



## VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE

	Noms
Auteur(s) :	France Corbeil
Réviser(s) :	Élyse Boivin
Approbateur :	France Corbeil
Coordonnateur du document :	France Corbeil

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

## I. PRÉAMBULE

Ce document remplace la version précédente de la procédure PR-GQ-011. Les principales modifications apportées sont décrites au tableau ci-dessous.

Section	Modification	Justification
VI, C	Retrait de la périodicité.	ACP-15-067

## II. OBJET

Ce document décrit le processus relatif à la validation d'une méthode d'analyse.

## III. OBJECTIFS

Démontrer que la méthode utilisée au laboratoire est apte à l'emploi prévu.

## IV. CHAMPS D'APPLICATION

Ce document s'adresse au personnel technique et aux responsables d'activités des secteurs analytiques.

## V. DÉFINITION DES TERMES

**Actualisation** : Modification en fonction des conditions du moment ou des besoins nouveaux.

**Analyte** : Composé inorganique ou organique incluant une macromolécule (ex. : antigène microbien, acide nucléique, immunoglobuline, enzyme, produit métabolique), un microorganisme ou une espèce microbienne.

**Biais** : la différence entre la moyenne de mesures et la valeur de référence.

**C<sub>50</sub><sup>(1)</sup>** : La concentration de l'analyte, près du seuil de détection, pour laquelle 50 % des résultats sont positifs et 50 % des résultats sont négatifs lorsque plusieurs répliques d'un même échantillon sont analysés à cette concentration.

**Échantillon à valeur unique** : Il s'agit d'un échantillon (étalon, matériau de référence, etc.) utilisé comme élément de contrôle de la qualité qui est analysé à plusieurs reprises dans le temps.

**Échantillon à valeur multiple** : Il s'agit d'un échantillon (étalon, matériau de référence, etc.) utilisé comme élément de contrôle de la qualité pour lequel la valeur attendue peut différer d'une préparation à l'autre.

**Facteur d'élargissement  $k$**  : facteur numérique utilisé comme multiplicateur de l'incertitude type composée pour obtenir l'incertitude élargie ( $k$  étant typiquement compris entre 2 et 3 et = 2 dans cette instruction, correspondant approximativement à un niveau de confiance de 95 %).

**Incertitude de mesure** : paramètre associé au résultat d'un mesurage qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande.

**Incertitude élargie  $U$**  : grandeur définissant un intervalle autour du résultat d'un mesurage, dont on puisse s'attendre à ce qu'il comprenne une fraction élevée de la distribution des valeurs qui pourraient être attribuées raisonnablement au mesurande. L'incertitude élargie  $U$  est calculée à partir d'une incertitude type composée  $uc(y)$  et d'un facteur d'élargissement  $k$ .  $U=k uc(y)$ .

**Incertitude type  $u(x_i)$**  : incertitude du résultat d'un mesurage exprimé sous la forme d'un écart-type.

**Incertitude type composée  $uc(y)$**  : l'incertitude d'un résultat de mesure pour lequel toutes les contributions des sources principales de l'incertitude ont été combinées suivant un modèle statistique.

**Intervalle  $C_5$ - $C_{95}^{(1)}$**  : Il s'agit d'une plage de concentrations, près du seuil de détection, pour laquelle les résultats sont imprécis. À l'extérieur de cet intervalle, les résultats sont systématiquement négatifs (concentrations  $< C_5$ ) ou systématiquement positifs (concentrations  $> C_{95}$ ). L'intervalle  $C_5$ - $C_{95}$  indique la robustesse d'une méthode; plus il est étroit plus la méthode est robuste.

Note :  $C_5$  = la concentration de l'analyte pour laquelle 5 % des résultats sont positifs et  $C_{95}$  = la concentration de l'analyte pour laquelle 95 % des résultats sont positifs.

**Justesse<sup>(2)</sup> ou exactitude**: La justesse à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur certifiée par un organisme reconnu et le résultat moyen qui serait obtenu en appliquant dix fois le procédé expérimental. La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la méthode. Elle peut aussi être définie comme étant l'habileté à obtenir un résultat le plus près possible de la valeur réelle.

**Limite de détection de la méthode<sup>(2)</sup>** : La limite de détection d'une méthode est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions.

**Limite de linéarité<sup>(2)</sup>** : La limite de linéarité est le plus haut niveau fiable de mesure qu'on puisse utiliser en tenant compte de tous les facteurs à considérer dans une méthode.

