

**Programme d'accréditation
des laboratoires d'analyse**

**PROTOCOLE POUR LA VALIDATION ET
LA VÉRIFICATION D'UNE MÉTHODE
D'ANALYSE EN MICROBIOLOGIE**

DR-12-VMM

Édition : 30 juillet 2010

Pour toute information complémentaire sur les activités du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec ou pour vous procurer nos documents, veuillez consulter notre site Internet à l'adresse suivante : www.ceaeq.gouv.qc.ca

ou communiquer avec nous :

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
Complexe scientifique
2700, rue Einstein, bureau E-2-220
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301
Télécopieur : 418 528-1091
Courriel : ceaeq@mddep.gouv.qc.ca

Référence bibliographique

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Protocole pour la validation et la vérification d'une méthode d'analyse en microbiologie*, DR-12-VMM, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Édition courante.

Dépôt légal – Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2010

ISBN 978-2-550-59696-7 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2010

AVANT-PROPOS

Au cours des deux dernières décennies, le Québec a vu s'implanter un grand nombre de laboratoires commerciaux, industriels et institutionnels exerçant leurs activités dans le domaine de la protection de l'environnement. Ce réseau de laboratoires est non seulement important pour l'économie de la province, mais il permet également de répondre aux besoins en matière de connaissances environnementales à la grandeur du territoire.

Le ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, au moyen du *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse* (PALA), a facilité en quelque sorte l'émergence de cette partie de l'industrie.

Le *Protocole pour la validation et la vérification d'une méthode d'analyse en microbiologie* s'inscrit dans la série de documents de référence produits par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, responsable de la gestion du PALA pour le Ministère. Le protocole précise les exigences liées à la validation des méthodes d'analyse en microbiologie lors de l'implantation de nouvelles méthodes normalisées au laboratoire et du suivi des méthodes en utilisation.

Ce document est réservé aux méthodes quantitatives uniquement. La vérification des méthodes présence/absence se fait par les contrôles réguliers de la méthode.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	3
1. INTRODUCTION.....	7
2. LIMITE DE DÉTECTION D'UNE MÉTHODE.....	7
2.1. Moyens pour déterminer la limite de détection d'une méthode	7
3. LIMITES DE QUANTIFICATION D'UNE MÉTHODE	8
4. FIDÉLITÉ.....	8
4.1. Réplicabilité	8
4.2. Répétabilité	9
4.3. Reproductibilité	9
4.4. Méthode de calcul de la réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité	9
5. POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION	10
5.1. Méthode de calcul du pourcentage de récupération.....	10
6. PERFORMANCE DE LA MÉTHODE	11
6.1. Méthode de calcul de la performance	11
7. SÉLECTIVITÉ DE LA MÉTHODE.....	11
7.1. Méthode de calcul de la sélectivité :.....	12
GLOSSAIRE.....	13
BIBLIOGRAPHIE	14
ANNEXE I.....	15
ANNEXE II	17
ANNEXE III	19
ANNEXE IV	21

1. INTRODUCTION

Ce document définit les termes et le processus relatifs à la fiabilité et à la validation secondaire d'une méthode d'analyse en microbiologie lors de son implantation et à la vérification de la performance d'une méthode déjà en utilisation au laboratoire.

La validation initiale (primaire) d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres : la limite de détection d'une méthode, les limites de quantification d'une méthode, la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la performance, la sélectivité et, finalement, la récupération. Elle est généralement effectuée par l'organisme ayant mis au point cette méthode.

La validation secondaire est effectuée lors de l'implantation d'une méthode de référence normalisée (par le CEAÉQ, le ministère de l'Environnement de l'Ontario, l'USEPA, Santé Canada, ISO, AFNOR, etc.) pour vérifier la capacité du laboratoire à obtenir une performance comparable aux données de validation publiées. Elle permet d'établir si la nouvelle méthode est équivalente ou supérieure à la méthode usuelle du laboratoire. Les données de validation permettent ensuite d'effectuer le suivi de la performance de la méthode en cours d'utilisation, de détecter des tendances et des problèmes potentiels sur le plan analytique, d'évaluer la performance des analystes et de déterminer l'incertitude de mesure des méthodes.

