

iQ-Check® Screen <i>Legionella</i> spp. Kit	Cat. #: 3578104
iQ-Check® Quanti <i>Legionella</i> spp. Kit	Cat. #: 3578102
iQ-Check® Screen <i>L. pneumophila</i> Kit	Cat. #: 3578105
iQ-Check® Quanti <i>L. pneumophila</i> Kit	Cat. #: 3578103

User Guide

Tests for real-time PCR detection or quantification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples

TABLE OF CONTENTS

- I. Introduction
- II. The iQ-Check *Legionella* technology
- III. Kits components
 - III.1. iQ-Check Screen *Legionella*
 - III.2. iQ-Check Quanti *Legionella*
- IV. Shelf-life and storage
- V. Equipment and material required but not supplied in the kit
 - V.1. Reagents and disposables
 - V.2. Instruments and software
- VI. Precautions and recommendations
- VII. Protocol
 - VII.1. Sampling and sample transportation
 - VII.2. Water sample filtration and DNA extraction
 - VII.3. PCR mix preparation
 - VII.4. Running the amplification reaction
 - VII.5. Data analysis
- VIII. Results interpretation
 - VIII.1. iQ-Check Screen *Legionella*
 - VIII.2. iQ-Check Quanti *Legionella*
- IX. Validations
- X. References
- XI. Appendix: pipetting table

I. INTRODUCTION

Legionellae are gram negative bacteria present in all aquatic environments. They are the cause of an acute pneumonia, Legionnaire's disease and a milder form of pulmonary infection, Pontiac fever. In Europe, the number of declared cases of Legionnaire's disease increases by 25% per year. In the United States, the CDC (Commission for Disease Control) estimates the number of cases of Legionellosis at between 10.000 and 20.000 per year. The *Legionella pneumophila* species is responsible for approximately 90% of the clinical cases.

Regular control of the presence of *legionellae* in water supply systems is the only way of preventing the disease. Detection of legionellae is compulsory or strongly recommended in most developed countries. Conventional culture methods for detection of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples present several disadvantages, including low sensitivity and long incubation periods (10 to 13 days of analysis for positive samples).

The iQ-Check *Legionella* spp. and iQ-Check *L. pneumophila* are kits for rapid detection or quantification of *Legionellae* (spp. or *pneumophila*) in water samples. Using a real-time Polymerase Chain Reaction (PCR), specific DNA sequences of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila* are amplified and detected by means of fluorescent probes. The quantification is possible with the use of the calibrated DNA iQ-Check *Legionella* Quantification Standards in the amplification step. The results are obtained within less than 3 hours following the water sample filtration and DNA extraction step.

II. THE iQ-Check *Legionella* TECHNOLOGY

The tests are based on amplification and detection of genomic sequences by the real-time PCR method. The kits contain all the ready-to-use reagents required in order to perform the analysis of the samples: PCR amplification solutions including Taq DNA Polymerase and internal control, specific fluorescent probes and primers, negative and positive controls. Additional standards are provided for the quantification. The reagents and the method are optimized for use with Bio-Rad thermal cycler systems (for the complete list, please contact your Bio-Rad local representative).

During the PCR, the primers hybridize to the target region. The Taq DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

During the PCR, a specific oligonucleotide probe hybridizes to the amplicons. This probe is marked with a fluorophore that emits fluorescence only when hybridized to the amplicons.

The probes that bind to the target sequences of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila* are marked with the FAM fluorophore. When DNA target is present in the sample, the intensity of the fluorescence increases proportionally to the increase in the quantity of amplified products. The fluorescence is measured directly by the optical module of the thermal cycler during the hybridization step. The software combined with the apparatus displays in real time the intensity of the fluorescence measured according to the number of amplification cycles. For each reaction, the software determines a C_q, the cycle from which the fluorescence rises significantly above the background noise. The C_q values are correlated with the logarithm of the number of initial copies of the target sequence.

Reading the C_q values enables the detection of the presence of target DNA sequences of *Legionellae*, representative of the presence of the targeted bacteria in the original water sample. The quantification is possible by the comparison of the results with the standard curve obtained with the use of iQ-Check *Legionella* Quantification Standards in the amplification step.

For each sample, a synthetic internal control DNA is included in the amplification solution. It allows detection of any possible inhibition phenomena of the amplification reaction. The internal control is amplified at the same time with the same primers as the target sequences of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila*, but is detected by a probe marked with a different fluorophore (HEX Channel).

These methods allow the detection or quantification of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila* in all water samples in 4 hours. They include the following steps:

- Sample filtration,
- DNA extraction (Aquadien™ kit, Cat. #: 3578121),
- PCR reaction for detection of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila*, (iQ-Check Screen *Legionella* spp., Cat. #: 3578104 or iQ-Check Screen *L. pneumophila*, Cat. #: 3578105),
Or
- PCR reaction for quantification of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila* (iQ-Check Screen *Legionella* spp., Cat. #: 3578104 or iQ-Check Screen *L. pneumophila*, Cat. #: 3578105 in association with the iQ-Check *Legionella* Quantification Standards, Cat. #: 3578134).

III. KITS COMPONENTS

III.1. iQ-Check Screen *Legionella* spp. (3578104), iQ-Check Screen *L. pneumophila* (3578105)

The iQ-Check Screen *Legionella* spp. and iQ-Check Screen *L. pneumophila* kits contain the quantity of reagents required for 96 PCR reactions. Up to 94 samples can be detected.

iQ-Check Screen <i>Legionella</i> spp. kit iQ-Check Screen <i>L. pneumophila</i> kit	
Reagent	Presentation
Fluorescent probes	1 tube, purple cap (0.55 mL)
Amplification mix	1 tube (1 x 4.4 mL)
PCR negative control	1 tube, green cap (0.5 mL)
PCR positive control	1 tube, red cap (0.25 mL)

III.2. iQ-Check Quanti *Legionella* spp. (3578102), iQ-Check Quanti *L. pneumophila* (3578103)

For quantification, the iQ-Check *Legionella* Quantification Standards (Cat. #: 3578134) are associated with the iQ-Check Screen *Legionella* kits. Up to 43 samples can be quantified.

iQ-Check Screen <i>Legionella</i> spp. kit iQ-Check Screen <i>L. pneumophila</i> kit		iQ-Check <i>Legionella</i> Quantification Standards kit	
Reagent	Presentation	Reagent	Presentation
Fluorescent probes	1 tube, purple cap (0.55 mL)	Qs1 PCR standard	1 tube, white cap (0.08 mL)
Amplification mix	1 tube (1 x 4.4 mL)	Qs2 PCR standard	1 tube, yellow cap (0.08 mL)
PCR negative control	1 tube, green cap (0.5 mL)	Qs3 PCR standard	1 tube, orange cap (0.08 mL)
PCR positive control	1 tube, red cap (0.25 mL)	Qs4 PCR standard	1 tube, red cap (0.08 mL)
		Reference Material	1 tube, blue cap (0.08 mL)
		<i>Calibration card</i>	

Note: the Reference Material is a calibrated DNA independent from the Quantification Standards, **connected to the Standard Reference Material**. The Kit Insert is available on the website www.bio-rad.com or on demand at your local Bio-Rad representative

IV. SHELF-LIFE AND STORAGE

The kits must be stored on reception between +2°C and +8°C. Each reagent stored between +2°C and +8°C may be used until the expiration date indicated on the tube.

Note: do not freeze the reagents from the kits.

V. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED NOT SUPPLIED IN THE KIT

V.1. Reagents and disposables

- Aquadien™ DNA extraction kit (Bio-Rad, Cat. #: 3578121)
- Sterile filter tips, suitable for fitting to the 20 µL, 200 µL and 1000 µL micropipettes
- 20 µL, 200 µL and 1000 µL micropipettes
- Combitips multi-dispenser (optional)
- Sterile, individually packed Combitips tips (optional)
- Unpowdered gloves
- Mask
- Sterile demineralized water
- 5% sodium hypochlorite solution
- 70% alcohol
- PCR plates, tubes, sealing tapes and caps: please contact your Bio-Rad local representative or refer to the appropriate instrument user guide.

