



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 07/16 – 12/07

Date de validation : 18.12.2007  
Fin de validité : 18.12.2012

**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 **AFNOR VALIDATION** pour la méthode d'analyse quantitative ci-dessous :

**iQ-Check™ *Legionella pneumophila* (Ref. 357-8103)**

**Références du protocole :** *N° version notice d'utilisations :*

Aquadien™ :                    808458 Rev 1, 02/06  
iQ-Check™ *Legionella* :        808467 Rev 1.1, 10/07

**DOMAINE D'APPLICATION**

Prélèvements tous types d'eaux

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune

**METHODE DE REFERENCE**

Norme XP T 90-471, Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), Avril 2006

Le Directeur Général Délégué  
Jacques **BESLIN**

**AFNOR Certification**

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France  
Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France  
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 91 91  
[www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode iQ-Check™ *Legionella pneumophila*. est basée sur l'amplification et la détection de séquences spécifiques de Legionelle 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™ *Legionella pneumophila*. permet de quantifier l'ADN présent dans le tube de PCR.

## NOTE

Le kit a été validé sur les trois thermocycleurs Bio-Rad iCycler-iQ™, Chromo™4 et iQ™5.

## RENDEMENT OPTIMAL DE LA METHODE

L'étude du rendement est effectuée sur 6 échantillons indépendants, à trois niveaux de contamination, ceci pour trois matrices différentes (une eau minérale témoin (eau d'Evian), une eau chaude sanitaire, une eau de tour aéro-réfrigérante).

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 T)

Type d'eau	Niveau de contamination visé (UG)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%)	Rendement moyen par type d'eau (%)	Biais moyen par type d'eau	Ecart-type du biais
Eau d'Evian	1 000	123	110	0.018	0.148
	10 000	110			
	100 000	97			
Eau Chaude Sanitaire	1 000	113	105	-0.029	0.220
	10 000	118			
	100 000	83			
Tour Aéro-réfrigérante	1 000	65	68	-0.198	0.170
	10 000	63			
	100 000	76			

### Conclusion

Le rendement moyen obtenu par la méthode est de 94%  
Ces données sont conformes aux performances annoncées par le fournisseur.

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

L'étude des performances du kit iQ-Check™ *Legionella pneumophila* a été réalisée avec l'ADN de *Legionella pneumophila* (souche ATCC33152 T).

30 dilutions d'ADN à 5 UG/PCR ont été testées en duplicats dans un même run. 100% des duplicats donnent des résultats positifs.

### Conclusion

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

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

La limite de quantification de 15 UG/PCR a été testée en utilisant 30 solutions d'ADN indépendantes testées en duplicat, dans un même run de PCR, réalisées à partir d'une solution d'ADN calibrée de *Legionella pneumophila* (souche ATCC33152 T)

Résultats obtenus pour le Thermocycler Chromo4™ :

	Valeur cible (UG/PCR)	Valeur cible (log)	Moyenne observée sur 30 mesures	Biais (log)	Ecart type de fidélité	Test de justesse	Incertitude de mesure
Critères					<0,122	< 2,045	<0,15
Résultats	15	1,176	15	0	0,062	0,4	0,0045
Conclusion					Conforme	Conforme	Conforme

Des résultats similaires ont été obtenus pour les autres thermocyclers de Bio-rad : iCycler-iQ™, et iQ™5.

### Conclusion

Les résultats des tests sur la limite de quantification à 15 UG/PCR sont satisfaisants.

## LINEARITE

L'étude de linéarité a été effectuée avec 5 répétitions de la gamme fournie avec les kits iQ-Check™ *Legionella pneumophila*. La gamme comporte 4 niveaux de concentration d'ADN : 15, 300, 3 000 et 30 000 UG/PCR.

Résultats obtenus pour le Thermocycler Chromo4™ :

Equation de la fonction d'étalonnage			
Pente / Efficacité	Domaine acceptable	Ordonnée à l'origine	Conclusion
-3.388	-4.115<p>-2.839	40.9	Acceptable
Analyse statistique du modèle linéaire			
Origine	Valeur observée	Valeur critique avec $\alpha = 5\%$	Conclusion
F du modèle de régression	3850.77	4.49	Acceptable
F du modèle d'étalonnage	0.968	3.63	Acceptable

Des résultats similaires ont été obtenus pour les autres thermocyclers de Bio-rad : iCycler-iQ™, et iQ™5.

### Conclusion

La fonction d'étalonnage du kit iQ-Check Quanti *Legionella pneumophila* est conforme aux critères d'acceptation définis dans le protocole de validation.

## SPECIFICITE du kit iQ-Check Quanti *Legionella pneumophila*

Des tests ont été effectués sur l'ensemble des souches listées dans le protocole AFNOR Validation.

### Tests d'inclusivité

Les essais d'inclusivité ont été effectués sur 15 souches représentatives des 15 sérogroupes de *L. pneumophila*. Les résultats sur toutes ces souches ont été positifs.

### Tests d'exclusivité

L'analyse de l'ADN de 16 souches n'appartenant pas au genre *Legionella* et de 20 souches *Legionella* autres que *pneumophila* n'ont pas mis en évidence la présence 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 H).
- **Sécurisation des résultats** : elle est garantie par l'utilisation d'UNG (pour éviter les contaminations) et par un contrôle interne d'inhibition (dans le même puits que l'échantillon), ainsi que 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™ *Legionella pneumophila* :

- 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
Niveaux de dopage	<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)	2.93	3.96	3.40	4.44	3.18
	r (Log)	0.18	0.08	0.23	0.20	0.62
	R (Log)	0.20	0.15	0.96	0.84	0.87
	S <sub>r</sub> (Log)	0.06	0.03	0.1	0.07	0.22
	S <sub>R</sub> (Log)	0.04	0.05	0.24	0.29	0.21

Les valeurs de répétabilité  $r(\text{Log})$  se situent autour de 0.1 pour les solutions d'ADN (étape de PCR uniquement), et autour de 0.2-0.6 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 2.5. La répétabilité n'apparaît donc pas comme une source majeure d'erreur.

*A titre d'information, cette valeur se situe autour de 5 pour la méthode de culture pour 1 000 UFC par prise d'essai, et de 2,5 pour 10 000 UFC par prise d'essai (Rapport AGLAE, étude interlaboratoire 2005).*

Les valeurs de reproductibilité  $R(\text{Log})$  se situent autour de 0.2 pour les solutions d'ADN (étape de PCR uniquement), et autour de 0.9 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 8. La reproductibilité ne participe donc pas de manière démesurée à la dispersion des résultats.

*A titre d'information, cette valeur se situe autour de 10 pour la méthode de culture pour 1 000 UFC par prise d'essai, et de 8 pour 10 000 UFC par prise d'essai (Rapport AGLAE, étude interlaboratoire 2005).*

## CONCLUSION GENERALE

Les performances de la méthode iQ-Check™ *Legionella pneumophila* sont conformes aux exigences de la norme XP 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](http://www.afnor-validation.org)