

AQUADIEN™ KIT

96 tests

Ref.: 3578121

User Guide

Kit for DNA extraction and purification from bacteria present in water samples

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

- I - Introduction
 - II - Composition of the kit
 - III - Shelf-life and storage
 - IV - Equipment and material required (not supplied in the kit)
 - V - Precautions
 - VI - Sampling and sample transportation
 - VII - Protocol for water filtration and DNA extraction
 - VIII - Calculation of the analyzed fraction of sample
 - IX - Validations
- Appendix: membrane folding schema

I - INTRODUCTION

Numerous bacteria are present in aquatic environment. Most of them are harmless, but some are responsible for infections or diseases for humans like *Legionella* or *Pseudomonas aeruginosa*. Some bacteria are water pollution indicators such as *E. coli*.

A regular control for the presence of bacteria in water distribution system, whirlpools, swimming pools, hydrotherapy pools and/or into drinking water or water from industrial process is the only way to prevent from diseases or infections. The detection and enumeration of pathogenic bacteria and water quality indicators is mandatory or strongly recommended in most of developed countries.

Conventional culture methods for detection of bacteria in water samples present several inconveniences, such as low sensitivity and long incubation periods. Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) method allows detection in 24 hours and is now frequently used for water pathogens or water quality indicators. Using real-time PCR, specific DNA sequences of the strains are amplified and detected in real-time, by means of fluorescent probes.

The AQUADIEN™ kit allows an optimal DNA extraction and purification from bacteria present in water samples for a real time PCR detection. The principle of the extraction is based on alkaline lysis of bacteria in presence of thermal shock and DNA purification using ultrafiltration. The kit has shown excellent results for *Legionella* and *Pseudomonas aeruginosa* real-time PCR analysis.

II - COMPOSITION OF THE KIT

Kit contents	Quantity per kit
R1 Lysis solution	2 x 100 mL
R2 Elution buffer	1 x 25 mL
Cryotube™ 4.5 mL	2 x 50 units
Purification column	1 x 96 units
Collector vials	1 x 192 units

AQUADIEN™ kit allows to perform 96 DNA extractions from water samples.

The Kit Insert is available on the website www.bio-rad.com or on demand at your local Bio-Rad representative.

III - SHELF-LIFE AND STORAGE

The kit must be stored on reception between +2°C and +8°C. Each reagent stored at this temperature may be used until the expiration date indicated. Do not freeze the reagents from the kit.

IV - EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED FOR THE FILTRATION AND THE DNA EXTRACTION (NOT SUPPLIED)

1 - Equipment

Water filtration

- Filtration apparatus (mounted either on air pump or on vacuum flask) in a sterile environment, close to Bunsen burner for example.
- Class II safety cabinet.

DNA extraction

- Water bath at 95°C ± 5°C, preferably with a cap.
- Vortex.
- Stirrer heating block (for short protocol not in the scope of NF VALIDATION).
- Centrifuge with fixed-angle rotor for 1.5 - 2 mL tubes with a rotation capacity of 6000 x g, and preferably refrigerated.
- Optional: refrigerated centrifuge with a rotor for 1.5 - 2 mL tubes with a rotation capacity of 12000 x g.
- Magnetic stir plate.

2 - Laboratory Material

Filtration

- Polycarbonate membrane filters with a nominal porosity of 0.45 μm . If any other types of membrane filters are used, a preliminary validation should be performed in the laboratory. Do not use membrane filters containing cellulose. PVDF membrane filters are not recommended.
- Disposable sterile funnels of 250 mL.
- Sterile metallic inox tweezers with rounded ends.

DNA Extraction

- 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL and 1000 μL micropipettes.
- Sterile filter tips, suitable for fitting to the 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL and 1000 μL micropipettes.
- For clogging sample protocol: 2 mL tubes.

Other

- Unpowdered gloves.
- Single use respiratory half mask.
- Water (*Legionella* DNA free).
- 5% sodium hypochlorite solution.
- 70% alcohol.

3 - Reagents

- Optional: AQUADIEN W2, reagent for DNA extraction of clogging sample (Ref.: 3578119).

V - PRECAUTIONS

- Only adequately trained personnel may perform this test.
- The water samples must be handled and discarded as potentially infectious materials.
- The quality of the results depends on strict compliance with the following Good Laboratory Practices.
- The laboratory equipment (pipettes, tubes etc.) must not circulate from one workstation to another.
- It is essential to perform a negative control of the extraction at each extraction series, preferentially at the end of the series.
- Do not use the reagents after their expiration date.
- Vortex the kit reagents before use in order to work with homogenous solutions.
- Check the accuracy and precision of the pipettes in addition to proper functioning of the instruments.
- Change gloves regularly and whenever you suspect that they may have been contaminated.
- Clean the working surfaces regularly with 5% sodium hypochlorite solution and rinse afterwards with sterile water (*Legionella* DNA free) and 70% alcohol.
- Decontaminate the small laboratory material used for the filtration (for example the metallic tweezers) after each extraction with alcohol and sterilize it by burning on the Bunsen burner. Check that tweezers are not hot before use.

VI - SAMPLING AND SAMPLE TRANSPORTATION

Water samples are collected according to the general standards for bacteria detection and enumeration (NF T90-471 and ISO/TS 12869). Samples are collected in sterile glass, polyethylene or similar containers. If the water sample contains or is thought to contain oxidizing biocide, then add an excess of an appropriate inactivating agent.

The samples shall be delivered to the laboratory as soon as possible and preferably within 24 hrs but no more than 48 hrs after the sampling.

If the samples are carried and analysed within 24 hrs, then carry and store at room temperature.

If the samples are carried and analysed within 48 hrs then carry and store at $+2^{\circ}/+8^{\circ}\text{C}$.

Note: Wait for 48 hrs after biocide treatment before sampling 1 L of water that will be submitted to real-time PCR analysis.

VII - PROTOCOL FOR WATER FILTRATION AND DNA EXTRACTION

We strongly recommend that you read the entire protocol before beginning the test. Comply strictly with the proposed protocol.