**Limite de quantification d'une méthode<sup>(2)</sup>** : La limite de quantification d'une méthode est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

**Matériau de référence<sup>(3)</sup>** : Matériau de référence, accompagné d'un certificat, dont une (ou plusieurs) valeur de la propriété qui établit son raccordement à une

réalisation exacte de l'unité (la valeur certifiée est accompagnée d'une incertitude à un niveau de confiance indiqué).

**Mesurande** : la grandeur que l'on veut mesurer.

**Méthode interne ou maison** : Méthode d'analyse développée ou adaptée à l'interne.

Exemples :

- méthode d'analyse fondée sur une méthode normalisée qui a été modifiée (même légèrement) par son utilisateur pour répondre à ses besoins opérationnels;
- méthode normalisée employée en dehors de son domaine d'application prévu;
- méthode publiée dans des ouvrages scientifiques non accompagnée des données sur la performance;
- nécessaire d'essais commercial dont les données sur la performance sont non disponibles ou incomplètes.

**Méthode normalisée** : Méthode d'analyse nationale ou internationale, publiée et validée. Il peut s'agir aussi :

- d'une méthode publiée dans des ouvrages scientifiques accompagnée de données sur la performance;
- d'une méthode normalisée publiée et archivée;
- d'une méthode ayant déjà été validée et qui est remise en service;
- d'un nécessaire d'essais commercial testé ou évalué par un tiers ou dont les données sur la performance sont disponibles.

**Méthode qualitative**<sup>(4)</sup> : Méthode qui fournit une information de type présence/absence, ou éventuellement sur une présence supérieure à un témoin. Il existe parfois une part de subjectivité dans la comparaison au témoin positif ou négatif. Elle peut aussi être une **méthode descriptive** : Méthode qui fournit une information sur les caractéristiques intrinsèques d'un analyte. L'information obtenue suite à l'application de la méthode permet de faire des comparaisons à des fins d'identification ou de caractérisation épidémiologique.

**Méthode quantitative**<sup>(4)</sup> : Méthode qui fournit un résultat chiffré sur une échelle continue, dont les limites sont connues, en relation directe avec la quantité (ou l'activité) de l'analyte recherché.

**Méthode semi-quantitative**<sup>(4)</sup> : Méthode qui fournit un résultat qualitatif extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (par ex. : techniques immuno-enzymatiques avec lecture d'une densité optique [D.O.]).

**Récupération**<sup>(2)</sup> : Le pourcentage de récupération permet d'identifier, 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.

**Répétabilité**<sup>(2)</sup> (ou **reproductibilité interne**) : La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le

même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des paramètres suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.

**Répliquabilité<sup>(2)</sup>** : La répliquabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour.

**Réplicas** : Aliquotes d'un même échantillon.

**Reproductibilité<sup>(2)</sup> (ou reproductibilité externe)** : La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour.

**Sensibilité<sup>(2)</sup>** : Pour une méthode quantitative ou semi-quantitative, la sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser. Elle peut aussi être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à détecter l'analyte marqueur de la maladie quand elle existe réellement.

**Seuil de détection<sup>(1)</sup>** : Pour une méthode qualitative, il s'agit du seuil au-dessus duquel le résultat est rapporté comme positif et sous lequel le résultat est rapporté négatif ou équivoque.

**Spécificité<sup>(5)</sup>** : La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc. Elle peut aussi être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à éliminer la maladie ou à ne pas détecter l'analyte marqueur de la maladie quand elle n'existe effectivement pas.

**Validation<sup>(6)</sup>** : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites.

Note : La validation permet de déterminer les caractéristiques propres à la méthode.

**Vérification<sup>(6)</sup>** : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites.

Note : La vérification permet de déterminer si les caractéristiques de la méthode normalisée sont satisfaites lorsque cette méthode est utilisée dans le contexte du LSPQ.

## VI. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

Note : Les données de vérification, de validation ou d'actualisation sont inscrites au registre adapté RE-GQ-026 ou au cahier de laboratoire électronique.

## A. Nouvelle méthode d'analyse

1. Toute nouvelle méthode d'analyse doit faire l'objet d'une demande de changement selon la directive DI-GQ-009.
2. Toute nouvelle méthode d'analyse doit faire l'objet d'une vérification ou d'une validation et d'une approbation par le cadre responsable avant sa mise en application (se référer à l'annexe 1).

