



**Méthodes d'analyse pour l'eau
Performances analytiques certifiées**

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE D'ANALYSE
SUIVANT LE PROTOCOLE DE VALIDATION PCR *Legionella***

N° attestation : BRD 07/15 – 12/07

Date de validation : 18.12.2007
Date de reconduction : 10.06.2011
Fin de validité : 18.12.2015

La Société **BIO-RAD**
(siège social, 3 Bd Raymond Poincaré
distributeur et 92430 MARNES LA COQUETTE
site de production)

est autorisée à faire référence à la marque **NF VALIDATION** pour la méthode d'analyse quantitative ci-dessous :

iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp (Ref. 357-8102)

Références du protocole :

- Aquadien™ (Réf 357-8121 : 808458 Rev C, 06/11
iQ-Check™ Quanti *Legionella* : 808467 Rev C, 06/11

DOMAINE D'APPLICATION

Prélèvements tous types d'eaux

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

La certification du kit porte sur l'utilisation avec les thermocycleurs Bio-Rad Chromo™4 et CFX96.

METHODE DE REFERENCE

Norme NF T 90-471, Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR), avril 2010



**La Directrice Générale
Florence MEAUX**

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp. est basée sur l'amplification et la détection de séquences spécifiques de *Legionella* par la technique PCR en temps réel.

Des échantillons d'eaux sont filtrés, puis l'ADN est extrait et purifié avec le kit Aquadien™. Une fraction de cet ADN est utilisée pour être amplifiée spécifiquement. Au cours des cycles d'amplification, une sonde oligonucléotidique, spécifique de la séquence amplifiée et marquée par un fluorophore, s'hybride avec les amplicons. Cette sonde n'émet de la fluorescence que si elle est hybridée aux amplicons, l'intensité de la fluorescence augmente ainsi avec la quantité d'amplicons dans le tube. C'est cette fluorescence qui est mesurée par le module optique associé au thermo-cycler. Le logiciel pilotant l'appareillage analyse les résultats, qui sont visualisés sous forme de courbes à interpréter.

L'utilisation d'une gamme d'ADN fournie avec le kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp. permet de quantifier l'ADN présent dans le tube de PCR.

NOTE (historique de la validation)

La méthode a été initialement validée en 2007. L'étude réalisée en 2010/2011 fait suite à des modifications apportées à la fois au kit validé et au protocole de validation (révision n°1 prenant en compte la norme NF T90-471 publiée en avril 2010)

Une étude tierce partie a porté sur les 2 premières phases du protocole de validation, afin de vérifier les performances annoncées par le fournisseur pour la nouvelle formulation du kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp :

- phase 1 : étude des limites de détection et de quantification de l'étape PCR, de la fonction de calibrage, du raccordement à l'étalon primaire, du rendement et de la robustesse de l'extraction en utilisant le kit Aquadien™.
- phase 2 : étude de l'inclusivité et de l'exclusivité, de la praticabilité et de la qualité des réactifs.
- L'étude interlaboratoire (réalisée en 2007) n'a pas été refaite.

Les modifications intervenues depuis la validation initiale sont les suivantes :

- Dans le kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp : l'origine de la Taq polymerase est différente. Au niveau de la chimie des sondes du contrôle interne, le fluorophore TEXAS RED a été remplacé par le fluorophore HEX.
- Dans le kit Aquadien™, la nouvelle version propose 2 modalités d'utilisation selon la filtrabilité des échantillons : un protocole classique et un protocole W2 pour échantillons colmatants. Pour l'étape de purification de l'ADN, la microfiltration double-tangentielle remplace la microfiltration horizontale. Les membranes et matériaux restent de même composition.
- Un nouveau thermocycleur BioRad a fait son apparition : le CFX96.

RACCORDEMENT DE LA SOLUTION CALIBRANTE ET DU MATERIAU DE REFERENCE A L'ETALON PRIMAIRE

Le raccordement de la solution calibrante de travail à l'étalon primaire est effectué pour couvrir le domaine de quantification.

D'une part, 3 gammes de solutions d'ADN calibré iQ-Check™ *Legionella* Quantification Standards, fourni avec le kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp et comprenant 4 niveaux de concentration d'unités génomes de *Legionella pneumophila* (QS1, QS2, QS3 et QS4) ont été analysées.