1 - Preliminary operations

- Switch on the water bath and set to $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- Check the level of the water bath, for the adequate immersion of the 4.5 mL cryotubes.
- Prepare the number of cryotubes corresponding to the number of samples submitted to DNA extraction. Pipette 2 mL of R1 in each cryotube.

Note: Pipette R1 while it is stirring at medium speed on a stir plate, in order to keep it in suspension and collect the resin. Use a pipette tip with a wide opening (e.g. use a 200 μL to 1000 μL pipette with the corresponding tip).

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

2 - 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 not hot 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 to 1 L of water sample over the membrane filter.

3 - DNA extraction and purification (in the scope of the NF VALIDATION)

From this step, work with unpowdered gloves.

1. Carefully fold the membrane in two, three times in order to obtain a cone (see the Membrane Folding schema in Appendix).
2. Using the tweezers, place the membrane in the cryotube containing 2 mL of R1. The point of the cone formed by the membrane after the folding should be positioned towards the top of the cryotube. (see the Membrane Folding schema in Appendix).
3. Vortex 20 sec.

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

4. Incubate in the water bath for 15 min. at $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. If the water bath used has a cap, cover the water bath with it.
5. Vortex 20 sec.
6. Carefully, using a 1 mL sterile filter tip, take out the membrane by **pressing it to the wall** of the cryotube in order to recover all the lysate. Throw away the membrane.
7. Leave still the cryotubes at room temperature during 20 min. During this step the solution cools and the resin of the R1 solution pellets at the bottom of the cryotube allowing to pipette in step 8 only the supernatant. The 1.6 mL of supernatant contains the extracted DNA. It is also possible to centrifuge the cryotubes at $900 \times g$ during 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. Apply 500 μL of the supernatant on the purification column, without vortexing the lysate. Seal each column with the collector vial cap.

Note: Pay attention not to pipette the pellet formed by the resin. If you pipette the pellet, release the 500 μL in the cryotube and wait again for 5 min. for the resin to pellet or centrifuge at $900 \times g$ for 3 min.

9. Centrifuge for 10 min at 6000 x g. If the centrifuge temperature is programmable, adjust it preferably to 20°C.
Note: If clogging occurs in the purification column, increase the centrifugation time, without increasing the centrifugation speed.
10. Throw away the liquid contained in the collector vial
11. Repeat step 8 by pipetting again 500 µL of the supernatant in the same purification column and seal with the collector cap.
12. Centrifuge again for 10 min at 6000 x g. If the centrifuge temperature is programmable, adjust it preferably to 20°C.
Notes: • If the column is clogged, 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, we propose an alternative protocol for the purification. Refer to point 4 "DNA extraction and purification for clogging samples".
13. Add 100 µL of R2 solution in the purification column.
14. Throw away the collector vial. Cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole upside down.
15. Centrifuge at 1000 x g during 3 min. If the centrifuge temperature is programmable, adjust it preferably to 20°C. Throw away the purification column.
Note: In this step, the cap can not be closed.
16. Store the collector vial containing the 100 µL of purified DNA solution. Apply 5 µL of the DNA solution for each real time PCR reaction.
The DNA solution can be stored for several months at -20°C.

4 - DNA extraction and purification - Short Protocol (not in the scope of NF VALIDATION)

From this step, work with unpowdered gloves.

1. Carefully fold the membrane in two, three times in order to obtain a cone (see the Membrane Folding schema in Appendix).
2. Using the tweezers, place the membrane in the tube containing 1 mL of R1. The point of the cone formed by the membrane after the folding should be positioned towards the top of the tube. (see the Membrane Folding schema in Appendix).
3. Incubate for 15 min at 95°C - 1,300 rpm in a stirrer heating block.
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 g during 3 min.
6. Apply 500 µL of the supernatant on the purification column, without vortexing the lysate. Seal each column with the collector vial cap.
Note: Pay attention not to pipette the pellet formed by the resin. If you pipette the pellet, release the 500 µL in the tube and wait again for 5 min. for the resin to pellet or centrifuge at 900 x g for 3 min.
7. Centrifuge for 10 min at 6000 x g. If the centrifuge temperature is programmable, adjust it preferably to 20°C.
Note: If clogging occurs in the purification column, increase the centrifugation time, without increasing the centrifugation speed.
8. Add 100 µL of R2 solution in the purification column.
9. Throw away the collector vial. Cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole upside down.
10. Centrifuge at 1000 x g during 3 min. If the centrifuge temperature is programmable, adjust it preferably to 20°C. Throw away the purification column.
Note: In this step, the cap can not be closed.
11. Store the collector vial containing the 100 µL of purified DNA solution. Apply 5 µL of the DNA solution for each real time PCR reaction.
The DNA solution can be stored for several months at -20°C.

5 - DNA extraction and purification for clogging samples (in the scope of NF VALIDATION)

