

Validation AFAQ-AFNOR de la méthode
iQ-Check™ Legionella spp
pour la détection et la quantification de *Legionella* dans le
domaine des eaux

Rapport de synthèse

Etude réalisée par :
Eurofins Environnement
9, avenue de la Laponie
91967 Les Ulis

SOMMAIRE

1.	Objet de l'étude	3
1.1.	Référentiel de validation	3
1.2.	Principe de la méthode iQ-Check <i>Legionella</i> spp.....	3
2.	Résultats de l'étude préliminaire	4
2.1.	Rendement optimal de la méthode	4
2.2.	Limite de détection de la PCR (LD_{PCR})	4
2.3.	Limite de quantification de la PCR (LQ_{PCR})	5
2.4.	Linéarité de la quantification	6
2.5.	Inclusivité et exclusivité	7
2.6.	Praticabilité.....	8
3.	Etude inter-laboratoire	9
3.1.	Objectif	9
3.2.	Plan d'essai et analyses réalisées	9
3.2.1.	Plan d'essai	9
3.2.2.	Contrôle de la qualité des matériaux.....	9
3.2.3.	Exploitation statistique des données	10
3.3.	Résultats	10
3.3.1.	Contrôle de la qualité des matériaux.....	10
3.3.2.	Répétabilité et Reproductibilité	11
4.	Conclusion de l'étude de validation	12

1. Objet de l'étude

L'étude présentée rentre dans le cadre de la certification par AFAQ-AFNOR de la méthode iQ-Check *Legionella* pour la détection et la quantification de *Legionella* spp. par PCR dans le domaine des eaux.

Un protocole en trois phases a été mis en place pour la validation de ce type de méthode, « Protocole de validation pour les kits de détection et de dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) (Révision 0 adoptée par AFAQ AFNOR Certification le 26.09. 2006) ». Les phases 1 et 2 permettent l'étude, par un laboratoire expert, des performances annoncées par le fournisseur. En particulier, sont examinés le rendement d'extraction, les limites de détection et de quantification de l'étape PCR, la linéarité de la quantification, l'inclusivité et l'exclusivité de la détection et quantification, ainsi que la praticabilité. La phase 3 comprend une étude inter-laboratoire pour évaluer, par une analyse statistique des résultats obtenus, la fidélité (répétabilité et reproductibilité) de la méthode et du protocole du fournisseur.

Le présent rapport présente les résultats de ces 3 phases pour la méthode iQ-Check *Legionella* spp. Le chapitre 2 fournit les résultats obtenus par le laboratoire expert lors phases 1 et 2. Le chapitre 3 résume les résultats obtenus lors de l'étude inter-laboratoire.

1.1. Référentiel de validation

Le protocole AFAQ/AFNOR de validation est basé sur les critères, plans d'expérience et modes de calcul définis dans la norme AFNOR XP T 90-471 (Avril 2006) concernant le dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR).

1.2. Principe de la méthode iQ-Check *Legionella* spp

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

Après filtration d'un échantillon d'eau, l'ADN des bactéries est extrait et purifié avec le kit Aquadien™. L'extraction de l'ADN repose sur une lyse alcaline et un choc thermique, elle est suivie d'une purification par ultrafiltration. Une fraction de cet extrait d'ADN est utilisée pour être amplifiée spécifiquement par PCR en temps réel en utilisant les kits iQ-Check Quanti *Legionella* spp. Au cours des cycles d'amplification, une sonde oligonucléotidique appelée Molecular Beacon, 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, ainsi l'intensité de la fluorescence augmente en cours d'amplification avec la quantité d'amplicons dans le tube. C'est cette fluorescence qui est mesurée par le module optique associé au thermocycleur. Le logiciel pilote l'appareillage, permet l'interprétation des courbes et l'analyse des résultats.

L'utilisation de standards de quantification de concentration en ADN connue, fournis avec les kits iQ-Check Quanti *Legionella* spp. permet de quantifier l'ADN présent dans le tube de PCR.

Les kits ont été validés sur les trois thermocycleurs, iCycler-iQ™, Chromo4™ et iQ5™.

2. Résultats de l'étude préliminaire

2.1. Rendement optimal de la méthode

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), soient 54 échantillons au total.

L'absence d'acides nucléiques de *Legionella* a été testée préalablement sur chacune des eaux. Les échantillons ont été artificiellement contaminés par une suspension mère constituée à partir d'une souche de *L. pneumophila* (souche ATCC33152 T). La concentration en UG de cette suspension a été déterminée selon le protocole de lyse directe préconisé dans le protocole de validation. Aucune inhibition sur cet extrait issue de la lyse directe n'a été détectée.