Note : L'étape de validation d'une méthode interne suit l'étape de développement. Il est important de ne pas confondre ces étapes car la validation est effectuée sur une méthode développée et rédigée. Certaines données obtenues lors du développement peuvent cependant servir à la validation.

## B. Méthode d'analyse déjà en application

1. Les méthodes déjà en application sont vérifiées ou validées *a posteriori* selon le processus décrit à l'annexe 1.
2. Le cadre responsable approuve la vérification ou la validation.

## C. Actualisation

Les données liées à la performance des méthodes doivent être examinées afin de prouver à la clientèle l'aptitude permanente à l'emploi.

De plus, lorsque des modifications sont apportées à une procédure analytique, l'influence de ces modifications doit être documentée et, le cas échéant, une nouvelle validation doit être réalisée.

## VII. RÉFÉRENCES

1. CLSI, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline – second edition, EP12-A2, Vol. 28 No.3, January 2008.
2. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, DR-12-VMC, 2007-10-17.
3. [http://www.mesures.com/archives/778\\_comar\\_materiau\\_reference.pdf](http://www.mesures.com/archives/778_comar_materiau_reference.pdf)
4. <http://pagespro-orange.fr/hubert.bazin/valid.html>
5. Santé Canada, Programme des produits thérapeutiques, Texte concernant la validation des méthodes d'analyse, 1998.
6. Norme nationale du Canada, Systèmes de management de la qualité-Principes essentiels et vocabulaire, CAN/CSA-ISO 9000-00, DÉCEMBRE 2000.
7. INSPQ/CTQ, Procédure de validation des méthodes d'analyse, PL-010, révision #6, 2007/12/28



8. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Guide d'estimation de l'incertitude des mesures pour les analyses chimiques, DR-12-INC, 2008-09-16.
9. INSPQ/LSPQ, Analyse des échantillons, PR-PC-006, version 02.
10. CCN, Interprétation PALCAN des exigences relatives à l'évaluation des laboratoires d'essais et d'étalonnages, CAN-p-1630, janvier 2008.
11. CCN, Lignes directrices du PALCAN concernant la validation des méthodes d'essais, CAN-P-1629, novembre 2006.
12. <http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>
13. Laurel Elder, B. Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Clin. Microbiol. Newsl., Vol. 19, No. 20, October 15, 1997.
14. Laurel Elder, B. *et al.* Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory, Cumitech, no 31, ASM Press, February 1997.
15. Office luxembourgeois d'accréditation et de surveillance, A011 – Guide sur la vérification et la validation des méthodes d'essais et d'étalonnage selon l'ISO/CEI 17025, 2008.
16. Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie (VIM), 2e édition, 1993, ISO/BIPM/CEI/IFCC/IUPAC/IUPAP/IOML, publié par l'ISO.
17. ILAC G17: 2002: Introducing the Concept of Uncertainty of Measurement in Testing in Association with the Application of the Standard ISO/IEC 17025; International Laboratory Accreditation Cooperation.
18. EA 4/16: 2003: *EA Guidelines on the Expression of Uncertainty in Quantitative Testing; European Cooperation of Accreditation.* (version française téléchargeable sur le site du Cofrac : [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)).
19. ISO 5725:1994: Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Parties 1 à 6.
20. Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure, 1re édition, 1995, ISO/BIPM/IEC/IFCC/IUPAC/IUPAP/IOML. (Publié par l'ISO).
21. ISO 19036 : 2006 « Microbiologie des aliments – Lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives ».