1. Carefully fold the membrane in two, three times in order to obtain a cone (see the Membrane Folding schema in Appendix).
2. Using the tweezers, place the membrane in the cryotube containing 2 mL of R1. The point of the cone formed by the membrane after the folding should be positioned towards the top of the cryotube. (see the Membrane Folding schema in Appendix).
3. Vortex 20 sec.
Note: Check that the membrane is still totally immersed in R1 solution.
4. Incubate in the water bath for 15 min. at $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. If the water bath used has a cap, cover the water bath with it.
5. Vortex 20 sec.
6. The membrane must be wrung and thrown away. Transfer the sample, including the resin in a 2 mL tube. Throw away the cryotube.
The lysate can be stored at this step at $+2^{\circ}/+8^{\circ}\text{C}$ during 24-72 hrs.
7. Add 200 μL of cool W2 buffer ($+4^{\circ}\text{C}$).
8. Vortex 5 sec.
9. Leave the supernatant for 15 min at $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (in a refrigerator).
10. Centrifuge 15 min at 12000 x g at 4°C .
11. Apply 500 μL of the supernatant on the purification column, without vortexing the lysate. Seal each column with the collector vial cap.
Note: Pay attention not to pipette the pellet formed by the resin. If you pipette the pellet, release the 500 μL in the tube and wait again for 5 min. for the resin to pellet or centrifuge at 900 x g for 3 min.
12. Centrifuge for 10 min at 6000 x g at 20°C .
Note: If clogging occurs in the purification column, 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 again 500 μL of the supernatant in the same purification column and seal with the collector cap.
15. Centrifuge again for 10 min at 6000 x g at 20°C .
Notes: • If clogging occurs in the purification column, 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 for 5 min at 6000 x g at 20°C .
19. Add 100 μL of R2 solution on the purification column.
20. Throw away the collector vial and cover the purification column with a new clean collector vial and turn the whole upside down.
21. Centrifuge at 1000 x g during 3 min at 20°C . Throw away the purification column.
Note: In this step, the cap can not be closed.
22. Store the vial containing 100 μL of purified DNA solution. Apply 5 μL of the DNA solution for each real time PCR reaction.
The calculation of the Z factor is detailed in paragraph 8 (Z=36).
The DNA solution can be stored for several months at -20°C .

6 - DNA extraction and purification for clogging samples - Short Protocol (not in the scope of NF VALIDATION)

1. Carefully fold the membrane in two, three times in order to obtain a cone (see the Membrane Folding schema in Appendix).
2. Using the tweezers, place the membrane in the tube containing 1 mL of R1. The point of the cone formed by the membrane after the folding should be positioned towards the top of the tube. (see the Membrane Folding schema in Appendix).

3. Incubate for 15 min at 95°C - 1,300 rpm in a stirrer heating block
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 g during 3 min.
6. Add 100 µL of cool W2 buffer (+4°C).
7. Vortex 5 sec.
8. Leave the supernatant for 15 min at 4 ± 2°C (in a refrigerator).
9. Centrifuge 15 min at 12000 x g at 4°C.

10. Apply 500 µL of the supernatant on the purification column, without vortexing the lysate. Seal each column with the collector vial cap.

Note: Pay attention not to pipette the pellet formed by the resin. If you pipette the pellet, release the 500 µL in the tube and wait again for 5 min. for the resin to pellet or centrifuge at 900 x g for 3 min.

11. Centrifuge for 10 min at 6000 x g at 20°C.
Note: If clogging occurs in the purification column, increase the centrifugation time, without increasing the centrifugation speed.

12. Add 125 µL of R2 solution in the purification column.

13. Centrifuge for 5 min at 6000 x g at 20°C.

14. Add 100 µL of R2 solution on the purification column.

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

16. Centrifuge at 1000 x g during 3 min at 20°C. Throw away the purification column.

Note: In this step, the cap can not be closed.

17. Store the vial containing 100 µl of purified DNA solution. Apply 5 µL of the DNA solution for each real time PCR reaction.

The calculation of the Z factor is detailed in paragraph 8 (Z=36).

The DNA solution can be stored for several months at -20°C.

VIII - CALCULATION OF THE ANALYZED FRACTION OF SAMPLE

Any analysis method that included an extraction stage followed by a detection stage must be accompanied by calculation of the fraction of the processed sample that is actually analysed 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, you should calculate the remaining fraction with respect to the initial sample at each stage in the protocol (concentration, elimination, etc.).

The Z factor corresponds to the **denominator** of the fraction analysed and is specific to each extraction protocol.

1. In the event 1 L of water is analysed and 5 µL of DNA are analysed using PCR, the Z value of the Aquadien protocol and Aquadien Short protocol, is 32.

It is calculated as follows:

- Sample filtration step: 1000 mL of the water are filtered out of the 1000 mL.

The filtered fraction is 1/1. $Z_1=1$

- DNA extraction and purification step: 1 mL of R1 supernatant is processed through the column out of the 1.6 mL.

The purified fraction is 1/1.6. $Z_2 = 1.6$

- PCR analysis step: 5 µL are analysed by PCR out of 100µl of extracted DNA.

The analysed fraction is $5/100 = 1/20$. $Z_3 = 20$

The overall Z factor from the Aquadien protocol is $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1.6 \times 20 = 32$.
(Z represents the value F/V expressed in result expression table into ISO TS 12869 and AFNOR T90-471 Standards)

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 Unit (GU) per water sample Liter.

If the filtered water volume is different from 1 L, take it in account in these calculations.

2. In the event 1 L of water is analysed and 5 μ L of DNA are analysed using PCR, the Z value of the Aquadien protocol for clogging samples and Aquadien Short Protocol for clogging samples, is 36.

It is calculated as follows:

- Sample filtration step: 1000 mL of the water are filtered out of the 1000 mL.
The filtered fraction is $1/1$. $Z_1=1$
- DNA extraction and purification step: 1 mL of R1 supernatant is processed through the column out of the 1.8 mL (1.6 mL of R1 + 0.2 mL of W2).
The purified fraction is $1/1.8$. $Z_2= 1.8$
- PCR analysis step: 5 μ L are analysed by PCR out of 100 μ l of extracted DNA.
The analysed fraction is $5/100 = 1/20$. $Z_3 = 20$

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

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

(Z represents the value F/V expressed in result expression table into ISO TS 12869 and AFNOR T90-471 Standards)

The raw PCR result should be multiplied by 36 to obtain the final quantity of bacteria contained in the initial water sample, expressed in Genomic Unit (GU) per water sample Liter.

If the filtered water volume is different from 1 L, take it in account in these calculations.

For example, if 100 mL are filtered, the Z1 factor will be equal to 10, and the Z factor will be equal to 360.

IX - VALIDATIONS



BRD 07/15 – 12/07
BRD 07/16 – 12/07

METHOD FOR WATER
ANALYSIS

Certified by
AFNOR Certification
<http://nf-validation.afnor.org>

AQUADIEN is used in the scope of the methods iQ-Check®*Legionella* spp. and iQ-Check®*Legionella pneumophila* certified NF Validation according to the validation protocol based on the Standard NF T90-471 (June 2015) for the detection and quantification of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila* with iQ-Check®*Legionella* real-time PCR kits. The validation scope has been extended to the following reference method: "ISO/TS 12869 (December 2012): Water quality - Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)".