Type d'eau	Niveau de contamination visé (UG)	Moyenne du rendement par niveau de contamination (%) (n=6)	Moyenne du rendement par type d'eau (%) (n=18)	Moyenne du rendement (kit Aquadien,%) (n=54)
Eau d'Evian	1 000	123	110	94
	10 000	110		
	100 000	97		
Eau Chaude Sanitaire	1 000	113	105	
	10 000	118		
	100 000	83		
Tour Aéro-réfrigérante	1 000	65	68	
	10 000	63		
	100 000	76		

Conclusion sur le rendement

Le rendement moyen obtenu par la méthode est de 94%, valeur supérieure au rendement de 70% annoncé par le fournisseur.

2.2. Limite de détection de la PCR (LD_{PCR})

La limite de détection a été évaluée sur des solutions de 5 UG/PCR. 30 solutions ont été testées en duplicats, et ce sur chacun des 3 thermocycleurs.

	iCycler-iQ	Chromo4	iQ5
Echantillons négatifs (N)	0	0	0
Echantillons positifs (N)	30	30	30
Echantillons positifs (%)	100 %	100 %	100 %
Conclusion	Conforme	Conforme	Conforme

Conclusion sur la LD_{PCR}

La limite de détection du kit iQ-Check *Legionella* spp est de 5 UG par puits PCR quelque soit le thermocycleur.

2.3. 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.

• Limite de quantification sur appareil iCycler-iQ

	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	18,17	0,083	0,08	5,168	0,076
Conclusion					Conforme	Acceptable	Conforme

• Limite de quantification sur appareil iQ5

	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	17,79	0,074	0,083	4,388	0,106
Conclusion					Conforme	Acceptable	Conforme

• Limite de quantification sur appareil 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	14,85	0,074	0,047	0,805	0,047
Conclusion					Conforme	Conforme	Conforme

Conclusion sur la LQ_{PCR}

La commission T 90-E (Détection des *Legionella*, méthodes alternatives) a modifié les critères de validation de la LQ_{PCR} pour la prochaine version de la norme XP T 90-471. L'incertitude de mesure remplacera l'écart-type de fidélité et le test de justesse. Ceci a été approuvé par le bureau technique pour la validation des kits commerciaux.

Selon ce critère, les résultats des tests sur la limite de quantification à 15 UG/PCR pour la cible *Legionella* spp. sont satisfaisants pour les trois thermocycleurs.

2.4. Linéarité de la quantification

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

• Etude de la linéarité de la quantification sur appareil iCycler-iQ

Equation de la fonction d'étalonnage			
Pente / efficacité (%)	Domaine acceptable	Ordonnée à l'origine	Conclusion
-3,426 / 95.83	-4,115 < P > -2,839	39,83	Acceptable
Analyse statistique du modèle linéaire			
Origine	Valeur observée	Valeur critique avec a =	Conclusion
F du modèle de régression	3012.57	4.49	Acceptable
F du modèle d'étalonnage	2.943	3.63	Acceptable

• Etude de la linéarité de la quantification sur appareil iQ5

Equation de la fonction d'étalonnage			
Pente / efficacité (%)	Domaine acceptable	Ordonnée à l'origine	Conclusion
-3,187 / 105.96	-4,115 < P > -2,839	37,60	Acceptable
Analyse statistique du modèle linéaire			
Origine	Valeur observée	Valeur critique avec a =	Conclusion
F du modèle de régression	1611.20	4.49	Acceptable
F du modèle d'étalonnage	0.953	3.63	Acceptable

• Etude de la linéarité de la quantification sur appareil Chromo4

Equation de la fonction d'étalonnage			
Pente / efficacité (%)	Domaine acceptable	Ordonnée à l'origine	Conclusion
-3,285 / 101.56	-4,115 < P > -2,839	40,00	Acceptable
Analyse statistique du modèle linéaire			
Origine	Valeur observée	Valeur critique avec a =	Conclusion
F du modèle de régression	12590.82	4.49	Acceptable
F du modèle d'étalonnage	0.402	3.63	Acceptable

Conclusion sur la linéarité de la quantification

La linéarité de la quantification est validée selon les critères de la norme XP T 90-471 pour les 3 thermocycleurs testés.

2.5. Inclusivité et exclusivité

• Tests d'inclusivité

Les essais d'inclusivité ont été effectués sur des extraits d'ADN de façon à obtenir environ 100 UG par puits. Ils ont été effectués sur 20 souches de *Legionella* species et sur 15 souches représentatives des 15 sérogroupes de *L. pneumophila*. Les résultats obtenus sur toutes ces souches ont été positifs.