## VIII. DOCUMENTS ASSOCIÉS

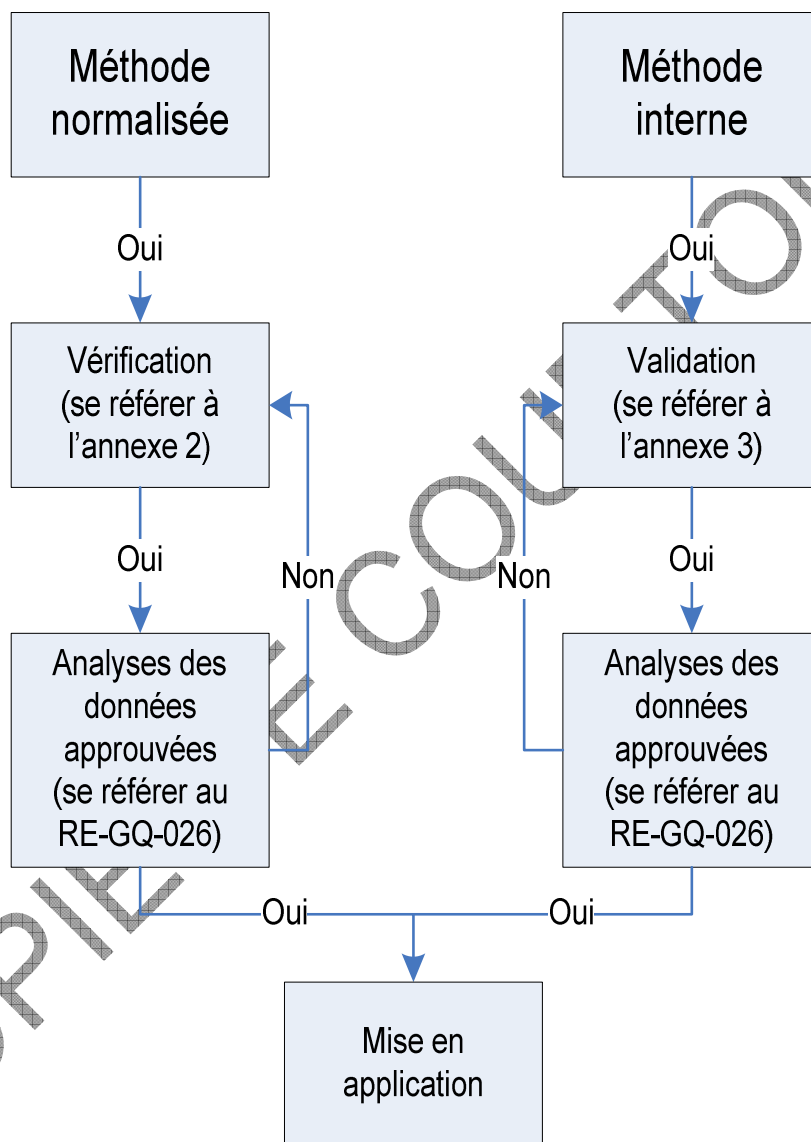
La version courante des documents suivants est associée au présent document.

RE-GQ-026 : Validation d'une méthode d'analyse



## ANNEXE 1

## Processus pour le choix d'une vérification ou d'une validation de méthode



## ANNEXE 2

## Vérification d'une méthode d'analyse

Par cette étape, le secteur doit pouvoir prouver qu'il est en mesure d'appliquer la méthode normalisée et de produire des résultats fiables. Pour ce faire, les données obtenues selon les descriptions ci-dessous peuvent être utilisées. Le choix de la méthode de vérification et le nombre d'essais sont la responsabilité du responsable d'activités.

Note : Les essais pour la vérification d'une méthode doivent être réalisés, lorsque possible, sur des échantillons à matrice réelle et les échantillons doivent subir l'ensemble des manipulations.

Exemples de méthodes de vérification :

- utilisation d'une méthode alternative pour l'analyse du paramètre;
- analyse de matériau de référence à valeur connue et identique (ou presque) aux échantillons d'essais;
- analyse de souches de référence ou panel de souches, spécimens de collection;
- analyse d'échantillons dans le cadre des contrôles externes ou internes de la compétence;
- analyse d'un échantillon auquel une concentration connue de l'analyte a été ajoutée à un échantillon réel;
- autres suggestions dans le tableau ci-dessous :

