyse (*lysis buffer*, S1) de façon à ce que la pointe du cône soit vers le haut,

Note : la membrane doit-être totalement immergée dans la solution S1.

3. Incuber à $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min, agitation 1800 RPM,

Note : cette étape peut aussi être réalisée dans un bain-marie sans agitation. Une fois cette incubation terminée, préchauffer le thermomixer à $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pour l'étape n°13.

4. Retirer la membrane du tube en la pressant sur les parois, puis jeter la membrane,
5. Centrifuger les tubes 2 min dans la microcentrifugeuse de paillasse ou laisser décanter la résine à température ambiante pendant 5 min,
6. Pipeter 1,0 ml de surnageant contenant l'ADN extrait et le déposer dans un microtube 2,0 ml fourni,

Note 1 : veiller à ne pas prélever de résine. Si une fraction de la résine de la solution S1 est prélevée, redéposer la totalité dans le tube et centrifuger à nouveau.

Note 2 : si l'échantillon à analyser est trop chargé en matière en suspension, prélever un volume inférieur à 1,0 ml. Noter alors le volume prélevé afin de le prendre en compte dans le facteur Z lors du calcul final (cf. chapitre 7).

7. Ajouter 2 gouttes de *binding buffer* (S2) dans le tube et agiter manuellement le tube par trois retournements,

Note : si une ou deux gouttes supplémentaires sont ajoutées par erreur, la performance du protocole n'est pas impactée.

8. A l'aide d'une micropipette, transférer la totalité du volume de solution dans le tube de résine WCX,
9. Agiter à l'aide d'un vortex entre 20 et 30 secondes à environ 2 500 RPM,
10. Centrifuger 30 secondes entre 1 500 et 5 000 x g ou laisser décanter la résine 2 min à température ambiante,
11. Placer un cône effilé au bout de la seringue à embout long et aspirer la totalité du liquide en commençant par le volume au dessus de la résine puis en plaçant la pointe du cône dans la résine. Jeter le liquide,

Note : la pointe doit être changée entre chaque échantillon. Une pompe à vide peut également être utilisée.



12. A l'aide d'une micropipette, ajouter 100 µl d'*Elution Buffer* (S3) dans le tube,

13. Agiter au thermomixer à 1800 rpm, 75°C ± 5°C, 10 min,
14. Centrifuger entre 1 500 et 5 000 x g pendant 1 minute,
15. Récupérer à la micropipette entre 50 et 100 µl de l'éluât situé au-dessus de la résine en prenant soin de ne pas aspirer de résine. Déposer la totalité de l'extrait dans un microtube 1,5 ml fourni. L'échantillon purifié est stable plusieurs mois à -20°C.

Note : Pour éviter de prélever de la résine, utiliser un cône effilé. Dans le cas où de la résine serait prélevée, redéposer le surnageant dans le tube et centrifuger à nouveau.

7. CALCULS ET EXPRESSION DES RESULTATS

a. Calcul du facteur Z de la méthode DNA PURE-FLASH

Le facteur Z permet de transformer les UG (Unités Génomes) dans le puits en UG dans le volume filtré de la manière suivante :

$$\text{UG par puits} \times \text{Facteur Z} = \text{UG dans le volume filtré}$$

Cette valeur est spécifique de chaque méthode d'extraction car elle dépend de la fraction d'échantillon purifiée (Z_1) lors de l'étape d'extraction et de purification, et de la fraction d'échantillon analysée (Z_2) lors de l'étape d'analyse PCR.

Le facteur Z de la méthode d'extraction DNA PURE-FLASH se calcule de la manière suivante :

- **Etape d'extraction et de purification** : la solution S1 est composée de 1,1 ml de solution liquide et de 0,2 ml de Chelex. Seul 1,0 ml de surnageant sur 1,1 ml liquide est purifié.

La fraction purifiée représente donc $1/1,1^{\text{ème}}$ de l'échantillon. Dans notre équation, la composante Z_1 est alors de 1,1.

- **Etape d'analyse PCR** : au total, après l'étape d'éluotion (13), le tube contient 200 µl d'extrait ADN. Seuls 5 µl sont déposés et analysés en PCR.

La fraction analysée représente alors $5/200^{\text{ème}}$ soit $1/40^{\text{ème}}$ de l'échantillon. Dans notre équation, la composante Z_2 est alors de 40.

Le facteur Z de la méthode d'extraction DNA PURE-FLASH est $Z = Z_1 \times Z_2 = 1,1 \times 40 = 44$.

b. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) :

La LOD de la méthode globale (extraction/purification et détection) est calculée de la manière suivante :

$$\frac{\text{LODqPCR} \times Z \times D}{\text{Volume filtré (en l)}}$$

D représente le facteur de dilution si l'extrait ADN a été dilué avant le run PCR.

La LOQ de la méthode globale est calculée de la même manière :

$$\frac{\text{LOQqPCR} \times Z \times D}{\text{Volume filtré (en L)}}$$

8. PROTOCOLES ALTERNATIFS

Pour chaque protocole alternatif, il faut impérativement prendre en compte les changements dans le calcul du facteur Z.

Protocole avec élimination du surnageant (étape 11) à l'aide d'une pompe à vide pour toutes matrices

6

Les étapes 1 à 10 et 12 à 15 sont strictement identiques au protocole classique. Seule l'étape 11 diffère :

11. Eliminer le surnageant à l'aide d'une pompe à vide raccordée par un tuyau à une pointe effilée.

Note : La pointe doit être changée entre chaque échantillon.