V.2. Instruments and software

- CFX96™ Deepwell Touch (Bio-Rad, Cat. # 3594990)
- CFX96™ (Bio-Rad, Cat. # 3593990)
- CFX Manager™ Software Industrial Diagnostic Edition (Bio-Rad, Cat. # 3593893)
- Chromo4™
- Opticon Monitor™ Software (Bio-Rad, Cat. # 3593393), version 3.4 and later

Note: we recommend the use of a universal power source (UPS) with the thermal cycler.

Please contact your Bio-Rad local representative for the list of compatible instruments.

VI. PRECAUTIONS AND RECOMMENDATIONS

- This test may be performed only by adequately trained personnel.
- The water samples must be handled and discarded as potentially infectious materials.
- For **each amplification series**, it is essential to use a negative control and a positive control.

- For the **quantification**, it is necessary to test each sample or control in duplicates. The Quantification Standards are tested in duplicates at each amplification series. The Reference Material shall then be tested according to the T90-471 standard.
- The quality of the results depends on strict compliance with the following Good Laboratory Practices, particularly concerning PCR:
 - The laboratory equipment (pipettes, tubes etc.) must not circulate from one workstation to another. Use DNA free pipettes when pipetting Fluorescent Probes, Amplification Mix, and Negative Control. Use separate pipettes when pipetting samples, Positive Control or Quantification Standards.
 - Use DNase and RNase free equipment and laboratory material.
 - 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 sodium hypochlorite or detergent solution and rinse afterwards with sterile water (*Legionella* DNA free) and 70% alcohol.
 - Wear unpowered gloves in order to avoid leaving fingerprints on the optical sealing consumables of the microplates. This could interfere with data reading by the apparatus.

VII. PROTOCOL

We strongly recommend that you read the entire protocol before beginning the test. Strictly comply with the proposed protocol.

VII.1. Sampling and sample transportation

Water samples of 1 L are collected according to the general standards for *Legionella* 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 hours but no more than 48 hours after the sampling.

If the samples are carried and analyzed within 24 hours then carry and store at room temperature (+18°C to +30°C).

If the samples are carried and analyzed within 48 hours then carry and store at +2°C to +8°C.

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

VII.2. Water sample filtration and DNA extraction

From 100 to 1000 mL of sample are filtered on a 0.45 µm polycarbonate membrane filter.

Bio-Rad has developed and validated a DNA extraction kit for water samples, the Aquadien™ DNA extraction kit (Cat. #: 3578121). An additional protocol W2-Aquadien™ is also available for clogging samples. Performances of the method for detection or quantification of *Legionella* spp. or *Legionella pneumophila* are guaranteed when DNA is extracted with this Aquadien™ DNA extraction kit. Refer to the kit user guide for complete instructions for sample filtration and DNA extraction.

Note: Shorts Protocols are proposed (not included in the scope of NF VALIDATION).

VII.3. PCR mix preparation

1. Vortex reagent tubes before use. Prepare the iQ-Check Screen *Legionella* spp. or *L. pneumophila* reaction mix by mixing **40 µL of the Amplification mix** and **5 µL of Fluorescent probes** per well, taking into account the number of samples, controls or standards to be analyzed.

Note that, in the case of quantification, all samples, controls and standards are tested in **duplicates**. A pipetting table is presented in appendix (chapter XI).

For example: if 10 samples have to be quantified, 4 DNA standards and 1 negative control will be loaded in duplicate in the same run. 30 wells in total will be tested then 162 µL of fluorescent probes will be mixed with 1300 µL of amplification mix.

Once prepared, the reaction mix may be stored for **1 h at 4°C**.

Notes:

- do not mix iQ-Check Legionella Quantification Standards of different batches.
 - when running both iQ-Check Legionella spp. and iQ-Check *L. pneumophila* on the same plate, because the amplification mixes are specific to each method, do not forget to **run two independent series of quantification standards**. In addition, the two batches of results shall be **analyzed separately**.
2. Pipette 45 µL of this reaction mix per well, according to the selected plate setup.
 3. Add 5 µL of samples or controls (check below the controls to be tested for the screening or the quantification).
 4. Seal hermetically using the sealing tool. Ensure that no air bubbles are present at the bottom of the PCR wells (it is possible to centrifuge shortly).
 5. Place the plate in the thermal cycler. Ensure that the plate is positioned correctly (well A1 at the top left).
 6. Close the reaction module.

VII.4. Running the amplification reaction

Before initiating a run, please, read the corresponding detailed protocol in the appropriate instrument user guide.

1. Define the plate set-up. Fill in information in each well:
 - Screening conditions: positive or negative controls, or samples;
Note: controls and samples are deposited in singulate.
 - Quantification conditions: standards, Reference Material, negative control or samples. Indicate the quantity value for each PCR standard and for the Reference Material. The exact quantity for each quantification standard and for the Reference Material is indicated on the calibration card inserted in each box of the iQ-Check *Legionella* Quantification Standards kit and on the Certificate of analysis for each product batch.
Note: controls and samples are deposited in duplicate.
2. Select the appropriate thermo-protocol for the detection or quantification of *Legionella*.
3. Check the instrument is ready and start the **Run**.

VII.5. Data analysis

Using the CFX96™ Deepwell Touch, the CFX96™ or the Chromo4™, the data analysis is automatically performed by the CFX Manager™ Software Industrial Diagnostic Edition or the Opticon Monitor™ Software.

For a manual analysis, analyze successively the files for the two fluorophores.

The steps are as following:

1. Open the data file to be analyzed
2. Optimize the PCR parameters for each fluorophore
 - a. Positioning of the baseline
 - b. Defining the fluorescence threshold

For detailed information refer to the instrument guide.

VII.6. Colony confirmation (not in the scope of NF VALIDATION)

From GVPC or BCYE plate, collect a colonie of *Legionella* using a oese.

Resuspend the colonie into 200µl of sterile water *Legionella* free : suspension(a)

Homogenize (a) with a vortex for 20s. Separate the suspension (a) in 2x 100µL

suspensions (b) and (c). Incubate the suspension (b) 10 min - 95°C. Run PCR with 5µL of DNA extract (b).

Results interpretation:

- Cq > intercept value : négative, colonie not confirmed or identified

- Cq < 30 : positive, colonie confirmed and identified

Note 1: if the result is positive, the suspension (c) must be stored in 4°C to perform a culture. Note 2: if DNA extract is positive, conserved DNA extract (b)

at -20°C for 3 months to allow to realize another PCR test. Note 3: in case of inhibited PCR, dilute the suspension b (1/100) and retest by PCR

Note 4: if 30 < Cq < intercept value: confirm the positive result with another method of confirmation or perform a PCR from another colony.

VIII. RESULTS INTERPRETATION

The CFX Manager™ Software Industrial Diagnostic Edition and the Opticon Monitor™ Software will also automatically generate a report with the complete controls and samples interpretation.

VIII.1. iQ-Check Screen *Legionella*

Verify that as raw data the curve is a regular amplification curve (with a flat base line, followed by an exponential increase of fluorescence and then a flattening out). You also have to make sure the internal control is valid for each well. You then have to check the validity of the positive and negative controls prior to read the Cq values for each sample.

1. Negative and positive controls

For validation of the test, the results of the positive and negative controls must be as follows:

	Detection of <i>Legionella</i> spp. or <i>Legionella pneumophila</i> (FAM)	Detection of the internal control (HEX Channel)
Negative control	N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positive control	$30 \leq Cq \leq 40$	Non-significant

* N/A means "Not Applicable". The software indicates N/A for the Cq of a sample when the fluorescence curve does not rise above the threshold.

If the results for the negative and the positive controls differ from those given in the table above, the PCR is invalid and must be repeated.