D'autre part, 3 gammes indépendantes d'étalon primaire ont été préparées, en ciblant les 4 niveaux de concentration de la gamme d'ADN calibré iQ-Check™ *Legionella* Quantification Standards.

Le raccordement du matériau de référence à l'étalon primaire est évalué en analysant les résultats de deux dépôts du matériau de référence fourni avec le kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp..

Les 6 gammes indépendantes obtenues et le matériau de référence ont été analysées avec le kit iQ-Check™ Quanti Legionella spp au cours de la même série d'amplifications sur le thermocycleur CFX96 et sur le thermocycleur Chromo 4.

Les paramètres analysés pour évaluer le raccordement des solutions calibrantes et du matériau de référence à l'étalon primaire sur le sont repris dans les tableaux suivants :

	Droite de régression	Corrélation	Efficacité (%)
Gamme de référence (CFX96)	$C(t) \text{ moyen} = -3,198 \cdot \log(x) + 39,076$	0,998	105,5
Gamme de référence (Chromo 4)	$C(t) \text{ moyen} = -2,891 \cdot \log(x) + 38,674$	0,995	121,75

Solution calibrante	Erreur de calibrage			
	QS1	QS2	QS3	QS4
Par niveau (CFX96)	0,07	0,20	0,14	0,07
Par niveau (Chromo 4)	0,03	0,30	0,23	0,16
Moyenne (CFX96)	0,12			
Moyenne (Chromo 4)	0,18*			
Equivalence des pentes (CFX96)	0,00			
Equivalence des pentes (Chromo 4)	0,13			

Matériau de référence	Erreur de calibrage
CFX96	0,19
Chromo 4	0,19

* Avec le thermocycleur Chromo 4, l'erreur de calibrage de la solution calibrante est de 0,18 log. Néanmoins, l'équivalence des pentes de la gamme de référence et de la solution calibrante est vérifiée.

Conclusion

- Sur le thermocycleur CFX96, la solution calibrante et le matériau de référence du kit iQ-Check™ Quanti Legionella spp satisfont les conditions de raccordement à l'étalon primaire.
- Sur le thermocycleur Chromo 4, la solution calibrante satisfait globalement les conditions de raccordement à l'étalon primaire. Le matériau de référence du kit iQ-Check™ Quanti Legionella spp satisfait les conditions de raccordement à l'étalon primaire.

FONCTION DE CALIBRAGE

L'étude de la fonction de calibrage a été réalisée en déposant 5 fois la gamme de solutions d'ADN calibré iQCheck™ Legionella Quantification Standards (comprenant les 4 niveaux de concentration d'unités génomes de *Legionella pneumophila*), fournie avec le kit iQ-Check™ Quanti Legionella spp.

Les 5 mesures ont été effectuées avec le kit iQ-Check™ Quanti Legionella spp pour chaque niveau de concentration dans des conditions de reproductibilité.

La droite de régression suivante a été obtenue : $C(t) \text{ moyen} = -3,197 \cdot \log(x) + 41,347$
Avec une efficacité de 105,5%.

Les valeurs estimées de performance de la régression linéaire, sont présentées dans le tableau suivant :

	QS1	QS2	QS3	QS4
Biais	0,06	-0,10	0,00	0,04
Ecart-type S	0,12	0,06	0,08	0,05
Exactitude de linéarité E_{LIN}	0,13	0,12	0,08	0,07
Incertitude de linéarité U_{LIN}	0,42	0,37	0,27	0,22

Conclusion

Sur chacun des niveaux de la gamme, la régression linéaire satisfait l'exigence d'exactitude inférieure ou égale à 0,15.

La linéarité est donc vérifiée sur tout le domaine couvert par la gamme de solutions d'ADN calibré iQ-Check™ Legionella Quantification Standards fournie avec le kit iQ-Check™ Quanti Legionella spp.

RENDEMENT ET ROBUSTESSE DE L'EXTRACTION

Pour chaque protocole d'extraction, l'étude du rendement a été effectuée sur 10 échantillons indépendants, à deux niveaux de contamination artificielle (1000 et 100 000 UG/PCR), ceci pour trois matrices différentes (une eau minérale, une eau chaude sanitaire, une eau de tour aéro-réfrigérante), soit 60 échantillons pour chacun des protocoles.