Test Type	Verification Protocol	Criteria for Acceptance of Method
Antimicrobial Susceptibility Testing	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test <math>\geq 35</math> known resistant isolates for each antibiotic <i>and</i></li> <li>• Test <math>\geq 100</math> isolates (either known to be susceptible or an unselected sample of clinical isolates)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\leq 3\%</math> very major errors <i>and</i></li> <li>• <math>\leq 7\%</math> major and minor errors (combined) <i>and</i></li> <li>• <math>&gt; 90\%</math> agreement within one dilution (for antibiotics without an intermediate category) <i>and</i></li> <li>• <math>\leq 10\%</math> growth failures</li> </ul>
Diagnostic Microbiology Tests	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test 20 specimens with analyte <i>and</i></li> <li>• Test 50 specimens without analyte</li> </ul>	Results meet pre-established criteria of lab <i>and</i> are no lower than 5% below reference method
Microbial Identification Tests	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perform at least 1 week of consecutive parallel testing (minimum of 50 strains) with the existing method <i>or</i></li> <li>• Test known representative strains (stock cultures) of a minimum of 12 to 15 commonly isolated species of organisms for a total of 50 or more tests <i>or</i></li> <li>• Confirm that 20 to 50 organism identifications (12 to 15 different species) agree in concurrent testing with the reference method</li> </ul>	A minimum of 90% agreement with reference method
Blood Culture Systems	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parallel testing until at least 20 different species of clinically significant isolates have been recovered <i>or</i></li> <li>• Seeded blood cultures using at least 20 different species of organisms</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 95\%</math> agreement with the reference method</li> <li>• All isolates are recovered</li> </ul>

Clinical Microbiology Newsletter, Vol. 19, No. 20, October 15, 1997.

**ANNEXE 3****Validation d'une méthode d'analyse**

Notes :

- Les essais pour la validation d'une méthode doivent être réalisés sur des échantillons à matrice réelle et les échantillons doivent subir l'ensemble des manipulations.
- Des méthodes de validation autres que celles décrites ci-dessous peuvent aussi être utilisées cependant elles doivent faire l'objet d'une approbation par le directeur scientifique.
- Il est recommandé de faire l'étude des valeurs aberrantes pour toutes les séries d'analyses utilisées pour la validation (se référer à l'annexe 4).
- Les données utilisées pour la validation d'une méthode doivent provenir de séries pour lesquelles les critères établis pour les différents éléments du contrôle de la qualité sont conformes.

**I. MÉTHODE QUALITATIVE DITE DESCRIPTIVE**

Procéder tel que décrit à l'annexe 2.

**II. MÉTHODE QUALITATIVE**

Note : La description ci-dessous fait référence à une méthode qualitative donnant des résultats négatifs/positifs. Elle s'applique tout aussi bien à une méthode présence/absence, etc.

Le dossier de validation d'une méthode qualitative devrait permettre de statuer sur la spécificité, la sensibilité, la justesse, etc.

Ci-dessous, quelques exemples :

**A. Sensibilité et spécificité**

1. L'utilisation d'un tableau de contingence permet l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité.

		Résultats attendus		Total
		Positif	Négatif	
Résultats obtenus	Positif	VP = nombre de vrais positifs	FP = nombre de faux positifs	VP + FP
	Négatif	FN = nombre de faux négatifs	VN = nombre de vrais négatifs	FN + VN
	Total	VP+ FN	FP + VN	

$$\text{Sensibilité (\%)} = 100 \times (VP / (VP + FN))$$

$$\text{Spécificité (\%)} = 100 \times (VN / (FP + VN))$$

$$\text{Valeur prédictive positive (\%)} = 100 \times (VP / (VP + FP))$$

$$\text{Valeur prédictive négative (\%)} = 100 \times (VN / (VN + FN))$$

Note : Il est aussi possible de calculer la concordance avec l'aide d'un tableau de contingence. Le calcul sera : VP+VN (méthode établie)/VP+VN (méthode de référence).

## B. Justesse

**Justesse = Nombre de résultats adéquats / Nombre total de résultats X 100**

## C. Seuil de détection

1. Évaluer la  $C_{50}$  selon l'un des exemples suivants:
  - valeur indiquée dans la littérature;
  - historique de la méthode.
2. Préparer un échantillon à la concentration  $C_{50}$ . L'échantillon doit être préparé en quantité suffisante pour pouvoir obtenir le nombre de répliques voulus (le CLSI recommande 40 répliques).
3. Analyser les répliques.
4. La valeur de  $C_{50}$  choisie est adéquate si 35 à 65 % des 40 répliques du  $C_{50}$  donnent des résultats positifs. Pour des séries de 20 répliques, la valeur de  $C_{50}$  choisie est adéquate si 30 à 70 % des répliques donnent des résultats positifs. Pour des séries de 100 répliques, la valeur de  $C_{50}$  choisie est adéquate si 40 à 60 % des répliques donnent des résultats positifs. Si la valeur de  $C_{50}$  choisie est inadéquate, reprendre à partir du point 1 ci-dessus.

