



Association **G**énérale des **L**aboratoires
d'**A**nalyses de l'**E**nvironnement

NOTE TECHNIQUE N°4

Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* dans les eaux propres : RT-PCR *versus* Culture Un exemple issu des essais interlaboratoires

Ce document est diffusé à titre informatif et
est basé sur des résultats et observations
d'essais interlaboratoires A.G.L.A.E.

Novembre 2014

Rédacteurs :

Olivier MOLINIER

Mylène COINTE, Eric PIERLOT, Philippe GUARINI

Association AGLAE

Parc des Pyramides

427 rue des Bourreliers

59320 Hallennes lez Haubourdin

☎ 03 20 16 91 40

contact@association-aglae.fr

www.association-aglae.fr



SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
Problématique.....	2
DONNEES	2
Essais concernés.....	2
Description des essais.....	3
RESULTATS & BILAN	3
Résultats obtenus.....	3
Bilan.....	7
BIBLIOGRAPHIE	7

INTRODUCTION

Problématique

En 2013, un même matériau d'essai a été envoyé aux participants des essais interlaboratoires 13M32.2 et 13M35.5 portant respectivement sur la recherche et le dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* sur eaux propres par culture et sur la détection et quantification des *Legionella* et *Legionella pneumophila* sur eaux propres par PCR.

Cette note technique a pour objet de réaliser un parallèle entre les performances des deux méthodes en termes de niveau de réponse et en termes de fidélité.

DONNEES

Essais concernés

L'essai interlaboratoires 13M32.2 portant sur la recherche et le dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par culture comportait 263 laboratoires. Les participants avaient essentiellement utilisé la NF T 90-431 (2003).

Pour l'essai 13M35.2 relatif à la détection et quantification des *Legionella* et *Legionella pneumophila* par PCR, 36 laboratoires avaient pris part à l'exercice d'intercomparaison. La méthode employée était majoritairement la NF T 90-471 (2010).

L'envoi des échantillons communs à ces deux essais a eu lieu le 17/09/2013.

Les deux essais ont été réalisés sous accréditation COFRAC ; la qualité des échantillons envoyés a été vérifiée sur le plan de la stabilité et de l'homogénéité de lot.

Description des essais

Paramètres	<i>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Matrice utilisée	Eau de réseau chlorée puis neutralisée par ajout de thiosulfate de sodium	
Dopage réalisé	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1 WDCM 00107 (DSM7513T, ATCC33152, CIP103854T, NCTC11192)	
Modalités d'analyse	Deux flacons A et B issus du même lot ont été envoyés à chaque laboratoire Sur chaque flacon, il était demandé une détermination en double du nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) et d'Unités Génomes (UG) dans 200 ml	
Qualité des matériaux	La stabilité et l'homogénéité des échantillons étaient satisfaisantes dans la période optimale retenue pour l'évaluation des performances des méthodes.	

Tableau 1 : description des essais

RESULTATS & BILAN

Résultats obtenus

Legionella spp.

Performance	Culture	PCR
Moyenne (valeur de consensus)	22 471 germes dans 200 ml (soit 4,352 en log)	230 464 UG dans 200 ml (soit 5,363 en log)
Intervalle de confiance autour de la moyenne	[2,17.10 ⁴ ; 2,33.10 ⁴] UFC dans 200 ml	[1,75.10 ⁵ ; 3,04.10 ⁵] UG dans 200 ml
répétabilité r en ratio ⁽¹⁾ (limite de répétabilité en log)	1,8 (soit 0,26 en log)	2,3 (soit 0,37 en log)
Reproductibilité R en ratio ⁽¹⁾ (limite de Reproductibilité en log)	2,5 (soit 0,39 en log)	6,5 (soit 0,81 en log)
CVR% ⁽²⁾	2,0	2,5
CVR% ⁽²⁾	3,0	5,5

⁽¹⁾ exprimée en rapport maximal à 95% entre deux mesures indépendantes

⁽²⁾ coefficient de variation des écart-types de répétabilité et reproductibilité en log par rapport à la moyenne en log

Tableau 2 : niveaux de réponse et fidélité observés par les deux méthodes pour L. spp.