Chacune des eaux a été testée préalablement pour être exempte d'acides nucléiques de *Legionella*. Les échantillons ont été artificiellement contaminés par une suspension mère constituée à partir d'une souche de *L. pneumophila* (souche ATCC33152).

Les principaux résultats obtenus figurent dans le tableau suivant :

Type d'eau	Niveau de contamination visé (UG/L)	Protocole Aquadien		Protocole Aquadien W2	
		Rendement (log)	Moyenne du rendement (log)	Rendement (log)	Moyenne du rendement (log)
Eau Chaude Sanitaire	1 000	-0,29	-0,34	-0,16	-0,30
	100 000	-0,39		-0,45	
Tour Aéro-réfrigérante	1 000	-0,09	-0,20	-0,45	-0,46
	100 000	-0,31		-0,47	
Eau minérale	1 000	-0,25	-0,33	-0,55	-0,50
	100 000	-0,42		-0,46	
Rendement moyen		-0,29		-0,41	
Variance		0,04		0,03	
Incertitude globale élargie		0,71		0,89	

Conclusion

Le rendement moyen obtenu est de -0,29 log par la méthode Aquadien et -0,41 log par la méthode Aquadien W2 (échantillons colmatants).

LIMITE DE DETECTION DE LA PCR (LD_{PCR})

L'étude des performances du kit iQ-Check™ Legionella spp. a été réalisée avec l'ADN de *Legionella pneumophila*.

30 dilutions d'ADN à 5 UG/PCR ont été testées en duplicat dans un même run avec le kit iQ-Check™ Quanti Legionella spp. 100% des duplicats donnent des résultats positifs.

La limite de détection été évaluée avec le thermocycleur CFX96. Elle n'a pas été recalculée pour la nouvelle version du kit avec le thermocycleur Chromo™ 4..

Conclusion

La limite de détection du kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp est de 5 UG/PCR

LIMITE DE QUANTIFICATION DE LA PCR (LQ_{PCR})

La limite de quantification a été évaluée en utilisant 30 solutions indépendantes d'ADN de *Legionella pneumophila* à 15 UG/PCR, amplifiées simultanément en duplicat dans un même run de PCR avec le kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp.

La limite de quantification a été évaluée avec le thermocycleur CFX96. Elle n'a pas été recalculée pour la nouvelle version du kit avec le thermocycleur Chromo™ 4.

Les valeurs suivantes ont été obtenues avec le thermocycleur CFX96 :

	iQ-Check™ Quanti <i>Legionella</i> spp	Valeurs théoriques ou critères de validation
Moyenne Log (UG/puits)	1,309	1,279
Ecart-type Log (UG/puits)	0,097	
Biais Log (UG/puits)	0,030	
Exactitude de LQ (E _{LQ})	0,101	0,15
Incertitude de LQ (U _{LQ})	0,207	

La vérification de la limite de quantification consiste à s'assurer que l'exactitude au niveau de la limite de quantification (E_{LQ}) est inférieure à la valeur critique de 0,15.

Conclusion

La limite de quantification à 15 UG/PCR du kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp est vérifiée.

SPECIFICITE du kit iQ-Check Quanti *Legionella* spp.

Pour chacune des souches testées, l'ADN a été extrait à partir d'une suspension bactérienne pure en utilisant le protocole d'extraction **Aquadien option W2** pour échantillon colmatant, puis l'amplification a été réalisée avec le kit iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp.

- **Tests d'inclusivité** sur 15 souches représentatives des 15 sérogroupes de *L. pneumophila* et sur 20 souches appartenant au genre *Legionella*. Les résultats sur toutes ces souches ont été positifs.
- **Tests d'exclusivité** sur 16 souches non *Legionella*. Cinq extraits d'ADN ont été amplifiés mais à des niveaux très faibles (quantité initiale estimée à moins de $3,02 \cdot 10^{-2}$ UG/puits). Les autres extraits n'ont pas été amplifiés (pas de réactions croisées).