2. Samples

Sample results shall be interpreted as indicated in the table below:

Detection of <i>Legionella</i> spp. or <i>L. pneumophila</i> (FAM)	Detection of the internal control (HEX Channel)	Results	Interpretation
$Cq \geq 10$	Non-significant	Positive	Presence of the target in the sample
$Cq > \text{Intercept value}^*$	$28 \leq Cq \leq 40$	Negative	Amplification non significative
N/A	$28 \leq Cq \leq 40$	Negative	Target non detected at the Detection limit of the method
	N/A	Inhibition	Dilute the extracted DNA (1/10 for example) and repeat the PCR amplification
	$Cq > 40$		
$Cq < 28$	Analytical issue	Repeat the PCR analysis (chapter VII.5.) or the PCR amplification	

Note: the dilution of the DNA sample must be performed in the buffer used for DNA elution at the end of the extraction step.

* The intercept value to be considered in the context of a qualitative analysis is $Cq = 43$ (this value is used to give an indication of the intercept value chosen during the validation). An intercept value can be determined by the user by averaging intercept values obtained to which is added 2 standard deviations.

3. Detection limit of the method

The Detection limit of the PCR step (Ld PCR) for a *Legionella* PCR detection and quantification method is defined as the lowest number of Genome Units generating a positive result at a 90% confidence limit (NF T90-471).

The detection limit of the PCR step (LdPCR) is 5 Genome units per 5 µL of extracted DNA.

To calculate the theoretical detection limit of the total method (Ld) for a 1 L sample, take into consideration the Z factor.

Z represents the fraction of the sample deposited in each PCR well. The Z value depends on the used DNA extraction protocol and can be found in the Aquadien DNA extraction kit insert.

D represents the dilution factor if the DNA has been diluted before the PCR run.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (in L)}}$$

The theoretical Ld for the total method takes into consideration a filtration and extraction yield of 100%.

VIII.2. iQ-Check Quanti *Legionella*

Verify that as raw data the curve is a regular amplification curve (with a flat base line, followed by an exponential increase of fluorescence and then a flattening out). You then have to check the validity of the quantification standards series and of the controls prior to read the mean quantity of Genome Units calculated for each sample.

1. Controls and standards

For validation of the test, the results of the negative control, Reference Material and quantification standards must be as follows:

Parameter	Detection of <i>Legionella</i> spp. or <i>Legionella pneumophila</i> (FAM)	Detection of internal control (HEX Channel)
Negative control	N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
PCR Efficiency	75% ≤ PCR Efficiency ≤ 125%	Non-significant
Correlation coefficient (r ²)	≥ 0.99	
Qs 1 to Qs 4	20 ≤ Cq ≤ 40	28 ≤ Cq ≤ 40

* N/A means "Not Applicable". The software indicates N/A for the Cq of a sample when the fluorescence curve does not rise above the threshold.

If one of the quantification standards is significantly outside of the standard curve, it can be eliminated to optimize the results and reach the above parameters. Only one standard replicate can be eliminated. The Reference Material shall follow T90-471 standards requirements.

If the results of the negative controls and standards differ from those given in the table above, the analysis of the PCR or the PCR must be repeated.

2. Samples

Sample results shall be interpreted as indicated in the table below:

Detection of <i>Legionella</i> spp. or <i>L. pneumophila</i> (FAM)	Detection of the internal control (HEX Channel)	Results	Interpretation
Cq ≥ 10	$Cq \leq \text{Mean Cq Qs} + 3 \sigma$	Positive	Presence of the target in the sample, possible quantification
	N/A	Inhibition	Dilute the extracted DNA (1/10 for example) and repeat the PCR amplification
	$Cq > \text{Mean Cq Qs} + 3 \sigma$		
N/A	$\text{Mean Cq Qs} - 3 \sigma \leq Cq \leq \text{Mean Cq Qs} + 3 \sigma$	Negative	Target non detected at the Detection limit of the method
	N/A	Inhibition	Dilute the extracted DNA (1/10 for example) and repeat the PCR amplification for a precise quantification
	$Cq > \text{Mean Cq Qs} + 3 \sigma$		
	$Cq < \text{Mean Cq Qs} - 3 \sigma$	Analytical issue	Repeat the PCR analysis (chapter VII.5.) or the PCR amplification

Mean Cq Qs is the mean of values of all Cq of Qs internal control (HEX).

σ is the standard deviation.

Note: • the dilution of the DNA sample must be performed in the buffer used for DNA elution at the end of the extraction step • if a sample has a very high concentration in *Legionella* ($Ct_{FAM} < Ct_{FAM} \text{ Qs4}$), its Ct_{HEX} might be higher than the Ct_{HEX} of Qs4. This sample is outside of the dynamic range of the quantification and has to be diluted and submitted again to PCR, if a precise quantification is required.

- A well with a Cq value higher than the b intercept value, and with no inhibition will not be considered as positive.

a. Calculation of *Legionella* concentration

The values given for each sample in the report correspond to the initial quantity of *Legionella* Genome Units present in 5 µL of the DNA extract. To obtain the concentration of *Legionella* in Genome Units/1 L of water sample, take into account the quantification mean value ("mean GU/well"), calculated by the software, for each sample. Apply the following formula:

$$X = \frac{[\text{Mean quantity in 5 } \mu\text{L}] \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (in L)}}$$

X represents the *Legionella* Genome Units contained in 1 L of water sample.
 Z represents the fraction of the sample deposited in each PCR well. The Z value depends on the used DNA extraction protocol and can be found in the Aquadien™ DNA extraction kit insert.
 D represents the dilution factor if the DNA has been diluted before the PCR run.
 Note: If one positive and one negative result are obtained for the 2 PCR points for a sample, the sample is considered positive.

b. Detection Limit, Quantification Limit and Upper Quantification Limit of the method

Detection Limit of the method

The detection limit of the PCR step (Ld PCR) for a *Legionella* PCR detection and quantification method is defined as the lowest number of Genome Units generating a positive result at a 90% confidence limit (NF T90-471 standard).
 The detection limit of the PCR step (Ld PCR) is 5 Genome units per 5 µL of extracted DNA.

To calculate the theoretical detection limit of the total method (Ld) for a 1 L sample, take into consideration the Z factor, divided by 2 (2 points of PCR are tested for each sample).

D represents the dilution factor if the DNA has been diluted before the PCR run.

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (in L)} \times 2}$$

The theoretical Ld for the total method takes into consideration a filtration and extraction yield of 100%.

Quantification limit of the method

The quantification limit of the PCR step (Lq PCR) of a PCR *Legionella* quantification method is defined as the lowest number of copies allowing a quantification repeatability and accuracy as described in the NF T90-471 standard.

Qs1, the first point on the quantification standards, corresponds to the quantification limit for each batch of iQ-Check Quanti *Legionella*. The exact value of Qs1 for each batch of quantification standards is indicated on the Calibration Card and on the Certificate of analysis. Use the following formula to calculate the exact Quantification limit for the total method:

$$Lq = Qs1 \times Z$$

If the laboratory filters a volume of water different from 1 L or if the DNA extract has to be diluted, the Lq for the entire method changes. In order to calculate the new Lq per liter of water, use the following formula:

$$Lq = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (in L)}}$$

The Upper Quantification Limit of the method

The Upper Quantification Limit (UQL) of the method corresponds to the value (for 1 L) given by the highest point of the quantification standards, which is the Qs4 standard. The exact Qs4 value for each quantification standards batch is indicated on the Calibration Card and the Certificate of Analysis.

To obtain the UQL of the method, the Qs4 value must be multiplied by the fraction of analyzed sample Z, and by the dilution factor D.

$$UQL = \frac{Qs4 \times Z \times D}{\text{Volume of filtered sample (in L)}}$$

c. Expressing the results

The final result is expressed in Genome Units/L with 2 significant figures (e.g.: 1300 GU/L for a calculated concentration of 1256 Genome Units/L.