Il existe plusieurs définitions et de nombreuses façons de calculer les différents paramètres liés à la validation d'une méthode. Il devient essentiel d'uniformiser ces définitions ainsi que les méthodes de calcul utilisées pour déterminer la conformité du laboratoire aux exigences du présent protocole.

L'annexe I illustre les formules de calcul qui sont utilisées pour la détermination des différents paramètres de validation.

2. LIMITE DE DÉTECTION D'UNE MÉTHODE

La limite de détection d'une méthode (LDM) permet de déceler la concentration minimale, à l'aide d'une méthode d'analyse, avec une fiabilité définie. Théoriquement, pour une méthode en microbiologie, il s'agit d'un organisme cible dans le volume d'échantillon analysé.

2.1. Moyens pour déterminer la limite de détection d'une méthode

La détermination de la LDM s'effectue de la façon suivante :

- utilisation de la concentration indiquée dans la méthode de référence normalisée.

3. LIMITES DE QUANTIFICATION D'UNE MÉTHODE

Les limites de quantification d'une méthode (LQM) sont les concentrations la plus basse et la plus élevée, correspondant au nombre de colonies isolées d'un volume donné d'échantillon, qui peuvent être dénombrées sur une seule membrane ou gélose, à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie et qui constitue la zone quantifiable d'une méthode. Les limites de quantification sont généralement définies dans les méthodes de référence normalisées.

La limite supérieure de quantification est la valeur au-delà de laquelle la fiabilité d'un dénombrement sur une seule membrane ou gélose à l'aide d'un volume déterminé d'échantillon est affectée par des facteurs incontrôlables.

La limite inférieure de quantification est la valeur en deçà de laquelle l'erreur anticipée devient trop grande par rapport au nombre de colonies dénombrées.

4. FIDÉLITÉ

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises ($n = 10$ réplicats) dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de réplicabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

4.1. Réplicabilité

La réplicabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les mêmes conditions : même analyste, mêmes entonnoirs (filtration), même lot de milieu de culture et membrane filtrante, même incubateur, même jour d'analyse. La réplicabilité peut varier d'un analyste à un autre. Dans la littérature, l'expression « précision intra-technicien » est souvent employée. D'ailleurs, cette donnée peut servir ultérieurement à l'évaluation et au suivi de la performance technique d'un analyste.

Ce paramètre de validation est déterminé à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975;n-1)} \times s_1}{\sqrt{n}}$$

où s_1 : écart type d'une série de mesures se référant à la réplicabilité.

4.2. Répétabilité

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, le lot de milieu de culture, l'incubateur, etc. Habituellement, l'élément différent est l'analyste. Dans la littérature, l'expression « précision inter-technicien » est souvent employée. Cette donnée peut servir à établir les critères d'assurance qualité pour une méthode donnée à l'aide de la charte de contrôle de duplicata.

Ce paramètre de validation est déterminé à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975;n-1)} \times s_2}{\sqrt{n}}$$

où s_2 : écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité.

4.3. Reproductibilité

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, même jour.

Cette donnée n'est disponible que si le laboratoire participe à un essai inter-laboratoire pour une méthode identique et un même échantillon et n'est requise que pour la validation d'une méthode développée par le laboratoire. À l'intérieur du PALA, le critère de variation relatif (CVR) est un excellent indicateur de la reproductibilité d'une méthode.

4.4. Méthode de calcul de la réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité

Les trois termes précédents se rapportant à la fidélité s'expriment à l'aide d'un intervalle de confiance à une concentration donnée, en fonction de l'écart type ($s_{(n)}$), à un niveau de confiance spécifié, habituellement 95 %, et pour un nombre donné de déterminations ($n = 10$ répliqués).