Souche	test	Souche	test	Souche	test
<i>L. anisa</i>	+	<i>L. feeleeii</i> 1-2	+	<i>L. micdadei</i>	+
<i>L. birminghamsis</i>	+	<i>L. gormanii</i>	+	<i>L. oackridgensis</i>	+
<i>L. bozemanii</i> 1-2	+	<i>L. hackeliae</i> 1-2	+	<i>L. parisiensis</i>	+
<i>L. cherrii</i>	+	<i>L. jordanis</i>	+	<i>L. pneumophila</i> 1 à 15	+
<i>L. cincinnatiensis</i>	+	<i>L. lansingensis</i>	+	<i>L. sainthelensi</i> 1-2	+
<i>L. dumofii</i>	+	<i>L. longbeachae</i> 1-2	+	<i>L. tucsonensis</i>	+
<i>L. erythra</i> 2	+	<i>L. maceachernii</i>	+	<i>L. wadsworthii</i>	+

• Tests d'exclusivité

Les essais d'exclusivité ont été effectués sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum 10 000 UG par puits. Les tests ont été effectués sur les 16 souches non *Legionella* prévues dans le protocole de validation et n'ont pas donné d'amplification.

Souche	test	Souche	test	Souche	test
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	<i>Flavobacterium</i>	-	<i>Pseudomonas putida</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Clostridium</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		

Conclusion sur la spécificité du kit

Tous les tests effectués sur toutes les souches listées dans le protocole de validation AFNOR ont conduit aux résultats attendus en termes d'inclusivité ou d'exclusivité.

2.6. Praticabilité

La praticabilité est étudiée sur 18 critères.

Critère évalué	Résultat
1. Mode de conditionnement des réactifs : Contenu du kit Aquadien	- Réactif de lyse R1 - Solution d'élution R2 - Cryotubes - Colonnes de purification - Flacons de récupération
Contenu des kits PCR	- Sondes fluorescentes - Solution d'amplification - Contrôle négatif - Standards de quantification Qs1 à Qs4 fournis avec les formats quantification
2. Volume des réactifs	Spécifiés dans la notice
3. Conditions de stockage des éléments et péremption des produits non ouverts	2 à 8°C, date de péremption indiquée sur les kits et les flacons
4. Modalités d'utilisation après première utilisation	Réactifs utilisés jusqu'à épuisement
5. Equipements ou locaux spécifiques nécessaires	Indiqués sur notices
6. Réactifs prêts à l'emploi : Kit Aquadien	Réactifs prêts à l'emploi
Kits PCR	Préparation du mélange réactionnel décrit dans la notice
7. Durée de formation d'un opérateur	Selon la formation initiale, entre 1 jour et une semaine.
8. Délai d'obtention des résultats	5 heures pour 1 échantillon, + 3 heures si dilution pour inhibition
9. Temps réel de manipulation	Pour 10 échantillons, 60 minutes si filtration rapide (selon eau)
Possibilité d'arrêt	Pendant ou après l'extraction
10. Qualification de l'opérateur	Technicien qualifié en biologie moléculaire
11. Tracabilité des résultats	Résultats stockés sous forme de fichiers informatiques
12. Maintenance par le laboratoire	Aucune
13. Volume minimal à pipeter	5 µl
14. Stabilité des réactifs et des gammes	Date de péremption indiquée sur le kit
15. UNG	Présence
16. Protection des réactifs aux UV	Protection des réactifs aux UV dans coffret carton
17. Contrôle externe quantitatif de la PCR	Non contenu dans les kits, utilisable avec une gamme de standards d'un lot différent
18. Contrôle d'absence d'inhibiteur	Par analyse du résultat du contrôle interne

Conclusion sur la praticabilité

- **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 (<24H).
- **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.

3. Etude inter-laboratoire

3.1. Objectif

La finalité de cette étude est d'évaluer la fidélité (répétabilité et reproductibilité) des kits :

- pour l'étape d'amplification génique seule (dosage de solutions d'ADN prêtes à amplifier).
- pour l'ensemble de l'analyse (concentration, lyse, extraction, purification et amplification génique) sur des suspensions bactériennes caractérisées ;
- pour l'ensemble de l'analyse en situation réelle (eau chaude sanitaire naturellement contaminée, choisie pour sa représentativité).

3.2. Plan d'essai et analyses réalisées

3.2.1. Plan d'essai

Le plan d'essai reposait sur l'envoi simultané de 6 matériaux à 14 laboratoires indépendants situés dans 5 pays.