Results in Genomic Units/PCR well	Interpretation and Conclusion	
< 5	< Ld*	Target not detected at the detection limit of the method
[5, Qs1)	< Lq*	Presence of the target, non-quantifiable
[Qs1 - Qs4]	X*	Presence of the target, quantifiable result
> Qs4	UQL*	High amount of target, superior to UQL. If a precise quantitative result is required, dilute the DNA sample.

* Refer to paragraph VIII.2, sections 2b and 2c for calculating respectively X, Ld, Lq and UQL values of the global method.

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>

iQ-Check *Legionella* spp. and iQ-Check *L. pneumophila* are NF VALIDATION certified according to the validation protocol based on the Standard NF T90-471 (June 2015).

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)”. The certification includes the use of the CFX96™ Deepwell Touch, the CFX96™ and the Chromo4™ instruments.

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.

X. REFERENCES

1. Tyagi S, Kramer FR. (1996).
Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.*14:303-308.
2. Wolters J, Erdmann VA. (1986).
Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res.* 16 Suppl:r1-70.
3. MacDonell MT, Colwell RR. (1987).
The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res.* 15:1335.
4. Engleberg NC, Carter C, Weber DR, Cianciotto NP, Eisenstein BI. (1989).
DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun.* 57:1263-1270.
5. AFNOR XP T90-471: Detection and quantification of *Legionella* and *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification (April 2006).
6. AFNOR T90-471: Detection and quantification of *Legionella* and *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification (April 2010).
7. NF T 90-431, Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* - Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration or centrifugation.
8. ISO 11731-2: Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* - Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts.

XI. APPENDIX: PIPETTING TABLE

This pipetting table has been calculated allowing for a pipetting margin of 8%. In the case of quantification, take into account that all samples and controls are tested in duplicates.

For example: if 10 samples have to be amplified for quantification purpose, 4 DNA standards and 1 negative control will be loaded in the same run. 30 wells (10+4+1 wells in double) in total will be tested then 162 μ L of fluorescent probes will be mixed with 1300 μ L of amplification mix.

Number of samples	Fluorescent probes (μ L)	Amplification mix (μ L)	Number of samples	Fluorescent probes (μ L)	Amplification mix (μ L)
1	5	40	49	265	2120
2	11	88	50	270	2160
3	16	128	51	275	2200
4	22	176	52	281	2250
5	27	216	53	286	2290
6	32	256	54	292	2340
7	38	304	55	297	2380
8	43	344	56	302	2420
9	49	392	57	308	2470
10	54	432	58	313	2500
11	59	472	59	319	2550
12	65	520	60	324	2590
13	70	560	61	329	2630
14	76	608	62	335	2680
15	81	648	63	340	2720
16	86	688	64	346	2770
17	92	736	65	351	2810
18	97	776	66	356	2850
19	103	824	67	362	2900
20	108	864	68	367	2940
21	113	904	69	373	2984
22	119	952	70	378	3024
23	124	992	71	383	3064
24	130	1040	72	389	3110
25	135	1080	73	394	3150
26	140	1120	74	400	3200
27	146	1170	75	405	3240
28	151	1200	76	410	3280
29	157	1260	77	416	3330
30	162	1300	78	421	3370
31	167	1340	79	427	3420
32	173	1380	80	432	3460
33	178	1420	81	437	3500
34	184	1470	82	443	3540
35	189	1510	83	448	3580
36	194	1550	84	454	3630
37	200	1600	85	459	3670
38	205	1640	86	464	3710
39	211	1690	87	470	3760
40	216	1730	88	475	3800
41	221	1770	89	481	3850
42	227	1820	90	486	3890
43	232	1860	91	491	3930
44	238	1900	92	497	3980
45	243	1940	93	502	4020
46	248	1980	94	508	4060
47	254	2030	95	513	4100
48	259	2070	96	518	4140

Notice to purchaser: limited license

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155, 5,677,152 (claims 1 to 23 only) and 5,773,258 (claims 1 and 6 only), and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in Food testing, Environmental testing, and Industrial microbiology, including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own research. No right under any patent claim (such as the 5' Nuclease Process claims in US Patent Nos. 5,210,015 and 5,487,972) is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Kit iQ-Check® Screen <i>Legionella</i> spp.	Réf. : 3578104
Kit iQ-Check® Quanti <i>Legionella</i> spp.	Réf. : 3578102
Kit iQ-Check® Screen <i>L. pneumophila</i>	Réf. : 3578105
Kit iQ-Check® Quanti <i>L. pneumophila</i>	Réf. : 3578103

Manuel d'utilisation

Tests pour la détection ou la quantification par PCR en temps réel de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* dans des échantillons d'eau

TABLE DES MATIÈRES

- I. Introduction
- II. La technologie iQ-Check *Legionella*
- III. Composition des kits
 - III.1. iQ-Check Screen *Legionella*
 - III.2. iQ-Check Quanti *Legionella*
- IV. Validité et conservation
- V. Equipement et matériel nécessaire mais non fourni dans le kit
 - V.1. Réactifs et consommables
 - V.2. Instruments et logiciel
- VI. Précautions et recommandations
- VII. Protocole
 - VII.1. Prélèvement et transport des échantillons
 - VII.2. Filtration de l'échantillon d'eau et extraction de l'ADN
 - VII.3. Préparation du mélange de PCR
 - VII.4. Lancement de la réaction d'amplification
 - VII.5. Analyse des données
- VIII. Interprétation des résultats
 - VIII.1. iQ-Check Screen *Legionella* spp.
 - VIII.2. iQ-Check Quanti *Legionella* spp.
- IX. Validations
- X. Bibliographie
- XI. Annexe : tableau de pipetage

I. INTRODUCTION

Les légionelles sont des bactéries gram-négatives présentes dans tous les environnements aquatiques. Elles sont la cause d'une pneumonie aiguë, la maladie des légionnaires, et d'une forme plus légère d'infection pulmonaire, la fièvre de Pontiac. En Europe, le nombre de cas déclarés de la maladie des légionnaires augmente de 25% par an. Aux États-Unis, la CDC (Commission for Disease Control) estime que le nombre de cas de légionelloses est compris entre 10 000 et 20 000 par an. L'espèce *Legionella pneumophila* est responsable d'environ 90% des cas cliniques.

Le contrôle régulier de la présence des légionelles dans les systèmes de distribution d'eau est le seul moyen de prévention de la maladie. La détection des légionelles est obligatoire ou fortement recommandée dans la plupart des pays développés. Les méthodes de culture conventionnelles pour la détection de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* dans les échantillons d'eau présentent plusieurs inconvénients, dont une faible sensibilité et des périodes d'incubation longues (10 à 13 jours d'analyse pour les échantillons positifs).

iQ-Check *Legionella* spp. et iQ-Check *L. pneumophila* sont des kits pour la détection ou la quantification rapides des légionelles (spp. ou *pneumophila*) dans les échantillons d'eau. À l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel, des séquences d'ADN spécifiques du genre *Legionella* spp. ou de l'espèce *Legionella pneumophila* sont amplifiées et détectées grâce à des sondes fluorescentes. La quantification est possible en utilisant les solutions d'ADN calibré iQ-Check *Legionella* Quantification Standards au cours de l'étape d'amplification. Les résultats sont obtenus en moins de 3 heures après l'étape de filtration de l'échantillon d'eau et d'extraction de l'ADN.

II. LA TECHNOLOGIE iQ-Check *Legionella*

Les tests reposent sur l'amplification et la détection de séquences génomiques par la méthode de PCR en temps réel. Les kits contiennent tous les réactifs prêts à l'emploi nécessaires pour effectuer l'analyse des échantillons : solutions d'amplification contenant la Taq DNA polymérase et le contrôle interne, sondes et amorces fluorescentes spécifiques, contrôles négatifs et positifs. Des standards supplémentaires sont fournis pour la quantification. Les réactifs et la méthode sont optimisés pour l'utilisation des systèmes de thermocycleurs Bio-Rad (pour en connaître la liste complète, veuillez contacter votre représentant Bio-Rad local).