Legionella pneumophila

Performance	Culture	PCR
Moyenne (valeur de consensus)	22 543 germes dans 200 ml (soit 4,353 en log)	197 558 UG dans 200 ml (soit 5,296 en log)

Performance	Culture	PCR
Intervalle de confiance autour de la moyenne	$[2,17 \cdot 10^4; 2,34 \cdot 10^4]$ germes dans 200 ml	$[1,52 \cdot 10^5; 2,57 \cdot 10^5]$ UG dans 200 ml
répétabilité r en ratio ⁽¹⁾ (limite de répétabilité en log)	1,9 (soit 0,28 en log)	2,3 (soit 0,36 en log)
Reproductibilité R en ratio ⁽¹⁾ (limite de Reproductibilité en log)	2,5 (soit 0,39 en log)	7,1 (soit 0,85 en log)
CVR% ⁽²⁾	2,0	2,5
CVR% ⁽²⁾	3,0	5,5

⁽¹⁾ exprimée en rapport maximal à 95% entre deux mesures indépendantes

⁽²⁾ coefficient de variation des écart-types de répétabilité et reproductibilité en log par rapport à la moyenne en log

Tableau 3 : niveaux de réponse et fidélité observés par les deux méthodes pour *L. pneumophila*.

Justesse relative

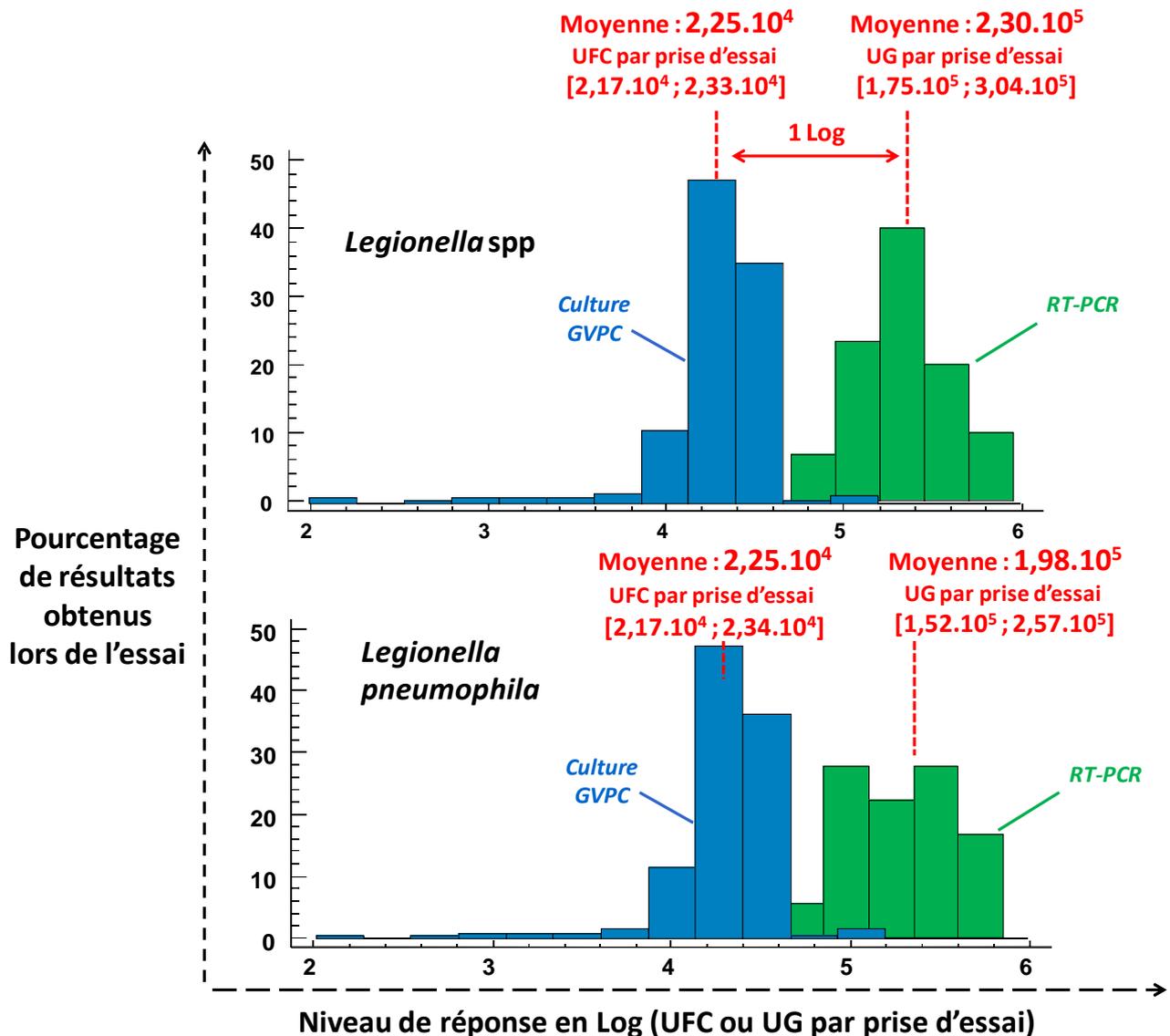


Figure 1 : niveaux de réponse observés pour les deux méthodes

Pour le paramètre "*Legionella spp.*", la moyenne par PCR est significativement plus élevée que la moyenne obtenue par culture, avec un écart d'1 log.

Pour le paramètre "*Legionella pneumophila*", la moyenne obtenue par PCR est également significativement plus élevée que celle observée par culture, l'écart étant de 0,9 unité log.