## D. Incertitude

1. Préparer deux échantillons aux concentrations suivantes :  $C_{50-20\%}$  et  $C_{50+20\%}$ .

Notes :

- La valeur de  $\pm 20\%$  est donnée à titre d'exemple, elle dépend des critères de précision requis pour la méthode et est établie par le responsable d'activités.
  - Les échantillons doivent être préparés en quantité suffisante pour pouvoir obtenir le nombre de répliques voulus (le CLSI recommande 40 répliques).
2. Analyser le nombre requis de répliques pour les deux échantillons en incluant les variabilités de la méthode : jour, analyste, instrument, etc.
  3. Par la suite, il faut déterminer si les résultats pour les répliques  $C_{50-20\%}$  et  $C_{50+20\%}$  sont bien à l'extérieur de l'intervalle  $C_5-C_{95}$ . Voici les différentes possibilités :

- Si  $\geq 95\%$  des résultats pour  $C_{50+20\%}$  sont positifs et  $\geq 95\%$  des résultats pour  $C_{50-20\%}$  sont négatifs, alors on peut conclure que l'incertitude est inférieure à 20 %.
- Si  $< 95\%$  des résultats pour  $C_{50+20\%}$  sont positifs et  $< 95\%$  des résultats pour  $C_{50-20\%}$  sont négatifs, alors on peut conclure que l'incertitude est supérieure à 20 %. Il serait

pertinent de reprendre la mesure de l'incertitude avec un critère de précision plus élevé (ex. : 30 %).

- Si  $\geq 95$  % des résultats pour  $C_{50+20}$  % sont positifs et  $< 95$  % des résultats pour  $C_{50-20}$  % sont négatifs, alors on peut conclure que l'incertitude est inférieure à 20 % pour  $C_{50+20}$  % et supérieure à 20 % pour  $C_{50-20}$  %. Il serait pertinent de reprendre la mesure de l'incertitude avec un critère de précision plus élevé pour  $C_{50-20}$  % (ex :  $C_{50-30}$  %).
- Si  $< 95$  % des résultats pour  $C_{50+20}$  % sont positifs et  $\geq 95$  % des résultats pour  $C_{50-20}$  % sont négatifs, alors on peut conclure que l'incertitude est supérieure à 20 % pour  $C_{50+20}$  % et inférieure à 20 % pour  $C_{50-20}$  %. Il serait pertinent de reprendre la mesure de l'incertitude avec un critère de précision plus élevé pour  $C_{50+20}$  % (ex :  $C_{50+30}$  %).

### III. MÉTHODE QUANTITATIVE OU SEMI-QUANTITATIVE

La validation d'une méthode d'analyse quantitative ou semi-quantitative demande généralement la détermination des paramètres suivants :

#### A. Limite de détection de la méthode (LDM)

1. Évaluer la limite de détection estimée ( $LDM_e$ ) selon l'un des exemples suivants:
  - valeur indiquée dans la littérature;
  - valeur correspondante à un rapport signal/bruit de 3 :1;
  - valeur équivalente à 3 fois l'écart type d'un étalon de faible concentration.
2. Préparer une solution dans la matrice voulue, à une concentration de 5 à 7 fois plus élevée que la  $LDM_e$ .
3. À partir de cette solution, préparer dix aliquotes et les soumettre au processus analytique complet.
4. À partir des résultats obtenus, calculer la LDM de la façon suivante :

$$LDM = 3 X s$$

où :

s = Écart type des résultats pour les dix aliquotes

5. Calculer le ratio de conformité (R) de la façon suivante :

$$R = x / LDM$$

où :

x = Moyenne arithmétique des résultats pour les dix aliquotes

## 6. Interpréter la valeur du ratio de conformité de la façon suivante :

- Si  $4 < R < 10$ , la concentration de la solution utilisée est adéquate.
- Si  $R < 4$ , reprendre les essais en révisant la limite de détection estimée et la concentration de la solution utilisée. Un ratio inférieur à 4 indique que la limite de détection réelle de la méthode est plus élevée que la limite de détection estimée.
- Si  $R > 10$ , reprendre les essais en révisant la limite de détection estimée et la concentration de la solution utilisée. Un ratio supérieur à 10 indique que la limite de détection réelle de la méthode est plus basse que la limite de détection estimée.