Au cours de la réaction de PCR, les amorces s'hybrident à la région cible. La Taq DNA polymerase utilise alors ces amorces et les desoxynucleotides triphosphates (dNTPs) pour allonger l'ADN, créant des copies de l'ADN cible. Ces copies sont appelées amplicons.

Pendant la PCR, une sonde oligonucléotidique spécifique s'hybride aux amplicons. Cette sonde est marquée par un fluorophore qui émet de la fluorescence uniquement lorsqu'elle est hybridée aux amplicons.

Les sondes qui se lient aux séquences cibles de *Legionella* spp. ou *Legionella pneumophila* sont marquées par le fluorophore FAM. En présence d'ADN cible dans l'échantillon, l'intensité de la fluorescence croît proportionnellement à l'augmentation de la quantité de produits amplifiés. La fluorescence est mesurée directement par le module optique du thermocycleur pendant l'étape d'hybridation. Le logiciel associé à l'appareil affiche en temps réel l'intensité de la fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycles d'amplification. Pour chaque réaction, le logiciel détermine un Cq, cycle à partir duquel la fluorescence s'élève significativement au-dessus du bruit de fond. Les valeurs des Cq sont corrélées au logarithme du nombre de copies initiales de la séquence cible.

La lecture des valeurs des Cq permet de détecter la présence des séquences d'ADN cibles de Legionelle, qui signale la présence de la bactérie ciblée dans l'échantillon d'eau d'origine. La quantification est possible par comparaison des résultats à la droite de calibrage obtenue avec les standards iQ-Check *Legionella* Quantification Standards utilisés au cours de l'étape d'amplification.

Pour chaque échantillon, un ADN synthétique servant de contrôle interne est inclus dans la solution d'amplification. Il permet la détection d'éventuels phénomènes d'inhibition de la réaction d'amplification. Le contrôle interne est amplifié en même temps que les séquences cibles de *Legionella* spp. ou de *Legionella pneumophila*, et avec les mêmes amorces, mais il est détecté par une sonde marquée avec un fluorophore différent (Canal HEX).

Ces méthodes permettent la détection ou la quantification de *Legionella* spp. ou de *Legionella pneumophila* dans tous les échantillons d'eau en 4 heures. Elles incluent les étapes suivantes :

- Filtration des échantillons,
- Extraction de l'ADN (kit Aquadien™, Réf. : 3578121),
- Réaction de PCR pour la détection de *Legionella* spp. ou *Legionella pneumophila* (iQ-Check Screen *Legionella* spp., Réf. : 3578104 ou iQ-Check Screen *L. pneumophila*, Réf. : 3578105)
Ou
- Réaction de PCR pour la quantification de *Legionella* spp. ou *Legionella pneumophila* (iQ-Check Screen *Legionella* spp., Réf. : 3578104 ou iQ-Check Screen *L. pneumophila*, Réf. : 3578105 en association avec les standards iQ-Check *Legionella* Quantification Standards, Réf. : 3578134).

III. COMPOSITION DES KITS

III.1. iQ-Check Screen *Legionella* spp. (3578104), iQ-Check Screen *L. pneumophila* (3578105)

Les kits iQ-Check Screen *Legionella* spp. et iQ-Check Screen *L. pneumophila* contiennent la quantité de réactifs nécessaire pour 96 réactions de PCR. Ils permettent la détection de 94 échantillons au maximum.

Kit iQ-Check Screen <i>Legionella</i> spp. Kit iQ-Check Screen <i>L. pneumophila</i>	
Réactif	Présentation
Sondes fluorescentes	1 tube, bouchon violet (0,55 mL)
Solution d'amplification	1 tube (1 x 4,4 mL)
Contrôle PCR négatif	1 tube, bouchon vert (0,5 mL)
Contrôle PCR positif	1 tube, bouchon rouge (0,25 mL)

III.2. iQ-Check Quanti *Legionella* spp. (3578102), iQ-Check Quanti *L. pneumophila* (3578103)

Pour la quantification, les standards iQ-Check *Legionella* Quantification Standards (Réf. : 3578134) sont associés aux kits iQ-Check Screen *Legionella*. Ils permettent la quantification de 43 échantillons au maximum.

Kit iQ-Check Screen <i>Legionella</i> spp. Kit iQ-Check Screen <i>L. pneumophila</i>		Kit iQ-Check <i>Legionella</i> Quantification Standards	
Réactif	Présentation	Réactif	Présentation
Sondes fluorescentes	1 tube, bouchon violet (0,55 mL)	Standard de PCR Qs1	1 tube, bouchon blanc (0,08 mL)
Solution d'amplification	1 tube (1 x 4,4 mL)	Standard de PCR Qs2	1 tube, bouchon jaune (0,08 mL)
Contrôle PCR négatif	1 tube, bouchon vert (0,5 mL)	Standard de PCR Qs3	1 tube, bouchon orange (0,08 mL)
Contrôle PCR positif	1 tube, bouchon rouge (0,25 mL)	Standard de PCR Qs4	1 tube, bouchon rouge (0,08 mL)
		Matériau de Référence	1 tube, bouchon bleu (0,08 mL)
		Carte de calibration	

Remarque : le Matériau de Référence est un ADN calibré indépendant des Standards de Quantification, **relié à l'Etalon Primaire**.

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

IV. VALIDITÉ ET CONSERVATION

Dès réception, conserver les kits entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé entre +2°C et +8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube.

Remarque : ne pas congeler les réactifs des kits.

V. ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI DANS LE KIT

V.1. Réactifs et consommables

- Kit d'extraction d'ADN Aquadien™ (Bio-Rad, Réf. : 3578121)
- Embouts à filtre stériles adaptables sur les micropipettes de 20 µL, 200 µL et 1000 µL
- Micropipettes de 20 µL, 200 µL et 1000 µL
- Multi-distributeur Combitips (optionnel)
- Pointes Combitips stériles à emballage individuel (optionnel)
- Gants non poudrés
- Masque
- Eau déminéralisée stérile
- Eau de Javel 5%
- Alcool à 70%
- Plaques PCR, tubes, films adhésifs et bouchons : veuillez contacter votre représentant local Bio-Rad ou vous référer au mode d'emploi de l'instrument utilisé.

V.2. Instruments et logiciel

- CFX96™ Deepwell Touch (Bio-Rad, Réf. : 3594990)
 - CFX96™ (Bio-Rad, Réf. : 3593990)
 - CFX Manager™ Software Industrial Diagnostic Edition (Bio-Rad, Réf. : 3593893)
 - Chromo4™
 - Opticon Monitor™ Software (Bio-Rad, Réf. : 3593393), version 3.4 et suivantes
- Remarque : nous recommandons l'utilisation d'un onduleur électrique avec le thermocycleur.*

Veuillez contacter votre représentant local Bio-Rad pour la liste des instruments compatibles.

VI. PRÉCAUTIONS ET RECOMMANDATIONS

- Ce test doit être réalisé par des personnes ayant reçu une formation adéquate.
- Les échantillons d'eau doivent être manipulés et éliminés comme des matières potentiellement infectieuses.
- Pour **chaque série d'amplification**, il est essentiel d'utiliser un contrôle négatif et un contrôle positif.

- Pour la **quantification**, il est nécessaire de tester chaque échantillon et contrôle en duplicat. La gamme de quantification est testée en duplicat à chaque série d'amplification. Le Matériau de Référence sera alors testé selon la norme T90-471.
- La qualité des résultats dépend du strict respect des bonnes pratiques de laboratoire suivantes, en particulier en matière de PCR :
 - Le matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) ne doit pas circuler d'un poste de travail à un autre. Il convient d'utiliser des pipettes exemptes d'ADN pour pipeter les sondes fluorescentes, la solution d'amplification et le contrôle négatif. Il convient d'utiliser des pipettes distinctes pour le pipetage des échantillons, du contrôle positif ou des standards de quantification.
 - Il convient d'utiliser des équipements et du matériel de laboratoire exempts de DNase ou de RNase.
 - Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
 - Il convient de vortexer les réactifs du kit avant leur utilisation pour travailler avec des solutions homogènes.
 - Il convient de vérifier l'exactitude et la précision des pipettes ainsi que le bon fonctionnement des instruments.
 - Il convient de changer de gants régulièrement et dès que vous soupçonnez qu'ils ont pu être contaminés.
 - Il convient de nettoyer régulièrement les surfaces de travail avec une solution d'eau de Javel ou de détergent et de les rincer ensuite avec de l'eau stérile (exempte d'ADN de *Legionella*) et de l'alcool à 70%.
 - Il convient de porter des gants non poudrés pour éviter de laisser des traces de doigt sur le consommable optique utilisé pour sceller des microplaques. En effet, des traces de doigt peuvent perturber la lecture des données par l'appareil.