Fidélité

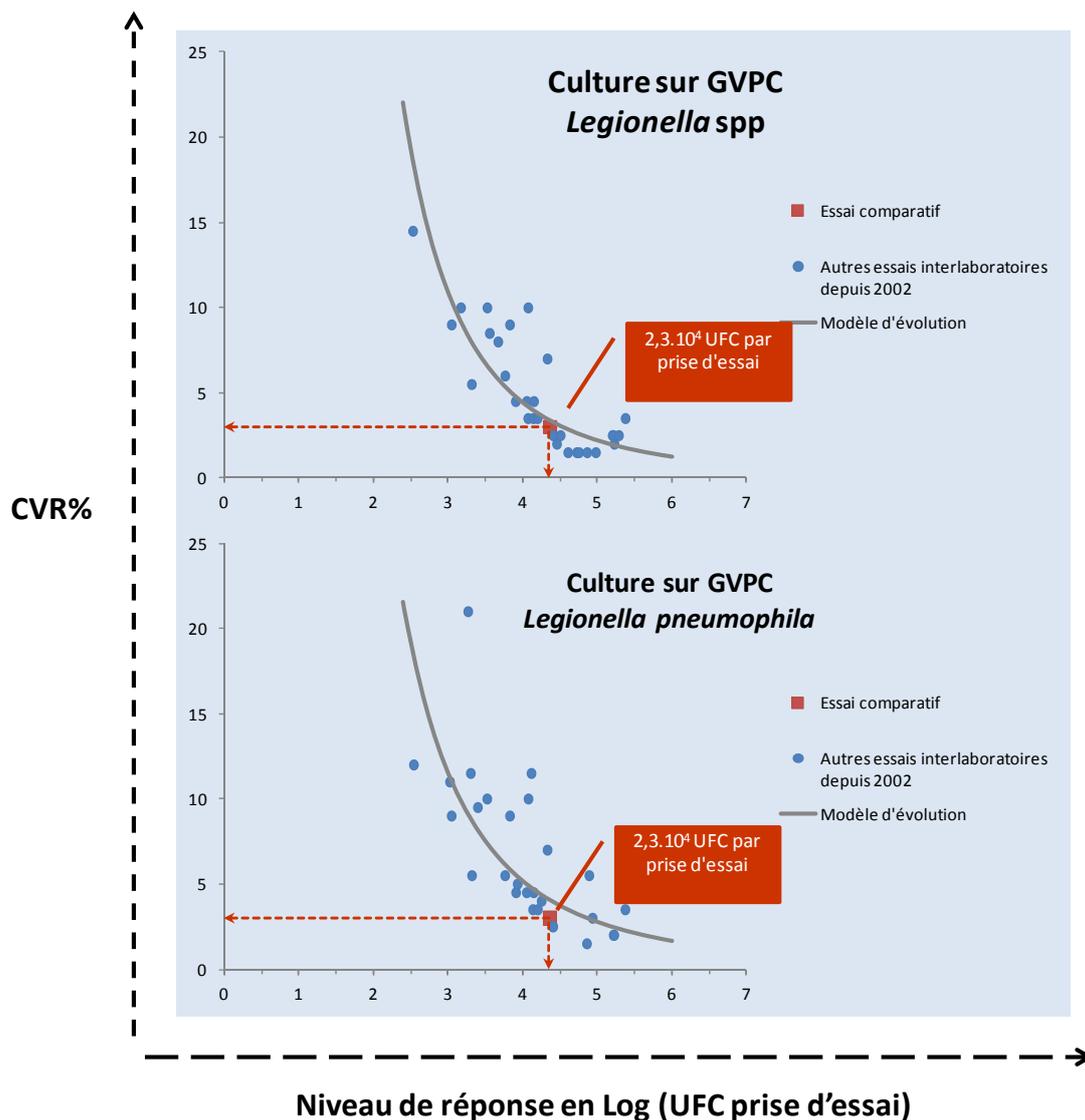


Figure 2 : évolution des valeurs de reproductibilité ($CV_R\%$) en fonction du niveau de réponse de la méthode par culture

Du point de vue des dispersions observées, les valeurs de Reproductibilité obtenues pour l'essai étaient cohérentes avec celles observées lors d'essais interlaboratoires précédents :

- ✓ CVR% de l'ordre de 3% pour la culture sur GVPC, autour de $2 \cdot 10^4$ UFC par prise d'essai (figure 2);
- ✓ CVR% de l'ordre de 5% pour la RT-PCR, autour de $2 \cdot 10^5$ UG par prise d'essai (figure 3).