Certificate numbers: iQ-Check®*Legionella* spp.: **BRD 07/15 -12/07** ;
iQ-Check®*L. pneumophila*: **BRD 07/16 -12/07**.

Valid until: refer to the certificate available on the AFNOR Certification website.

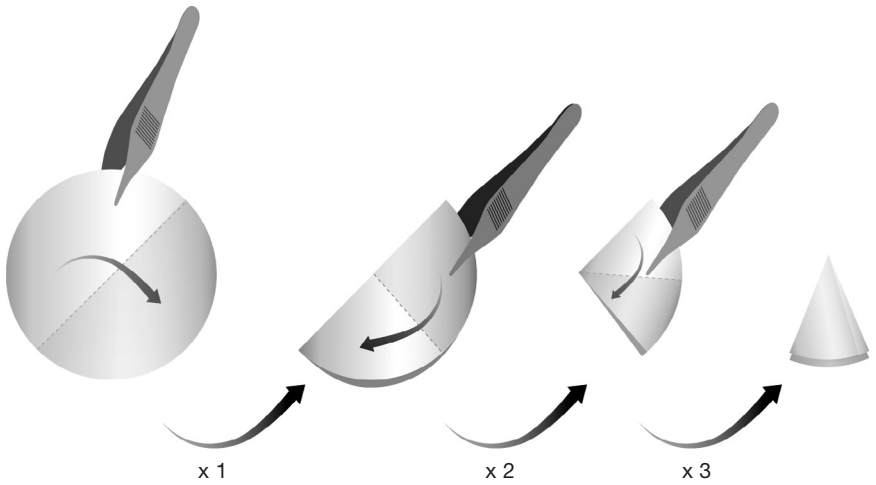
Note to the purchaser:

Cryotube is a trademark of Nunc.

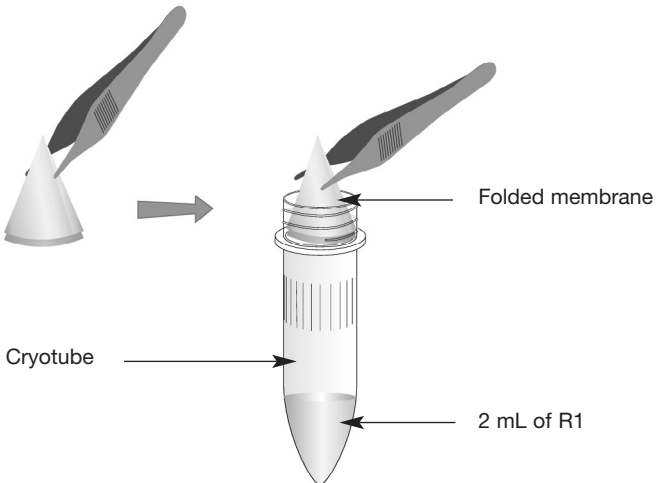
Aquadien is a trademark of Bio-Rad.

APPENDIX

Membrane Folding Schema



Carefully fold the membrane in 2, three times in order to obtain a cone.



Using the tweezers, place the membrane in the cryotube containing 2 mL of R1. The point of the cone formed by the membrane after the folding should be positioned towards the top of the cryotube.

KIT AQUADIEN™

96 tests

Réf. : 3578121

Notice d'utilisation

**Kit pour l'extraction et la purification d'ADN à partir de bactéries
contenues dans des échantillons d'eau**

BIO-RAD

SOMMAIRE

- I - Introduction
 - II - Composition du kit
 - III - Validité et conservation
 - IV - Équipement et matériel nécessaire (non fourni dans le kit)
 - V - Précautions
 - VI - Échantillonnage et transport des échantillons
 - VII - Protocole de filtration de l'eau et d'extraction d'ADN
 - VIII - Calcul de la fraction d'échantillon analysée
 - IX - Validations
- Annexe : schéma de pliage de la membrane

I - INTRODUCTION

De nombreuses bactéries sont présentes dans l'environnement aquatique. Beaucoup sont inoffensives, mais certaines peuvent être la cause d'infections ou de maladies pour l'homme comme *Legionella* ou *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres bactéries peuvent servir aussi d'indicateurs de pollution de l'eau, comme c'est le cas pour *E. coli*.

Le contrôle régulier de la présence de ces bactéries dans les systèmes de distribution d'eau, piscines, hammam et/ou encore dans les eaux de boissons ou de procédés industriels est le seul moyen de prévention des maladies ou des infections. La détection de ces bactéries est obligatoire ou fortement recommandée dans la plupart des pays développés.

Les méthodes de détection conventionnelles sur milieux de cultures présentent plusieurs inconvénients notamment une faible sensibilité et de longues périodes de culture. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en temps réel, permettant l'obtention de résultats en 24h, est aujourd'hui fréquemment utilisée pour la recherche de pathogènes ou d'indicateurs de pollution dans les eaux. Avec cette méthode, des séquences d'ADN spécifiques du genre ou de l'espèce bactérienne d'intérêt sont amplifiées et détectées, en temps réel, grâce à des sondes fluorescentes.

Le kit AQUADIEN™ permet une extraction optimale de l'ADN des bactéries présentes dans les échantillons d'eau pour une détection par PCR en temps réel. Le principe est basé sur une lyse par choc thermique en milieu alcalin, suivie par une purification de l'ADN par ultrafiltration. Le kit a montré d'excellents résultats dans les analyses de *Legionella* ou *Pseudomonas aeruginosa* par PCR en temps réel.

II - COMPOSITION DU KIT

Composants du kit	Quantité par kit
R1 Solution de Lyse	2 x 100 mL
R2 Solution de lavage et d'éluion	1 x 25 mL
Cryotube™ 4,5 mL	2 x 50 unités
Colonne de purification	1 x 96 unités
Flacons de récupération	1 x 192 unités

Le kit AQUADIEN™ permet de réaliser 96 extractions d'ADN à partir d'échantillons d'eau.