VII. PROTOCOLE

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

VII.1. Prélèvement et transport des échantillons

Les échantillons d'1 L d'eau sont collectés selon les normes générales pour la recherche et le dénombrement de *Legionella* (NF T90-471 et ISO/TS 12869). Collecter les échantillons dans des récipients stériles en verre, en polyéthylène ou en matériel similaire. Si l'échantillon d'eau contient ou est suspecté de contenir un biocide oxydant, ajouter en quantité suffisante un agent inactivant approprié.

Les échantillons doivent être remis au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence dans les 24 heures et pas plus de 48 heures après le prélèvement.

Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 24 heures, le transport et le stockage ont lieu à température ambiante (+18°C à +30°C).

Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 48 heures, le transport et le stockage ont lieu entre +2°C et +8°C.

Remarque : attendre 48 heures après un traitement biocide avant de prélever un échantillon d'1 L d'eau en vue d'une analyse par PCR en temps réel.

VII.2. Filtration de l'échantillon d'eau et extraction de l'ADN

Des échantillons de 100 à 1000 mL sont filtrés sur une membrane en polycarbonate de 0.45 µm.

Bio-Rad a établi et validé un kit d'extraction d'ADN pour les échantillons d'eau, le kit d'extraction d'ADN Aquadien™ (Réf. : 3578121). Un protocole additionnel, W2-Aquadien est aussi disponible pour les échantillons colmatant. Les performances de la méthode de détection ou de quantification de *Legionella* spp. ou de *Legionella pneumophila* sont garanties lorsque l'ADN a été extrait avec ce kit d'extraction Aquadien™. Se référer à son mode d'emploi pour obtenir des instructions complètes concernant la filtration des échantillons et l'extraction de l'ADN.

Note : Des protocoles courts sont aussi proposés (hors cadre NF VALIDATION).

VII.3. Préparation du mélange de PCR

1. Vortexer les tubes de réactif avant utilisation. Préparer le mélange réactionnel iQ-Check Screen *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* en mélangeant **40 µL de la solution d'amplification** et **5 µL de sondes fluorescentes** par puits, en tenant compte du nombre d'échantillons, de contrôles ou de standards devant être analysés.

Remarque : pour la quantification, tous les échantillons, contrôles et standards sont testés en **duplicat**. Un tableau de pipetage est fourni en annexe (chapitre XI).

Par exemple : si 10 échantillons doivent être quantifiés, 4 standards d'ADN et 1 contrôle négatif seront chargés en duplicat lors du même cycle. Au total, 30 puits seront testés, 162 µL de sondes fluorescentes seront alors mélangés à 1300 µL de solution d'amplification.

Une fois prêt, le mélange réactionnel peut être conservé **1 h à 4°C**.

Remarques :

- Ne pas mélanger les standards de quantification iQ-Check Legionella Quantification Standards portant des numéros de lot différents.
- Lorsque vous quantifiez iQ-Check Legionella spp. et iQ-Check *L. pneumophila* sur la même plaque PCR, comme les réactifs d'amplification sont spécifiques de chaque méthode, n'oubliez pas **d'utiliser des séries de standards de quantification indépendants**. De plus, les deux lots de résultats devront être **analysés séparément**.

2. Pipeter 45 µL du mélange réactionnel dans chaque puits selon le plan de plaque choisi.

3. Ajouter 5 µL d'échantillon ou de contrôles (vérifier ci-dessous les contrôles à tester pour la détection ou pour la quantification).
4. Sceller de façon hermétique à l'aide de l'outil adéquate. Vérifier l'absence de bulles d'air au fond des puits (il est possible de centrifuger rapidement).
5. Placer la plaque dans le thermocycleur. S'assurer de la bonne orientation de la plaque (puits A1 en haut à gauche).
6. Fermer le module réactionnel.

VII.4 Lancement de la réaction d'amplification

Avant de lancer une réaction, veuillez lire le protocole détaillé correspondant, fourni dans le mode d'emploi de l'instrument.

1. Définir le plan de plaque

Entrer les informations dans chaque puits :

- Conditions de détection : contrôles positifs ou négatifs, ou échantillons ;

Remarque : les contrôles et les échantillons sont déposés en un seul exemplaire.

- Conditions de quantification : standards, Matériau de Référence, contrôle négatif, ou échantillons. Indiquer la quantité pour chaque standard et pour le Matériau de Référence. La valeur exacte de chaque standard de quantification et du Matériau de Référence est indiquée sur la carte de calibration insérée dans chaque boîte du kit iQ-Check *Legionella* Quantification Standards et sur le certificat d'analyse de chaque lot de produit.

Remarque : les contrôles et les échantillons sont déposés en duplicat.

2. Choisir le protocole approprié pour la détection ou pour la quantification de *Legionella*.
3. Vérifier que l'instrument est prêt et commencer l'amplification.

VII.5. Analyse des données

En utilisant le CFX96™ Deepwell Touch, le CFX96™ ou le Chromo4™, l'analyse des données est exécutée automatiquement par le logiciel CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition ou le logiciel Opticon Monitor™.

Pour une analyse manuelle, analyser successivement les fichiers obtenus pour les deux fluorophores. Les étapes à suivre sont les suivantes :

1. Ouvrir le fichier de données à analyser
2. Optimiser les paramètres de PCR pour chaque fluorophore
 - a. Positionnement de la ligne de base
 - b. Définition du seuil de fluorescence

Pour des informations détaillées se référer au manuel d'utilisation de l'instrument.

VII.6. Confirmation à partir de colonie (hors cadre de la méthode certifiée NF VALIDATION)

A partir d'une boîte de GVPC ou d'une boîte de BCYE, prélever une colonie isolée de *Legionella* à l'aide d'une oese.

Re-suspendre la colonie dans 200µl d'eau stérile *Legionella free* : suspension (a) Homogénéiser (a) au vortex pendant 20s. Séparer la suspension (a) en 2x 100µL de suspensions (b) et (c). Incuber la suspension (b) 10 min - 95°C. Réaliser l'analyse en PCR à partir de 5µL de l'extrait d'ADN (b)

Interprétation des résultats:

- Cq > valeur intercept : négatif, colonie non confirmée ou identifiée
- Cq < 30 : positif, colonie confirmée ou identifiée

Note 1: si le résultat est positif en PCR, la suspension (c) doit être conservée à 4°C afin de permettre de réaliser une culture. Note 2: si l'extrait d'ADN testé est positif, conserver l'extrait d'ADN (b) à -20°C pendant 3 mois pour permettre de réaliser un autre test PCR. Note 3: en cas de résultat de PCR inhibé, réaliser une dilution de la suspension b (1/100) et réaliser une PCR.

Note 4: si $30 < Cq < \text{valeur d'intercept}$: confirmer le résultat positif avec une autre méthode de confirmation ou à partir d'une autre colonie

VIII. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les logiciels CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition et Opticon Monitor™ génèreront aussi automatiquement un rapport avec l'interprétation complète des contrôles et des échantillons.

VIII.1. iQ-Check Screen *Legionella*

Vérifier dans les données brutes que la courbe est une courbe habituelle (avec une base plane, suivie d'une croissance exponentielle de fluorescence puis d'un plateau). Il convient de plus de vérifier la validité du contrôle interne pour chaque puits. Vérifier ensuite la validité des contrôles positifs et négatifs avant de lire les valeurs de Cq de chaque échantillon.