## 7. Lorsque le ratio de conformité est acceptable, la limite de détection ainsi établie est acceptée.

### B. Limite de quantification de la méthode (LQM)

1. Calculer la LQM à partir de la valeur de l'écart type obtenue lors de l'établissement de la LDM :

$$\text{LQM} = 10 \times s$$

où :

s = Écart type des résultats pour les dix aliquotes

### C. Limite de linéarité

1. Analyser différentes concentrations d'étalons (généralement trois réplicas par concentration) afin de démontrer l'existence d'une relation (ex : linéaire ou quadratique) sur la totalité de l'écart d'utilisation de la méthode. La limite de linéarité correspond généralement au dernier point de la courbe de calibration.
2. Établir le domaine de linéarité de la méthode correspondant à l'étendue de la concentration des étalons qui se situe entre la valeur de la LQM et le plus haut niveau fiable. Par exemple pour une courbe linéaire, le coefficient de corrélation (r) devrait être supérieur à 0,995.

## D. Justesse

1. Dans la zone quantifiable de la méthode, soumettre dix aliquotes d'un matériau de référence au processus analytique complet.
2. Calculer l'erreur relative et la justesse selon :

$$\text{Erreur relative (\%)} = ((x_1 - Va) / Va) \times 100$$

où :

$x_1$  = Moyenne arithmétique des résultats pour le matériau de référence

$Va$  = Valeur attendue (valeur considérée comme véritable par convention)

$$\text{Justesse (\%)} = 100 - |\text{erreur relative (\%)}|$$

## E. Réplicabilité

1. Dans la zone quantifiable de la méthode, soumettre dix aliquotes d'un même échantillon ou d'un même étalon au processus analytique dans les conditions suivantes : même laboratoire, même analyste, même appareil, même jour.
2. Calculer la réplicabilité, à une concentration donnée, de la façon suivante :

$$\text{Réplicabilité} = x_2 \pm (t \times s_2) / \sqrt{n}$$

où :

$x_2$  = Moyenne arithmétique de la série de mesures pour l'évaluation de la réplicabilité

$t$  = valeur de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 % (annexe 5)

$s_2$  = Écart type obtenu à partir des essais de réplicabilité

$n$  = Nombre de degrés de liberté

## F. Répétabilité

1. Dans la zone quantifiable de la méthode, soumettre dix aliquotes d'un même échantillon ou d'un même étalon au processus analytique complet dans un même laboratoire et dont au moins un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.
2. Calculer la répétabilité, à une concentration donnée, de la façon suivante :

$$\text{Répétabilité} = x_3 \pm (t \times s_3) / \sqrt{n}$$

où :

$x_3$  = Moyenne arithmétique de la série de mesures pour l'évaluation de la répétabilité

$t$  = valeur de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 % (annexe 5)

$s_3$  = Écart type obtenu à partir des essais de répétabilité

$n$  = Nombre de degrés de liberté



## G. Reproductibilité

La valeur de la reproductibilité sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\text{Reproductibilité} = x_4 \pm (t \times s_4) / \sqrt{n}$$

où :

$x_4$  = Moyenne arithmétique de la série de mesures pour l'évaluation de la reproductibilité

$t$  = valeur de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 % (annexe 5)

$s_4$  = Écart type obtenu à partir des essais de reproductibilité

$n$  = Nombre de degrés de liberté

## H. Sensibilité

1. Lorsque la méthode utilise une courbe d'étalonnage, la sensibilité est exprimée comme étant la pente moyenne d'un minimum de trois courbes.

$$\text{Sensibilité} = P$$

où :

$P$  = Moyenne arithmétique des pentes

2. Pour les méthodes n'utilisant pas de courbe d'étalonnage, la sensibilité s'exprime par le rapport entre le signal obtenu et la concentration d'un étalon analysé dans le domaine de linéarité.

$$\text{Sensibilité} = y / [ ]$$

où:

$y$  = signal obtenu pour la concentration analysée

$[ ]$  = concentration analysée

## I. Récupération

1. Choisir cinq échantillons réels de concentrations connues, se situant dans le domaine de linéarité de la méthode (si possible).
2. Ajouter une concentration connue de la substance d'intérêt. La quantité ajoutée doit préférablement se situer entre 50 et 100 % de la concentration initiale de l'échantillon. Dans les cas où la concentration initiale est inférieure à la LDM, la quantité ajoutée devient 3 à 10 fois la LDM.
3. Soumettre les ajouts dosés au processus analytique.
4. Calculer les pourcentages de récupération :

$$\text{Récupération} = ((C_f - C) / A) \times 100$$

où :

$C_f$  = Concentration mesurée dans l'ajout dosé

$C$  = Concentration initiale de l'échantillon

$A$  = Concentration de la substance ajoutée

## J. Incertitude

1. L'incertitude est calculée en utilisant les données disponibles pour les différents éléments du contrôle de la qualité de la méthode. Un minimum de cinq résultats par contrôle est requis. Il peut s'agir d'un échantillon à valeur unique ou d'un échantillon à valeur multiple.