La notice technique est disponible sur le site internet www.bio-rad.com ou sur demande auprès de votre représentant Bio-Rad.

III - VALIDITÉ ET CONSERVATION

Dès réception, le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé à cette température peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée. Les réactifs ne doivent pas être congelés.

IV - ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL NÉCESSAIRE (NON FOURNI DANS LE KIT)

1 - Équipement

Filtration

- Appareil de filtration (monté soit sur pompe à vide soit sur fiole à vide) dans un environnement stérile, par exemple à proximité d'un bec bunsen allumé.
- Poste de sécurité microbiologique (PSM).

Extraction de l'ADN

- Bain-marie liquide à 95°C ± 5°C, de préférence avec couvercle.
- Vortex.
- Bain-sec agitateur-chauffant (hors cadre de la certification NF VALIDATION).
- Centrifugeuse avec rotor angulaire pour tubes de 1,5 mL - 2 mL avec une capacité de rotation de 6000 x g, et préférentiellement réfrigérée.
- Optionnel : centrifugeuse réfrigérée avec un rotor pour tubes de 1,5 mL - 2 mL avec une capacité de rotation de 12000 x g.
- Agitateur magnétique

2 - Matériel de Laboratoire

Filtration de l'échantillon d'eau initial

- Membrane en polycarbonate de porosité nominale 0,45 µm. Si une autre membrane est utilisée, celle-ci doit faire l'objet d'une validation préliminaire dans le laboratoire. Ne pas utiliser de membrane contenant de la cellulose. L'utilisation de membranes en PVDF est déconseillée.
- Entonnoirs stériles à usage unique de 250 mL.
- Pinces métalliques en inox à bouts ronds, stériles.

Extraction de l'ADN

- Micropipettes de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL et 1000 µL.
- Cônes à filtre stériles, adaptables sur les micropipettes de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL et 1000 µL.
- Pour le protocole échantillon colmatant : tubes de 2 mL.

Autres

- Gants non poudrés.
- Masque respiratoire à usage unique.
- Eau (exempte d'ADN de *Legionella*).
- Eau de Javel 5%.
- Alcool 70%.

3 - Réactifs

- Optionnel : Réactif AQUADIEN W2, pour l'extraction d'ADN pour échantillon colmatant (Réf. : 3578119).

V - PRÉCAUTIONS

- Cet essai doit être réalisé par des personnes ayant reçu une formation adéquate.
- Les eaux analysées doivent être manipulées et éliminées comme des matières potentiellement infectieuses.
- La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des Bonnes Pratiques de Laboratoire.
- Le matériel (pipettes, tubes etc...) ne doit pas circuler d'un poste de travail à l'autre.
- Il est indispensable d'utiliser au moins un contrôle négatif d'extraction à chaque série d'extractions, de préférence en fin de série.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
- Vortexer les réactifs du kit avant leur utilisation pour travailler avec des solutions homogènes.
- Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes ainsi que le bon fonctionnement des instruments.
- Changer de gants régulièrement et dès que vous soupçonnez qu'ils peuvent être contaminés.
- Nettoyer les surfaces de travail régulièrement avec de l'eau de Javel 5% et rincer après avec de l'eau (exempte d'ADN de *Legionella*) et de l'alcool 70%.
- Décontaminer le petit matériel nécessaire pour la filtration (pinces métalliques ou autres) avec de l'alcool entre chaque échantillon puis le stériliser en le flambant au bec bunsen. Vérifier que les pinces sont bien refroidies avant utilisation.

VI - ÉCHANTILLONNAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons d'eau sont collectés selon les normes générales pour la recherche et le dénombrement des bactéries (NF T90-471 et ISO/TS 12869). Les échantillons sont prélevés dans des récipients stériles en verre, polyéthylène ou autres flacons. Si l'échantillon d'eau contient ou est suspecté de contenir un biocide oxydant, ajouter en quantité suffisante un agent neutralisant approprié.

Les échantillons doivent être remis au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence dans les 24h, sans dépasser 48h après le prélèvement de l'échantillon.

Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 24h, alors le transport et le stockage peuvent être effectués à température ambiante.

Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 48h, alors le transport et le stockage doivent s'effectuer à +2°/+8°C.

Remarque : Attendre 48h après un traitement biocide avant de prélever un échantillon d'eau en vue d'une analyse par PCR en temps réel.

VII - PROTOCOLE DE FILTRATION DE L'EAU ET D'EXTRACTION D'ADN

Nous vous recommandons vivement de lire l'ensemble du protocole avant de commencer l'essai. Respecter scrupuleusement le protocole proposé.

1 - Actions à réaliser avant de procéder à l'essai

- Allumer le bain-marie et le régler à 95°C ± 5°C. Vérifier que la température soit bien stabilisée avant de procéder à l'extraction d'ADN.
- Vérifier la hauteur du niveau d'eau dans le bain-marie pour que les tubes de 4.5 mL soient bien immergés.
- Préparer le nombre de cryotubes correspondant au nombre d'échantillons soumis à l'extraction d'ADN. Répartir 2 mL de R1 dans chaque cryotube.

Remarque : Lors du pipetage, veiller à ce que R1 soit constamment sous agitation magnétique de façon à ce que le réactif de lyse soit bien homogène. Utiliser un cône avec une ouverture suffisamment large (soit une pipette de 200 µL à 1000 µL avec le cône correspondant).

- Préparer le nombre de colonnes de purification nécessaires en plaçant chaque colonne dans un flacon de récupération.