1. Contrôles négatifs et positifs

Pour que le test soit validé, les résultats des contrôles positifs et négatifs doivent être les suivants :

	Détection de <i>Legionella</i> spp. ou de <i>Legionella pneumophila</i> (FAM)	Détection du contrôle interne (Canal HEX)
Contrôle négatif	N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Contrôle positif	$30 \leq Cq \leq 40$	Non significatif

* N/A signifie "Non applicable". Le logiciel indique N/A pour le Cq d'un échantillon lorsque la courbe de fluorescence ne dépasse pas le seuil.

Si les résultats des contrôles négatifs et positifs diffèrent de ceux présentés dans le tableau ci-dessus, la PCR est invalide et doit être répétée.

2. Échantillons

Les résultats des échantillons doivent être interprétés comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Détection de <i>Legionella</i> spp. ou <i>L. pneumophila</i> (FAM)	Détection du contrôle interne (Canal HEX)	Résultat	Interprétation
$Cq \geq 10$	Non significatif	Positif	Présence de la cible dans l'échantillon
$Cq > \text{Valeur Intercepte}^*$	$28 \leq Cq \leq 40$	Négatif	Amplification non significative
N/A	$28 \leq Cq \leq 40$	Négatif	Cible non détectée à la Limite de Détection de la méthode
	N/A	Inhibition	Diluer l'ADN extrait (1/10 par exemple) et répéter l'amplification PCR
	$Cq > 40$		
	$Cq < 28$	Erreur d'analyse	Répéter l'analyse PCR (chapitre VII.5.) ou l'amplification PCR

Remarque : la dilution de l'échantillon d'ADN doit être effectuée dans le tampon utilisé pour l'éluion à la fin de l'étape d'extraction.

**La valeur d'ordonnée à l'origine (Intercepte) à prendre en compte dans le cadre d'une analyse qualitative est de $Cq=43$ (cette valeur permet de donner une indication sur la valeur d'intercepte choisie dans le cadre de la validation). Cette valeur peut être déterminée par l'utilisateur en réalisant une moyenne des valeurs d'interceptes obtenues à laquelle sont ajoutés 2 écart-types.*

3. Limite de détection de la méthode

La limite de détection de l'étape de PCR (Ld PCR) pour une méthode de détection et de quantification de *Legionella* par PCR est définie comme le plus petit nombre d'Unités Génome générant un résultat positif au seuil de confiance de 90% (NF T90-471). La limite de détection de l'étape de PCR (Ld PCR) est de 5 Unités Génome par $5 \mu\text{L}$ d'ADN extrait. Pour calculer la limite de détection théorique de la méthode globale (Ld) pour un échantillon d'1 L, il faut prendre en considération le facteur Z.

Z représente la fraction de l'échantillon déposé dans chaque puits PCR. La valeur de Z dépend du protocole d'extraction de l'ADN utilisé. Elle est fournie dans la notice du kit d'extraction d'ADN Aquadien™.

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

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume de l'échantillon filtré (en L)}}$$

La Ld théorique de la méthode globale est calculée dans le cas d'un rendement de filtration et d'extraction de 100%.

VIII.2. iQ-Check Quanti *Legionella*

Vérifier dans les données brutes que la courbe est une courbe habituelle (avec une base plane, suivie d'une croissance exponentielle de fluorescence puis d'un plateau). Il convient de plus de vérifier la validité du contrôle interne pour chaque puits. Vérifier ensuite la validité des standards de quantification et des contrôles avant de lire la quantité moyenne d'Unités Génome calculée pour chaque échantillon.

1. Contrôles et standards

Pour que le test soit validé, les résultats du contrôle négatif, du Matériau de Référence et des standards de quantification doivent être les suivants :

Paramètre	Détection de <i>Legionella</i> spp. ou de <i>Legionella pneumophila</i> (FAM-490)	Détection du contrôle interne (Canal HEX)
Contrôle négatif	N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Efficacité de la PCR	$75\% \leq \text{Efficacité de PCR} \leq 125\%$	Non significatif
Coefficient de corrélation (r^2)	≥ 0.99	
Qs 1 à Qs 4	$20 \leq Cq \leq 40$	$28 \leq Cq \leq 40$

* N/A signifie "Non applicable". Le logiciel indique N/A pour le Cq d'un échantillon lorsque la courbe de fluorescence ne dépasse pas le seuil.

Si l'un des standards de quantification se trouve significativement en dehors de la courbe de calibrage, il peut être éliminé afin d'optimiser les résultats et d'atteindre les paramètres ci-dessus. Un seul réplicat peut être éliminé. Le Matériau de Référence devra satisfaire aux exigences de la norme T90-471.

Si les résultats des contrôles négatifs et des standards diffèrent de ceux présentés dans le tableau ci-dessus, il est nécessaire de recommencer l'analyse de la PCR ou la PCR.

2. Échantillons

Les résultats des échantillons doivent être interprétés comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Détection de <i>Legionella</i> spp. ou <i>L. pneumophila</i> (FAM)	Détection du contrôle interne (Canal HEX)	Résultat	Interprétation
Cq ≥ 10	$Cq \leq \text{Moy Cq Qs} + 3 \sigma$	Positif	Présence de la cible dans l'échantillon, quantification possible
	N/A	Inhibition	Diluer l'extrait d'ADN (1/10 par exemple) et répéter l'amplification PCR
	$Cq > \text{Moy Cq Qs} + 3 \sigma$		
N/A	$\text{Moy Cq Qs} - 3 \sigma \leq Cq \leq \text{Moy Cq Qs} + 3 \sigma$	Négatif	Cible non détectée à la Limite de Détection de la méthode
	N/A	Inhibition	Diluer l'ADN extrait (1/10 par exemple) et répéter l'amplification PCR
	$Cq > \text{Moy Cq Qs} + 3 \sigma$		
	$Cq < \text{Moy Cq Qs} - 3 \sigma$	Erreur d'analyse	Répéter l'analyse PCR (chapitre VII.5.) ou l'amplification PCR

Moy Cq Qs est la moyenne des valeurs de Cq de tous les contrôles internes des Qs (HEX).

σ est l'écart-type.

Remarque: • la dilution de l'ADN doit être effectuée dans le tampon utilisé pour l'éluion à la fin de l'étape d'extraction • si un échantillon est très fortement contaminé par *Legionella* ($Cq_{FAM} < Cq_{FAM} Qs4$), le Cq_{HEX} peut être supérieur au Cq_{HEX} du Qs4. Cet échantillon se trouve en dehors de la dynamique de la quantification et doit être dilué et soumis à une nouvelle PCR si une quantification précise est recherchée. • Un puits avec une valeur de Cq supérieure à la valeur de l'intercepte *b*, et sans inhibition ne sera pas considéré comme positif.

a. Calcul de la concentration de *Legionella*

Les valeurs indiquées dans le rapport pour chaque échantillon correspondent à la quantité initiale d'Unités Génome de *Legionella* présentes dans 5 µL de l'extrait d'ADN. Pour obtenir la concentration de *Legionella* en Unités Génome/1 L d'échantillon d'eau, tenir compte de la valeur moyenne de quantification ("mean GU/well") calculée par le logiciel pour chacun des échantillons. Appliquer la formule suivante :

$$X = \frac{[\text{Quantité moyenne dans 5 } \mu\text{L}] \times Z \times D}{\text{Volume de l'échantillon filtré (en L)}}$$

X représente les Unités Génome de *Legionella* dans 1 L d'échantillon d'eau.

Z représente la fraction de l'échantillon déposé dans chaque puits de PCR. La valeur de Z dépend du protocole d'extraction de l'ADN utilisé. Elle est fournie dans la notice du kit d'extraction d'ADN Aquadien™.