La suite du protocole peut être réalisée selon le protocole classique ou le protocole avec colonne d'ultrafiltration.

Calcul du Facteur Z

Le facteur Z est strictement identique au facteur Z du protocole classique, Le facteur Z de cette méthode d'extraction **DNA PURE-FLASH** est $Z = Z_1 \times Z_2 = 1,1 \times 40 = 44$.

Protocole avec colonne d'ultrafiltration pour les eaux propres

Les étapes 1 à 14 sont strictement identiques au protocole classique. La suite du protocole peut être réalisée de la manière suivante :

15. Déposer 100 µl de l'éluât situé au-dessus de la résine dans la colonne d'ultrafiltration,

Note : pour éviter de prélever de la résine, un cône effilé peut être utilisé. Dans le cas où de la résine serait prélevée, redéposer le surnageant dans le tube et centrifuger à nouveau.

16. Centrifuger 10 min à 6 000 x g,

17. Retourner la colonne dans un nouveau microtube et éliminer le tube de collection,

18. Déposer 30 µl d'Elution buffer (S3) dans la colonne,

19. Centrifuger 3 min à 1 000 x g,

Note : à cette étape le tube ne peut pas être fermé.

20. Conserver le tube de collection qui contient l'extrait ADN et éliminer la colonne. L'échantillon purifié est stable plusieurs mois à -20°C.

Déposer 5 µL d'échantillon pour chaque analyse PCR.

7

Calcul du Facteur Z

Pour le cas du protocole « colonne d'ultrafiltration pour les eaux propres », le facteur Z se calcule de la manière suivante :

- **Etape d'extraction et de purification** : la solution S1 est composée de 1,1 ml de solution liquide et de 0,2 ml de Chelex. Seul 1,0 ml de surnageant sur 1,1 ml liquide est purifié.

La fraction purifiée représente donc $1/1,1^{ème}$ de l'échantillon. Dans notre équation, la composante Z_1 est alors de 1,1.

- **Etape de concentration sur colonne** : 100 µl d'éluât sur les 200 µl totaux sont concentrés sur la colonne et sont ensuite élués dans 30 µl.

La fraction concentrée représente donc $100/200^{ème}$ de l'échantillon. Dans notre équation, la composante Z_2 est alors de 2.

- **Etape d'analyse PCR** : après l'étape d'élué, le tube contient 30 µl d'extrait ADN. Seuls 5 µl sont déposés et analysés en PCR.

La fraction analysée représente $5/30^{ème}$. Dans notre équation, la composante Z_3 est alors de 6.

Le facteur Z de la méthode d'extraction DNA PURE-FLASH est $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1,1 \times 2 \times 6 = 13,2$.

Protocole classique pour manipulateur aguerri (cas des eaux propres)

Les étapes 1 à 5 et 7 à 15 sont strictement identiques au protocole classique. Seule l'étape 6 diffère :

6. Le surnageant contient l'ADN extrait. Pipeter la totalité du surnageant, c'est à dire 1,1 ml de surnageant (veillez à ne pas prélever de résine) dans un nouveau microtube de 2,0 ml vide.
Note : Dans le cas où de la résine de la solution S1 serait prélevée, redéposer le surnageant dans le tube et centrifuger à nouveau.

8

La suite du protocole peut être réalisée selon le protocole classique ou le protocole avec colonne d'ultrafiltration.

Calcul du Facteur Z

Dans le cas du protocole « manipulateur aguerri », le facteur Z se calcule de la même manière que pour le protocole classique, seul Z_1 change :

- **Etape d'extraction et de purification** : la solution S1 est composée de 1,1 ml de solution liquide et de 0,2 ml de Chelex. La totalité du surnageant est purifiée. La composante Z_1 est alors de 1.

Le facteur Z de la méthode d'extraction **DNA PURE-FLASH** est $Z = Z_1 \times Z_2 = 40$.

Protocole dans le cas d'une eau sale avec matières en suspension importantes

Les étapes 1 à 5 et 7 à 15 sont strictement identiques au protocole classique. Seule l'étape 6 diffère :

6. Le surnageant contient l'ADN extrait. Pipeter 800 μ l de surnageant (en veillant à ne pas prélever de résine) et déposer dans un nouveau microtube de 2,0 ml vide.
Note : Dans le cas où de la résine de la solution S1 serait prélevée, redéposer le surnageant dans le tube et centrifuger à nouveau.

Il est conseillé de réaliser la suite du protocole selon le protocole classique.

Calcul du Facteur Z

Dans le cas du protocole « eau sale avec matières en suspension importantes », le facteur Z se calcule de la même manière, seul Z_1 change :

- **Etape d'extraction et de purification** : la solution S1 est composée de 1,1 ml de solution liquide et de 0,2 ml de Chelex. Seul 0,8 ml de surnageant sur 1,1 ml liquide est purifié.

La fraction purifiée représente donc 0,8/1,1^{ème} de l'échantillon. Dans notre équation, la composante Z_1 est alors de 1,375.

Le facteur Z de la méthode d'extraction **DNA PURE-FLASH** est $Z = Z_1 \times Z_2 = 1,375 \times 40 = 55$.