2 - Filtration des échantillons d'eau

1. Filtrer 100 mL d'eau exempte d'ADN de *Legionella* sur la rampe de filtration et ensuite flamber la rampe à l'alcool afin de la décontaminer. S'assurer que la partie supportant le filtre est sèche et refroidie avant la filtration de l'échantillon. Répéter cette opération entre chaque échantillon filtré afin d'éviter toute contamination bactérienne ou par de l'ADN de *Legionella* entre les filtrations.
2. Placer la membrane filtrante sur l'appareil de filtration. Placer un entonnoir stérile sur chaque filtre.
3. Filtrer 100 mL à 1 L d'échantillon d'eau sur la membrane filtrante.

3 - Extraction et purification d'ADN (dans le cadre de la méthode certifiée NF VALIDATION)

A partir de cette étape, travailler avec des gants non poudrés.

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

Remarque : Vérifier que le filtre reste bien immergé dans la solution R1.

4. Placer les tubes 15 min dans un bain-marie à 95°C ± 5°C. Si le bain-marie dispose d'un couvercle, utilisez-le.
5. Vortexer pendant 20 sec.
6. Retirer la membrane à l'aide d'un cône stérile de 1 mL et l'essorer le long de la paroi du cryotube afin de récupérer tout le lysat. Jeter la membrane.
7. Laisser les tubes refroidir à température ambiante pendant 20 min. environ. Pendant ce temps, la résine du réactif de lyse R1 sédimente au fond du tube. Le surnageant (1,6 mL) contient l'ADN extrait des bactéries lysées. Vous pouvez également centrifuger les cryotubes à 900 x g pendant 3 min dans une centrifugeuse avec un rotor pour tubes de 4,5 mL. Vérifier que le tube est à température ambiante avant de continuer l'extraction.

8. Prélever 500 µL de surnageant de lysat en faisant attention de ne pas prélever la résine au fond du cryotube. Déposer le surnageant sur une colonne de purification. Fermer chaque colonne de purification avec le bouchon du tube de récupération.
Remarque : Lors du pipetage, si de la résine est prélevée, relâcher les 500 µL dans le cryotube et laisser sédimenter la résine durant 5 min. environ ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.
9. Centrifuger 10 min à 6000 x g. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler de préférence à 20°C.
Remarque : En cas de colmatage, augmenter le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse de centrifugation.
10. Vider le tube de récupération de son contenu.
11. Répéter l'étape 8 en prélevant de nouveau 500 µL de surnageant et en les déposant sur la même colonne de purification.
12. Centrifuger 10 min à 6000 x g. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler de préférence à 20°C.
Remarques : • En cas de colmatage, augmenter le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse de centrifugation. • Vérifier que tout le surnageant est bien passé au travers la colonne. Si ce n'est pas le cas, centrifuger de nouveau. • Si après une seconde centrifugation la colonne reste colmatée, nous proposons un protocole alternatif pour la purification de l'échantillon. Se référer ci-dessous au paragraphe 4 «Extraction et purification de l'ADN pour échantillon colmatant».
13. Déposer 100 µL de réactif R2 dans la colonne de purification.
14. Jeter le tube de récupération. Couvrir la colonne de purification avec un tube de récupération propre, retourner l'ensemble.
15. Centrifuger 3 min à 1000 x g. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler de préférence à 20°C. Jeter la colonne de purification.
Remarque : A cette étape, le bouchon ne peut être fermé.
16. Conserver le tube de récupération 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.

4 - Extraction et purification d'ADN - Protocole court (hors cadre de la méthode certifiée NF VALIDATION)

A partir de cette étape, travailler avec des gants non poudres.

1. Plier délicatement la membrane en 2, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. schéma de pliage de la membrane en Annexe).
2. Avec les pinces, prendre la membrane et l'introduire dans un tube contenant les 1 mL de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du tube (cf. schéma de pliage de la membrane en Annexe)..
3. Placer les tubes 15 min dans un bain-sec agitateur-chauffant à 95°C - 1300 rpm.
4. Retirer la membrane à l'aide d'un cône stérile et l'essorer le long de la paroi du tube afin de récupérer tout le lysat. Jeter la membrane.
5. Centrifuger les tubes 3 min à 900 x g.
6. Prélever 500 µL de surnageant de lysat en faisant attention de ne pas prélever la résine au fond du tube. Déposer le surnageant sur une colonne de purification. Fermer chaque colonne de purification avec le bouchon du tube de récupération.
Remarque : Lors du pipetage, si de la résine est prélevée, relâcher les 500 µL dans le tube et laisser sédimenter la résine durant 5 min. environ ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.
7. Centrifuger 10 min à 6000 x g. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler de préférence à 20°C.
Remarque : En cas de colmatage, augmenter le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse de centrifugation.
8. Déposer 100 µL de réactif R2 dans la colonne de purification.

9. Jeter le tube de récupération. Couvrir la colonne de purification avec un tube de récupération propre, retourner l'ensemble.
10. Centrifuger 3 min à 1000 x g. Si la température de la centrifugeuse est programmable, la régler de préférence à 20°C. Jeter la colonne de purification.
Remarque : A cette étape, le bouchon ne peut être fermé.
11. Conserver le tube de récupération contenant les 100 µL de solution d'ADN purifiée. 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.

5 - Extraction et purification d'ADN pour échantillon colmatant (dans le cadre de la méthode certifiée NF VALIDATION)