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

Remarque : Si pour un échantillon, sur les 2 points d'analyse PCR, un des résultats est positif et l'autre négatif, l'échantillon est considéré comme positif.

b. Limite de détection, Limite de quantification et Limite haute de quantification de la méthode

Limite de détection de la méthode

La limite de détection de l'étape de PCR (Ld PCR) pour une méthode de détection et de quantification de *Legionella* par PCR est définie comme le plus petit nombre d'Unités Génome générant un résultat positif au seuil de confiance de 90% (norme NF T90-471).

La limite de détection de l'étape de PCR (Ld PCR) est de 5 Unités Génome par 5 µL d'ADN extrait.

Pour calculer la limite de détection théorique de la méthode globale (Ld) pour un échantillon d'1 L, il faut prendre en considération le facteur Z divisé par 2 (2 points de PCR sont testés pour chaque échantillon).

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

$$Ld = \frac{5 \times Z \times D}{\text{Volume de l'échantillon filtré (en L) } \times 2}$$

La Ld théorique de la méthode globale est calculée dans le cas d'un rendement de filtration et d'extraction de 100%.

Limite de quantification de la méthode

La limite de quantification de l'étape de PCR (Lq PCR) pour une méthode de quantification de *Legionella* par PCR est définie comme le plus petit nombre de copies permettant une répétabilité et une précision de quantification telles que décrites dans la norme NF T90-471.

Qs1, le premier point de la gamme de standards de quantification, correspond à la Limite de quantification pour chaque lot de kits iQ-Check Quanti *Legionella*.

La valeur exacte du Qs1 pour chaque lot de standards de quantification est indiquée sur la Carte de Calibration et sur le Certificat d'analyse. Pour calculer la limite de quantification exacte pour la méthode globale, appliquer la formule suivante :

$$Lq = Qs1 \times Z$$

Si le laboratoire filtre un volume d'eau différent d'1 L, ou si l'extrait d'ADN doit être dilué, la Lq de la méthode globale change. Pour calculer la nouvelle Lq par litre d'eau, utiliser la formule suivante :

$$Lq = \frac{Qs1 \times Z \times D}{\text{Volume de l'échantillon filtré (en L)}}$$

Limite haute de quantification de la méthode

La Limite haute de quantification (Lhq) de la méthode correspond à la valeur (pour 1 L) donnée par le plus haut point de la gamme de standards de quantification, c'est-à-dire le point Qs4. La valeur exacte du Qs4 pour chaque lot de standards de quantification est indiquée sur la Carte de Calibration et sur le Certificat d'analyse.

Pour obtenir la Lhq de la méthode, il faut multiplier la valeur du standard Qs4 par la fraction de l'échantillon analysé Z et par le facteur de dilution D.

$$Lhq = \frac{Qs4 \times Z \times D}{\text{Volume de l'échantillon filtré (en L)}}$$

c. Expression des résultats

Le résultat final est exprimé en Unités Génome/L avec 2 chiffres significatifs (p. ex. : 1300 UG/L pour une concentration calculée de 1256 Unités Génome/L.)

Résultat en Unités Génome/PCR	Interprétation et conclusion	
< 5	< Ld*	Cible non détectée à la limite de détection de la méthode
[5, Qs1)	< Lq*	Présence de la cible, non quantifiable
[Qs1 - Qs4]	X*	Présence de la cible, résultat quantifiable
> Qs4	Lhq*	Forte présence de la cible, supérieure à Lhq. Dilution possible de l'échantillon d'ADN si besoin d'un résultat quantitatif précis

* Voir paragraphe VIII.2, sections 2b et 2c pour le calcul respectif des valeurs de X, Ld, Lq et Lhq de la méthode globale.

IX. VALIDATIONS



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>

iQ-Check *Legionella* spp. and iQ-Check *L. pneumophila* sont certifiés NF VALIDATION selon le protocole de validation basé sur la norme NF T90-471 (Juin 2015).

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)".

La certification inclut l'utilisation des instruments CFX96™ Deepwell Touch, CFX96™ et Chromo4™.

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.

X. BIBLIOGRAPHIE

1. Tyagi S, Kramer FR. (1996).
Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.*14:303-308.
2. Wolters J, Erdmann VA. (1986).
Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res.* 16 Suppl:r1-70.
3. MacDonell MT, Colwell RR. (1987).
The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res.* 15:1335.
4. Engleberg NC, Carter C, Weber DR, Cianciotto NP, Eisenstein BI. (1989).
DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun.* 57:1263-1270.
5. AFNOR XP T90-471: Detection and quantification of *Legionella* and *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification (April 2006).
6. AFNOR T90-471: Detection and quantification of *Legionella* and *Legionella pneumophila* by concentration and PCR amplification (April 2010).
7. NF T 90-431, Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* - Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration or centrifugation.
8. ISO 11731-2: Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* - Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts.

XI. ANNEXE : TABLEAU DE PIPETAGE

Ce tableau de pipetage a été calculé en prenant en compte une marge de pipetage de 8%. Pour la quantification, tenir compte du fait que tous les échantillons et contrôles sont testés en duplicat. Par exemple : si 10 échantillons doivent être amplifiés à des fins de quantification, 4 standards d'ADN et 1 contrôle négatif seront chargés dans le même cycle. Au total, 30 puits (10+4+1 puits en double) seront testés, et 162 µL de sondes fluorescentes seront mélangés à 1 300 µL de solution d'amplification.

Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µL)	Mélange d'amplification (µL)	Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µL)	Mélange d'amplification (µL)
1	5	40	49	265	2120
2	11	88	50	270	2160
3	16	128	51	275	2200
4	22	176	52	281	2250
5	27	216	53	286	2290
6	32	256	54	292	2340
7	38	304	55	297	2380
8	43	344	56	302	2420
9	49	392	57	308	2470
10	54	432	58	313	2500
11	59	472	59	319	2550
12	65	520	60	324	2590
13	70	560	61	329	2630
14	76	608	62	335	2680
15	81	648	63	340	2720
16	86	688	64	346	2770
17	92	736	65	351	2810
18	97	776	66	356	2850
19	103	824	67	362	2900
20	108	864	68	367	2940
21	113	904	69	373	2984
22	119	952	70	378	3024
23	124	992	71	383	3064
24	130	1040	72	389	3110
25	135	1080	73	394	3150
26	140	1120	74	400	3200
27	146	1170	75	405	3240
28	151	1200	76	410	3280
29	157	1260	77	416	3330
30	162	1300	78	421	3370
31	167	1340	79	427	3420
32	173	1380	80	432	3460
33	178	1420	81	437	3500
34	184	1470	82	443	3540
35	189	1510	83	448	3580
36	194	1550	84	454	3630
37	200	1600	85	459	3670
38	205	1640	86	464	3710
39	211	1690	87	470	3760
40	216	1730	88	475	3800
41	221	1770	89	481	3850
42	227	1820	90	486	3890
43	232	1860	91	491	3930
44	238	1900	92	497	3980
45	243	1940	93	502	4020
46	248	1980	94	508	4060
47	254	2030	95	513	4100
48	259	2070	96	518	4140

Information à l'acheteur : Licence partielle

L'utilisation de ce produit est couverte par un ou plusieurs des brevets américains suivants et par les revendications de brevet correspondantes en dehors des États-Unis : 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (revendications 1 à 23 uniquement) et 5 773 258 (revendications 1 et 6 uniquement) et revendications en dehors des États-Unis correspondant au brevet américain N° 4 889 818. L'achat de ce produit inclut une immunité limitée et non transférable contre toute poursuite sous les revendications de brevet mentionnées ci-dessus pour l'utilisation de cette quantité du produit uniquement à des fins de tests alimentaires, de tests environnementaux et de microbiologie industrielle, incluant la notification des résultats des activités de l'acheteur contre une rémunération ou autre considération commerciale, ainsi que pour les propres recherches de l'acheteur. Aucun droit lié à une revendication de brevet (comme les revendications 5' Nuclease Process des brevets américains N° 5 210 015 et 5 487 972) n'est transféré expressément, par implication ni par estoppel. Pour plus d'informations sur l'achat de licences, veuillez contacter le directeur des concessions de licences, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

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: 881117