L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante :

$$\bar{x} \pm \frac{t_{(0,975;n-1)} \times s}{\sqrt{n}}$$

Lorsque $n \geq 30$, $t_{(0,975; n-1)} = 2$. Pour $n < 30$, il faut se référer à une table statistique de la distribution de Student pour connaître la valeur de $t_{(0,975; n-1)}$ correspondant à la probabilité au dépassement bilatéral (voir l'annexe II). Pour 10 réplicats, $t_{(0,975; n-1)} = 2,262$.

La réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité doivent être déterminées dans la zone quantifiable de la méthode. Il faut donc choisir une concentration d'un échantillon réel ou fortifié et faire dix réplicats du même échantillon. Chaque échantillon doit subir toutes les étapes de la méthode d'analyse **en respectant les conditions spécifiées à l'égard de la réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité** (analyste, appareil, jour et laboratoire). Faire l'ensemble des calculs liés à la méthode et reporter les résultats en utilisant les unités appropriées et le nombre de chiffres significatifs nécessaire. Un test de rejet reconnu (Grubb, Dixon, etc.) doit être inclus dans les calculs si certaines données semblent aberrantes.

L'annexe IV présente des exemples d'approches pour le calcul de la réplicabilité et de la répétabilité.

5. POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION

Le pourcentage de récupération permet de déterminer, pour un échantillon donné ou un type de matrice donné et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse.

Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié et la concentration mesurée du même échantillon non fortifié, divisée par la concentration de la substance ajoutée. Un minimum de cinq essais est demandé pour l'évaluation d'une méthode d'analyse.

5.1. Méthode de calcul du pourcentage de récupération

Dans la zone quantifiable de la méthode, analyser cinq échantillons réels. L'eau stérile ou déminéralisée n'est pas considérée comme un échantillon réel, contrairement à l'eau prélevé à même le robinet.

Ajouter une concentration de l'organisme ciblé tout en évitant de se rendre au-delà de la limite supérieure de quantification de la méthode. La concentration de l'organisme ajoutée doit être vérifiée par une autre méthode comme l'incorporation à la gélose utilisant un milieu de culture non sélectif.

$$\text{Récupération (\%)} = \frac{C_f - C}{C_a} \times 100$$

où

C_f : concentration mesurée d'un échantillon fortifié

C : concentration mesurée d'un échantillon non fortifié

C_a : concentration de l'organisme cible ajoutée

6. PERFORMANCE DE LA MÉTHODE

La performance de la méthode peut se mesurer à l'aide de la sensibilité, la spécificité, le taux de faux positifs, le taux de faux négatifs et l'efficacité. Les données de confirmation amassées au cours des dernières années peuvent être utilisées par le laboratoire. Le résultat sera bien plus représentatif de la réalité de la méthode si un grand nombre de données est utilisé.

La sensibilité est la fraction de tous les résultats positifs correctement attribuée dans le comptage présumé; la spécificité est la fraction de tous les résultats négatifs correctement attribuée dans le comptage présumé; le taux de faux positifs est la fraction de positifs observés non correctement attribuée; le taux de faux négatifs est la fraction de négatifs observés non correctement attribuée; l'efficacité est la fraction de colonies attribuée correctement.

6.1. Méthode de calcul de la performance

À l'aide des résultats des colonies typiques et atypiques présumées et confirmées, déterminer la performance de la méthode à l'aide des formules suivantes :

Sensibilité : $a/(a + b)$

Spécificité : $d/(c + d)$

Taux de faux positifs : $c/(a + c)$

Taux de faux négatifs : $b/(b + d)$

Efficacité : $(a + d)/n$

où

- a : nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)
- b : nombre de résultats présumés négatifs et confirmés positifs (faux négatifs)
- c : nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)
- d : nombre de résultats présumés négatifs et confirmés négatifs (vrais négatifs)
- n : nombre total de colonies

Référer à l'annexe III pour un tableau schématisant ces définitions.