1. Plier délicatement la membrane en 2, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. schéma de pliage de la membrane en Annexe).
2. Avec les pinces, prendre la membrane et l'introduire dans un cryotube contenant les 2 mL de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du cryotube (cf. schéma de pliage de la membrane en Annexe).
3. Bien vortexer pendant 20 sec.
Remarque : Vérifier que le filtre reste bien immergé dans la solution R1.
4. Placer les tubes 15 min dans un bain-marie à 95°C ± 5°C. Si le bain-marie dispose d'un couvercle, utilisez-le.
5. Vortexer pendant 20 sec.
6. La membrane doit être essorée et jetée. Transférer l'échantillon, ainsi que la résine dans un tube de 2 mL. Jeter le cryotube.
7. Ajouter 200 µL du tampon W2 froid (+4°C).
8. Vortexer pendant 5 secondes.
9. Laisser reposer le surnageant pendant 15 min à 4 ± 2°C (réfrigérateur).
10. Centrifuger 15 min à 12000 x g à 4°C.
11. Déposer 500 µL du surnageant dans la colonne de purification, sans vortexer le lysat. Fermer chaque colonne de purification avec le bouchon du tube de récupération.
Remarque : Lors du pipetage, si de la résine est prélevée, relâcher les 500 µL dans le tube et laisser sédimenter la résine durant 5 min. environ ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.
12. Centrifuger pendant 10 min à 6000 x g à 20°C.
Remarque: En cas de colmatage, augmenter le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse de centrifugation.
13. Vider le tube de récupération de son contenu.
14. Répéter l'étape 11 en prélevant de nouveau 500 µL du surnageant et en les déposant dans la même colonne de purification. Fermer avec le bouchon du tube de récupération.
15. Centrifuger à nouveau pendant 10 min à 6000 x g à 20°C.
Remarque : • En cas de colmatage, augmenter le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse de centrifugation. • Vérifier que tout le surnageant est bien passé au travers la colonne. Si ce n'est pas le cas, centrifuger de nouveau.
16. Vider le tube de récupération de son contenu.
17. Ajouter 250 µL de la solution R2 dans la colonne de purification.
18. Centrifuger pendant 5 min à 6000 x g à 20°C.
19. Ajouter 100 µL de la solution R2 dans la colonne de purification.
20. Jeter le flacon de récupération. Couvrir la colonne de purification avec un nouveau tube de récupération propre, retourner l'ensemble.
21. Centrifuger pendant 3 min à 1000 x g à 20°C. Jeter la colonne de purification.
Remarque : A cette étape, le bouchon ne peut être fermé.
22. Conserver le tube contenant 100 µL de la solution d'ADN purifiée. Utiliser 5 µL de cette solution pour chaque réaction de PCR en temps réel.
Le calcul du facteur Z est détaillé dans le paragraphe 8 (Z=36).
La solution d'ADN peut être conservée plusieurs mois à -20°C.

6 - Extraction et purification d'ADN pour échantillon colmatant - Protocole court (hors cadre de la méthode certifiée NF VALIDATION)

1. Plier délicatement la membrane en 2, trois fois de suite afin d'obtenir un cône (cf. schéma de pliage de la membrane en Annexe).
2. Avec les pinces, prendre la membrane et l'introduire dans un tube contenant les 1 mL de R1. La pointe du cône formée par la membrane après le pliage doit être dirigée vers le haut du tube (cf. schéma de pliage de la membrane en Annexe).
3. Placer les tubes 15 min dans un bain-sec agitateur-chauffant à 95°C - 1300 rpm.
4. Retirer la membrane à l'aide d'un cône stérile et l'essorer le long de la paroi du tube afin de récupérer tout le lysat. Jeter la membrane.
5. Vortexer pendant 20 sec.
6. Ajouter 100 µL du tampon W2 froid (+4°C).
7. Vortexer pendant 5 secondes.
8. Laisser reposer le surnageant pendant 15 min à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (réfrigérateur).
9. Centrifuger 15 min à 12000 x g à 4°C.
10. Déposer 500 µL du surnageant dans la colonne de purification, sans vortexer le lysat. Fermer chaque colonne de purification avec le bouchon du tube de récupération.
Remarque : Lors du pipetage, si de la résine est prélevée, relacher les 500 µL dans le tube et laisser sédimenter la résine durant 5 min. environ ou centrifuger à 900 x g pendant 3 min.
11. Centrifuger pendant 10 min à 6000 x g à 20°C.
Remarque: En cas de colmatage, augmenter le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse de centrifugation.
12. Ajouter 125 µL de la solution R2 dans la colonne de purification.
13. Centrifuger pendant 5 min à 6000 x g à 20°C.
14. Ajouter 100 µL de la solution R2 dans la colonne de purification.
15. Jeter le flacon de récupération. Couvrir la colonne de purification avec un nouveau tube de récupération propre, retourner l'ensemble.
16. Centrifuger pendant 3 min à 1000 x g à 20°C. Jeter la colonne de purification.
Remarque : A cette étape, le bouchon ne peut être fermé.
17. Conserver le tube contenant 100 µL de la solution d'ADN purifié. Utiliser 5 µL de cette solution pour chaque réaction de PCR en temps réel.
Le calcul du facteur Z est détaillé dans le paragraphe 8 (Z=36).
La solution d'ADN peut être conservée plusieurs mois à -20°C.

VIII - CALCUL DE LA FRACTION D'ÉCHANTILLON ANALYSÉE

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 quantification de la méthode globale, et permet de donner un résultat final en cas de test quantitatif. Il convient pour cela de calculer à chaque étape du protocole (concentration, élimination...) la fraction restante par rapport à l'échantillon de départ.

Le facteur Z correspond au **dénominateur** de la fraction analysée, et est spécifique de chaque protocole d'extraction.

1. Dans le cas où 1 L d'eau est filtré et 5µL of DNA sont analysés par PCR, la valeur du facteur Z du protocole Aquadien et Aquadien protocole court, est 32.

Elle est calculée de la manière suivante:

- Étape de filtration : 1000 mL d'eau sont filtrés sur les 1000 mL.
La fraction filtrée est de 1/1. $Z_1=1$
- Étape d'extraction et purification d'ADN : 1 mL du surnageant R1 sur les 1,6 mL est déposé sur la colonne.

La fraction purifiée est 1/1,6. $Z_2 = 1,6$

- Etape d'analyse par PCR : 5 µL sur les 100 µL d'ADN extraits sont analysées par PCR
La fraction analysée est 5/100 = 1/20. $Z_3 = 20$

Le facteur Z de la méthode globale Aquadien est $Z = Z_1 \times Z_2 \times Z_3 = 1 \times 1,6 \times 20 = 32$.
(Z représente la valeur F/V exprimée dans les tableaux d'expression des résultats des normes ISO TS 12869 et AFNOR T90-471)

Le résultat PCR brut doit être multiplié par 32 pour obtenir la quantité finale de bactéries continues dans l'échantillon d'eau initial, exprimé en Unités Génomiques (UG) par Litre d'eau.