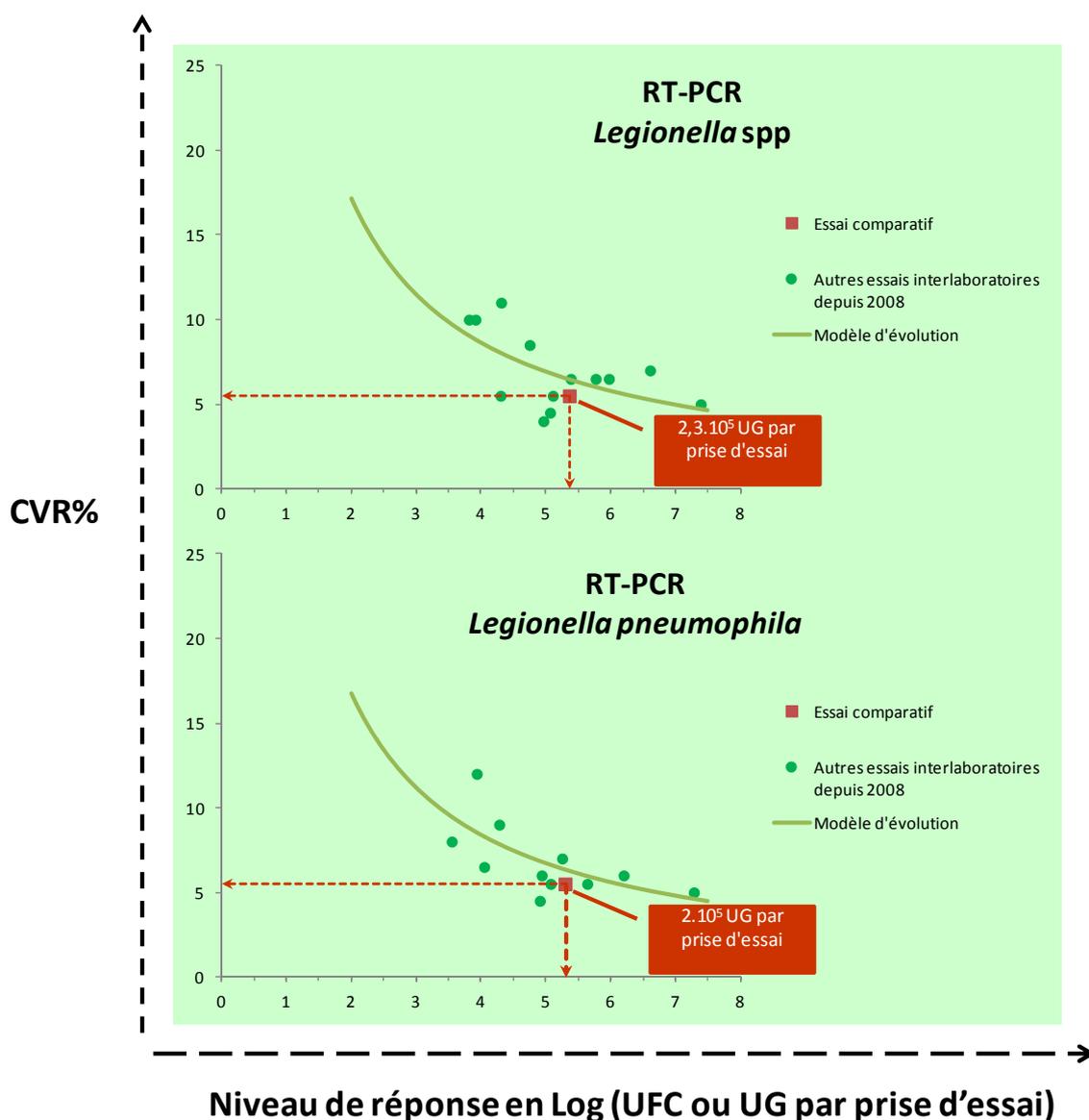


Figure 3 : évolution des valeurs de reproductibilité ($CV_R\%$) en fonction du niveau de réponse de la méthode RT-PCR



Bilan

Les résultats obtenus lors de cet essai corroborent les observations déjà réalisées en étude interlaboratoires (Lee & al., 2011).

- Malgré le décalage de réponse observé lors de l'essai, les reproductibilités de l'une et l'autre des méthodes ne se révèlent pas radicalement différentes ;
- Compte-tenu des modèles d'évolution, à la valeur règlementaire de 10^3 UFC/L en culture, le signal correspondant en PCR de 10^4 UG/L est **observable avec une reproductibilité comparable, voire sensiblement meilleure** ;
- Dans le contexte plus général des réflexions autour de l'introduction de la RT-PCR pour le contrôle sanitaire des eaux (*rapport ANSES – Avril 2011*), cet essai confirme l'intérêt de la technique et son raccordement à la culture en termes de justesse et de fidélité, à l'échelle de la profession.

BIBLIOGRAPHIE

ANSES. Avril 2011. Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. Avis de l'Anses – Rapport d'Expertise collective – Edition scientifique

ISO 5725-1:1994, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure -- Partie 1: Principes généraux et définitions

ISO 5725-2:1994, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure -- Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

Lee JV, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, Hartemann P, Lück C, Pangon B, Ricci ML, Scaturro M, Fontana S, Sabria M, Sánchez I, Assaf S, Surman-Lee S. 2011. An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. *J. Appl. Bact.* **110**: pp. 1032-1044.