7. SÉLECTIVITÉ DE LA MÉTHODE

La sélectivité est la caractéristique d'une méthode qui favorise la croissance de l'organisme désiré tout en retardant la croissance d'autres organismes n'offrant pas d'intérêt. Les données de confirmation amassées au cours des dernières années peuvent être utilisées par le laboratoire. Le résultat sera bien plus représentatif de la réalité de la méthode si un grand nombre de données est utilisé.

L'index de sélectivité est calculé à l'aide du rapport du nombre de colonies typiques, recherchées et observées, sur le nombre total de colonies bien isolées sur les milieux de culture pendant l'analyse. La sélectivité est meilleure lorsque l'index se rapproche de l'unité.

7.1. Méthode de calcul de la sélectivité :

À l'aide des résultats de confirmation des colonies typiques et atypiques effectuée lors du contrôle de la méthode, déterminer la sélectivité (F) à l'aide de la formule suivante :

$$F = ((a + c)/n)$$

où

- a : nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)
- c : nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)
- n : nombre total de colonies

GLOSSAIRE

Colonie atypique : Colonie qui ne présente pas la morphologie coloniale attendue (aspect et couleur) sur le milieu de culture employé.

Colonie typique : Colonie qui présente la morphologie coloniale attendue (aspect et couleur) sur le milieu de culture employé.

Réplicat : Plusieurs parties aliquotes distinctes obtenues à partir d'un même échantillon et soumises aux mêmes procédures analytiques du prétraitement au dosage.

Duplicata : Deux parties aliquotes distinctes obtenues à partir d'un même échantillon et soumises à toutes les étapes de la procédure analytique.

Échantillon réel : Échantillon prélevé directement dans l'environnement (ex. : eau du robinet, eau de surface, eau usée).

Échantillon fortifié : Échantillon réel auquel on a ajouté une quantité connue d'un ou de plusieurs organismes cibles. La quantité ajoutée doit se situer dans les limites de quantification de la méthode.

BIBLIOGRAPHIE

- APHA-AWWA-WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st Edition, Washington D.C., 2005.
- BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC. *Norme : Eaux – Recherche et dénombrement de coliformes fécaux thermotolérants – Méthode par filtration sur membrane*, Québec, Bureau de normalisation du Québec, 1992, 26 p. (Projet NQ 3600-115)
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Critères de variation relatifs*, DR-12-CVR, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse*, DR-12-PALA, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Protocole de validation des méthodes d'analyses en chimie*, DR-12-VMC, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Édition courante.
- EPA. *Microbiological Methods for Monitoring the Environment (Water and Waste)*, 1998.
- ISO/TR 13843:2000. *Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques*, 1^{re} édition, Suisse, 2000, 47 p.
- ISO 17994. *Qualité de l'eau – Critères permettant d'établir l'équivalence de méthodes microbiologiques*, 1^{re} édition, Suisse, 2004, 20 p.
- TAYLOR, John Keenan. *Quality Assurance of Chemical Measurements*, U.S.A., Lewis Publishers, 1987, 328 p.
- TAYLOR, John Keenan. *Statistical Techniques for Data Analysis*, U.S.A, Lewis Publishers, 1990, p. 220.