Si le volume d'eau filtré est différent de 1 L, prenez-le en compte dans les calculs.

2. Dans le cas où 1 L d'eau est filtré et 5 µL of DNA sont analysés par PCR, la valeur du facteur Z du protocole Aquadien pour échantillon colmatant et Aquadien pour échantillon colmatant protocole court, est 36.

Elle est calculée de la manière suivante:

- Etape de filtration : 1 000 mL d'eau sont filtrés sur les 1000 mL.
La fraction filtrée est de 1/1. $Z_1 = 1$
- Etape d'extraction et purification d'ADN : 1 mL du surnageant R1 sur les 1,8 mL (1,6 mL de R1 + 0,2 mL de W2) est déposé sur la colonne.
La fraction purifiée est 1/1,8. $Z_2 = 1,8$
- Etape d'analyse par PCR : 5 µL sur les 100 µL d'ADN extraits sont analysées par PCR
La fraction analysée est 5/100 = 1/20. $Z_3 = 20$

Le facteur Z de la méthode globale Aquadien pour échantillon colmatant est :

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

(Z représente la valeur F/V exprimée dans les tableaux d'expression des résultats des normes ISO TS 12869 et AFNOR T90-471)

Le résultat PCR brut doit être multiplié par 36 pour obtenir la quantité finale de bactéries continues dans l'échantillon d'eau initial, exprimé en Unités Génomiques (UG) par Litre d'eau.

Si le volume d'eau filtré est différent de 1 L, prenez-le en compte dans les calculs.

Par exemple, si 100 mL sont filtrés, le facteur Z_1 sera égal à 10, et le facteur Z égal à 360.

IX - NF VALIDATION



BRD 07/15 – 12/07
BRD 07/16 – 12/07

METHODES D'ANALYSES
DE L'EAU

Certifié par
AFNOR Certification
<http://nf-validation.afnor.org>

AQUADIEN est utilisé dans le cadre des méthodes iQ-Check *Legionella* spp. et iQ-Check *Legionella pneumophila* certifiées NF VALIDATION selon le protocole de validation basé sur la norme NF T90-471 (June 2015) pour la détection et quantification de *Legionella* spp. ou *Legionella pneumophila* avec les kits de PCR en temps-réel iQ-Check *Legionella*.

La portée de validation a été étendue à la méthode de référence suivante: "ISO/TS 12869 (Novembre 2012) : Qualité de l'eau - Détection et quantification de *Legionella* spp. et/ou *Legionella pneumophilla* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)".

Attestations : iQ-Check *Legionella* spp. : **BRD 07/15 -12/07** ; iQ-Check *L. pneumophila* : **BRD 07/16 -12/07**.

Fin de validité: se référer à l'attestation disponible sur le site web de AFNOR Certification.

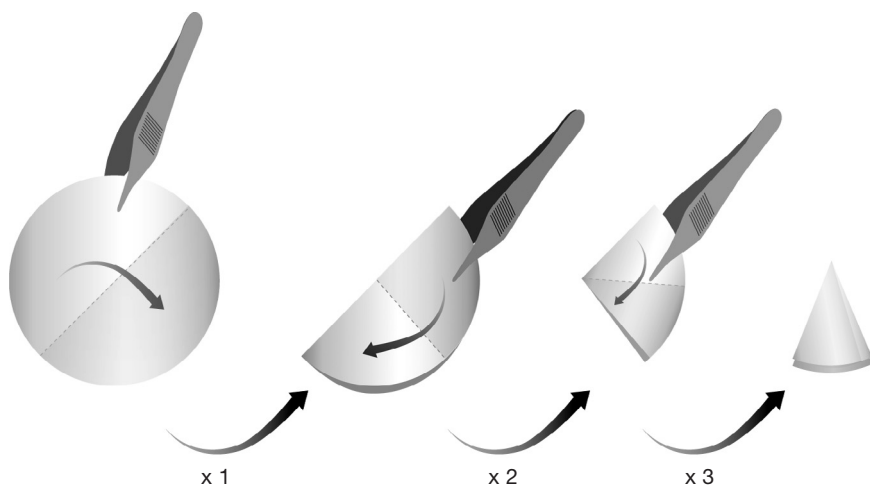
Information à l'acheteur :

Cryotube est une marque déposée de Nunc

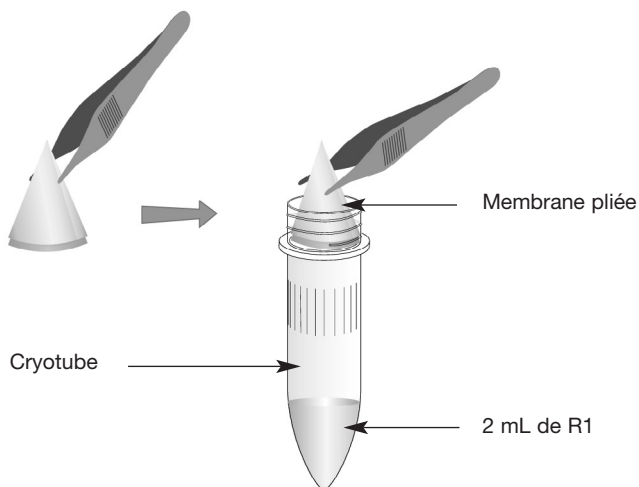
Aquadien est une marque déposée de Bio-Rad

ANNEXE

Schéma de pliage de la membrane



Plier délicatement la membrane en 2, trois fois de suite afin d'obtenir un cône.



Avec les pinces, prendre la membrane et l'introduire la pointe vers le haut dans un cryotube contenant les 2 mL de R1.



Bio-Rad Laboratories, Inc.
2000 Alfred Nobel Drive Hercules,
California 94547 - USA
Toll-Free Phone: 1-(800) 424-6723
Fax: (510) 741-5800

12/2015
Code: 881116