- Les deux premiers matériaux, notés « solution d'ADN A » et « solution d'ADN B », ont été préparés par dilution d'une même solution mère contenant deux extraits purifiés d'ADN (méthode Aquadien™) de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 (souche ATCC 33152) et de *Legionella anisa* (souche CIP 103870).
- Les deux matériaux suivants, notés « suspension **S1** » et « suspension **S2** », ont été préparés à partir d'une même suspension mère réalisée à partir de
 - une culture de *L. pneumophila* séro groupe 1 (souche ATCC 33152)
 - une culture de *L. anisa* (souche CIP 103870);
 - une culture d' *Escherichia coli* (souche CIP 54.8) .
- Le cinquième matériau, noté « échantillon naturel **EN** », était une eau chaude sanitaire naturellement contaminée en *L. pneumophila* et *Legionella non pneumophila*. Ces flacons ont alternativement été étiquetés « **D** » et « **E** ».
- Le dernier matériau, noté « contrôle négatif Cnég » était une eau garantie sans ADN de *Legionella*. Les flacons de ce lot ont tous été étiquetés « **ENC** ».

3.2.2. Contrôle de la qualité des matériaux

Les solutions d'ADN A et B ont fait l'objet d'un contrôle d'homogénéité de lot.

Les suspensions S1 et S2, l'échantillon naturel EN, et le contrôle négatif Cnég ont fait l'objet d'un contrôle d'homogénéité et de stabilité de lot.

3.2.3. Exploitation statistique des données

- L'exploitation complète a consisté en l'ajustement de la dispersion des données observées à un modèle linéaire intégrant des variables aléatoires Normales.

3.3. Résultats

3.3.1. Contrôle de la qualité des matériaux

Les 6 matériaux présentaient un niveau satisfaisant d'homogénéité de lot et de stabilité.

3.3.2. Répétabilité (r) et Reproductibilité (R)

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus pour 13 laboratoires (données non exploitables pour 1 laboratoire).

<i>Legionella</i> spp.		(UG)	log(UG)
ADN A	Lim inf	809	2.91
	Moyenne	1037	3.02
	Lim sup	1328	3.12
	Ratio r	1.5	0.18
	Ecart-type r	186	0.06
	Ratio R	2.7	0.43
	Ecart-type R	321	0.14
ADN B	Lim inf	10752	4.03
	Moyenne	12806	4.11
	Lim sup	15253	4.18
	Ratio r	1.4	0.15
	Ecart-type r	1700	0.06
	Ratio R	2.1	0.32
	Ecart-type R	2590	0.10
Suspension S1	Lim inf	2223	3.35
	Moyenne	3345	3.52
	Lim sup	5033	3.70
	Ratio r	1.9	0.28
	Ecart-type r	589	0.10
	Ratio R	5.3	0.72
	Ecart-type R	1906	0.24
Suspension S2	Lim inf	20358	4.31
	Moyenne	29305	4.47
	Lim sup	42183	4.63
	Ratio r	2.2	0.34
	Ecart-type r	9110	0.12
	Ratio R	4.6	0.66
	Ecart-type R	13650	0.20
Echantillon Naturel EN	Lim inf	3225	3.51
	Moyenne	4842	3.69
	Lim sup	7270	3.86
	Ratio r	2.9	0.46
	Ecart-type r	1970	0.16
	Ratio R	6.3	0.80
	Ecart-type R	2480	0.23

Le ratio r est le rapport maximum attendu entre deux valeurs obtenues en condition de répétabilité ($p < 0,05$).

Le ratio R est le rapport maximum attendu entre deux valeurs obtenues en condition de reproductibilité ($p < 0,05$).

Les valeurs de r, qui représente la répétabilité, se situent autour de 1.5 pour les solutions d'ADN (étape de PCR uniquement), et autour de 2 pour les suspensions bactériennes (méthode globale), ce qui est tout à fait acceptable. Ce qui 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.

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 inter-laboratoire 2005).

Les valeurs de R, qui représente la reproductibilité, se situent autour de 2.5 pour les solutions d'ADN (étape de PCR uniquement), et autour de 5 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.

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 inter-laboratoire 2005).

Conclusion de l'étude inter- laboratoire

La dispersion des résultats est tout à fait acceptable.

4. Conclusion globale de l'étude de validation

Les résultats du Laboratoire Expert ainsi que de l'étude inter-laboratoire montrent des performances conformes aux exigences de la norme XP T 90-471 pour la méthode iQ-Check Quanti *Legionella* spp. En donnant un résultat fiable en quelques heures sans besoin de confirmation, cette méthode s'avère particulièrement intéressante pour un suivi rapide des eaux environnementales.

En conclusion de cette validation, la méthode iQ-Check Quanti *Legionella* spp a reçu le 18 décembre 2007 la certification AFAQ-AFNOR, sous le certificat BRD 07/15 – 12/07.