PRATICABILITE

- **Facilité d'utilisation** : les réactifs sont tous fournis dans les kits, et sont prêts à l'emploi. Les séries d'analyse de 1 à 30 échantillons, dans le cadre d'une quantification, sont faciles à gérer. Un technicien connaissant les techniques de microbiologie, biologie moléculaire ainsi que le thermocycleur et son logiciel peut être formé en 1 jour.
- **Rendu de résultats rapide** : la durée des différentes phases est compatible avec un délai de rendu des résultats court (5 heures).
- **Sécurisation des résultats** : elle est garantie par l'utilisation d'un contrôle interne d'inhibition (dans le même puits que l'échantillon), et par un logiciel d'analyse des résultats. L'utilisation du logiciel assure en outre la traçabilité complète des informations.

ETUDE INTERLABORATOIRE

Une étude inter-laboratoire a été réalisée en 2007, avec 14 laboratoires collaborateurs. Les résultats d'un laboratoire n'ont pas été pris en compte en raison d'un problème technique ayant conduit à l'invalidation de l'étalonnage. Au final, 13 laboratoires ont été retenus pour l'exploitation statistique.

La finalité de cette étude est d'évaluer la fidélité (répétabilité et reproductibilité) de la méthode iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp :

- pour l'étape d'amplification génique seule (envoi de deux solutions d'ADN de *L. anisa* et *L. pneumophila* sg1 à deux niveaux de concentration différents);
- pour l'ensemble de l'analyse (concentration, lyse, extraction, purification et amplification génique) sur des suspensions bactériennes caractérisées de *L. pneumophila* et *Escherichia coli* (CIP 54.8) à 2 niveaux de concentration différents;
- pour l'ensemble de l'analyse en situation réelle (eau chaude sanitaire naturellement contaminée en *L. pneumophila* et *Legionella non pneumophila*).

Egalement, une eau garantie sans ADN de *Legionella* a été envoyée.

Résultats

	Type d'échantillons	Solution d'ADNs calibrés		Eau de distribution dopée		Echantillon naturel
		2000 UG/µl	20000 UG/µl	4000 UG/200 ml	40000 UG/200 ml	
Niveaux de dopage (UG/L)	<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	2000 UG/µl	20000 UG/µl	4000 UG/200 ml	40000 UG/200 ml	Eau chaude sanitaire naturellement contaminée
	<i>L. anisa</i>	500 UG/µl	5000 UG/µl	1000 UG/200 ml	10000 UG/200 ml	
	<i>E. coli</i>			5000 UG/200 ml	50000 UG/200 ml	
Nombre de laboratoires	participant	14	14	14	14	14
	retenus	13	13	13	13	13
Test d'homogénéité	Nbre d'analyses	20	20	9	9	9
	Moyenne (Log)	2.91	3.97	3.42	4.41	3.76
Résultats	Moyenne (Log)	3.02	4.11	3.52	4.47	3.69
	r (Log)	0.18	0.15	0.28	0.34	0.46
	R (Log)	0.43	0.32	0.72	0.66	0.8
	S _r (Log)	0.06	0.06	0.10	0.12	0.16
	S _R (Log)	0.14	0.10	0.24	0.20	0.23

Les valeurs de répétabilité en r (Log), se situent autour de 0.15 pour les solutions d'ADN (étape de PCR uniquement), et autour de 0.3 pour les suspensions bactériennes (méthode globale), ce qui est acceptable. Cela signifie qu'au sein d'un même laboratoire, on s'attend à des écarts de mesure, sur un même échantillon, de l'ordre d'un facteur 2. La répétabilité n'apparaît donc pas comme une source majeure d'erreur.

Les valeurs de reproductibilité en R (Log) se situent autour de 0.4 pour les solutions d'ADN (étape de PCR uniquement), et autour de 0.7 pour les suspensions bactériennes (méthode globale). Par rapport à la répétabilité, cet ordre de grandeur reste conforme à ce que l'on a l'habitude de rencontrer en analyse microbiologique de l'environnement. Ce qui signifie qu'entre deux laboratoires, on s'attend à des écarts de mesure, sur un même échantillon, de l'ordre d'un facteur 5. La reproductibilité ne participe donc pas de manière démesurée à la dispersion des résultats.

CONCLUSION GENERALE

Les performances de la méthode iQ-Check™ Quanti *Legionella* spp. sont conformes aux exigences de la norme NF T90-471.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org