ANNEXE I

FORMULES

Dans les tableaux, les données sont exprimées selon la forme suivante :

Moyenne arithmétique des répliquats $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	Écart type $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$	
Récupération $\text{Récupération \%} = \frac{C_f - C}{C_a} \times 100$	Réplicabilité $\frac{t_{(0,975; n-1)} \times S_1}{\sqrt{n}}$	Répétabilité $\frac{t_{(0,975; n-1)} \times S_2}{\sqrt{n}}$
Sensibilité $a/(a + b)$	Spécificité $d/(c + d)$	Taux de faux positifs $c/(a + c)$
Taux de faux négatifs $b/(b + d)$	Efficacité $(a + d)/n$	Sélectivité $F = ((a + c)/n)$

où s : écart type

n : nombre de données sur lesquelles s'appuient les calculs

$\bar{x}$: moyenne arithmétique de n mesures

s_1 : écart type d'une série de mesures se référant à la répliquabilité

s_2 : écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité

V_o : moyenne des valeurs observées

C_f : concentration de l'échantillon fortifié

C : concentration de l'échantillon non fortifié

C_a : concentration de l'organisme cible ajoutée

F : index de sélectivité d'une méthode

$t_{(0,975; n-1)}$: valeur t de Student pour un intervalle bilatéral à un niveau de confiance de 95 % pour n échantillons

a : nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)

b : nombre de résultats présumés négatifs et confirmés positifs (faux négatifs)

c : nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)

d : nombre de résultats présumés négatifs et confirmés négatifs (vrais négatifs)

ANNEXE II

Valeur du t de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 %

Degré de liberté ($n - 1$)	$t_{(0,975)}$
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086
25	2,060
30	2,042
40	2,021
60	2,000

Tiré de : Taylor, John Keenan. *Quality Assurance of Chemical Measurements*, 1987, 328 p.

ANNEXE III

Tableau schématisant les vrais positifs, les vrais négatifs,
les faux positifs et les faux négatifs

		Comptage présumé	
		+	-
Comptage confirmé	+	a	b
	-	c	d

- a : nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)
- b : nombre de résultats présumés négatifs et confirmés positifs (faux négatifs)
- c : nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)
- d : nombre de résultats présumés négatifs et confirmés négatifs (vrais négatifs)

ANNEXE IV

Exemples d'approches pour la validation des méthodes de membranes filtrantes

Répliquabilité

Pour chaque technicien effectuant l'analyse :

1. Chaque technicien effectuant l'analyse effectue 10 filtrations d'un même échantillon. L'écart type des résultats obtenus est ensuite calculé. Il est préférable d'utiliser un échantillon fortifié pour cette étape.
2. Pour chaque milieu de culture utilisé pour les méthodes de membranes filtrantes, chaque technicien lit 10 fois une boîte de Pétri contenant au moins 20 colonies. L'écart type est calculé. Pour la comparaison de lecture, il est préférable d'utiliser un échantillon positif naturel plutôt qu'un échantillon fortifié.
3. La répliquabilité d'un technicien sera calculé à l'aide de la somme de l'écart type des filtrations et de l'écart type des lectures.

Répétabilité

1. Des techniciens différents effectuent 10 filtrations d'un même échantillon. L'écart type des résultats est calculé. Il est préférable d'utiliser un échantillon fortifié pour cette étape.
2. Pour chaque milieu de culture utilisé, tous les techniciens effectuant l'analyse lisent la même boîte de Pétri (un minimum de 10 lectures est requis). L'écart type est calculé. Pour la comparaison de lecture, il est préférable d'utiliser un échantillon positif naturel plutôt qu'un échantillon fortifié.
3. La répétabilité sera calculée à l'aide de la somme de l'écart type des filtrations et de l'écart type des lectures.

Note 1 : Les dilutions (s'il y a lieu) doivent être évaluées séparément.

Note 2 : Si un laboratoire effectue 10 filtrations d'un échantillon contenant le micro-organisme recherché pour chacune des méthodes, l'écart type de comparaison de lecture n'a pas à être ajouté au calcul. L'écart type de comparaison de lecture n'est additionné que lorsqu'une seule série de 10 filtrations d'un échantillon contenant un seul micro-organisme cible est effectuée sur un seul milieu afin d'évaluer toutes les méthodes de filtration sur membrane. Les dilutions (s'il y a lieu) doivent être évaluées séparément.