2. Pour l'échantillon à valeur unique les calculs sont les suivants :

$$CV_1 = s_5 / x_5$$

où :

CV<sub>1</sub> = Coefficient de variation pour l'échantillon à valeur unique

S<sub>5</sub> = Écart type obtenu pour les données de l'échantillon à valeur unique

X<sub>5</sub> = Moyenne arithmétique obtenue pour les données de l'échantillon à valeur unique

$$\text{Incertitude (\%)} = \pm (t \times CV_1) \times 100$$

où :

CV<sub>1</sub> = Coefficient de variation pour l'échantillon à valeur unique

t = valeur de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 % (annexe 5)

3. Pour l'échantillon à valeur multiple les calculs sont les suivants :

- Pour chacun des résultats, calculer le recouvrement

$$\text{Recouvrement (\%)} = (V_o / V_a) \times 100$$

où :

V<sub>o</sub> = Valeur obtenue

V<sub>a</sub> = Valeur attendue

- Calculer la moyenne des recouvrements obtenus (x<sub>6</sub>)
- Calculer l'écart type des recouvrements obtenus (s<sub>6</sub>)
- Calculer le coefficient de variation et l'incertitude :

$$CV_2 (\%) = s_6 / x_6 \times 100$$

où :

CV<sub>2</sub> = Coefficient de variation pour l'échantillon à valeur multiple

S<sub>6</sub> = Écart type obtenu pour les données de l'échantillon à valeur unique

X<sub>6</sub> = Moyenne arithmétique obtenue pour les données de l'échantillon à valeur unique

$$\text{Incertitude (\%)} = \pm t \times CV_2$$

où :

CV<sub>2</sub> = Coefficient de variation pour l'échantillon à valeur multiple

t = valeur de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 % (annexe 5)

#### 4. Pour les analyses microbiologiques:

Les principales sources d'incertitudes de mesure liées aux résultats des analyses en microbiologie sont : l'échantillon de laboratoire, la matrice, les équipements, les milieux de culture, les réactifs, le sous-échantillonnage, les erreurs aléatoires, l'opérateur et le temps.

L'écart-type de reproductibilité est estimé au moyen de l'écart-type de reproductibilité à l'intérieur d'un même laboratoire, pour chaque groupe similaire de microorganismes ainsi que pour chaque matrice pour une procédure donnée.

Pour chaque groupe similaire de microorganismes ainsi que pour chaque matrice, deux opérateurs distincts doivent analyser au moins 10 échantillons, selon des jours différents pour obtenir des résultats échelonnés dans le temps.

Les résultats obtenus (ex.: UFC/ml) doivent être convertis en  $\log(\text{UFC/ml})$ . Ceci permet de stabiliser la variance et d'éliminer les faibles niveaux de variance.

On calcule alors l'écart-type de reproductibilité  $S_R$  pour les échantillons au nombre de  $n$  comme suit :

$$S_R = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}{n}} = u(y)$$

où :

$S_R$  est l'écart-type de reproductibilité

$n$  est le nombre d'échantillons

$y_{iA}$  et  $y_{iB}$  sont les données transformées en  $\log_{10}$

$i$  est l'indice de l'échantillon,  $i = 1$  à  $n$  (où  $n \geq 10$ )

$j$  est l'indice de la condition de reproductibilité ;  $j = A$  ou  $B$

En notant le résultat d'essai  $y = \log x$  ainsi que l'écart-type de reproductibilité  $S_R$ , l'incertitude élargie  $U$  est donnée par  $2S_R$

Le résultat d'essai peut être exprimé de différentes manières:

- $y = \log_{10}x$
- $y \pm U$  (log)
- $x$  UFC/ml ( $10^{y-U}$  ;  $10^{y+U}$ )

Où  $U = 2u_c = 2S_R$

Par exemple :

- si un résultat d'essai de  $5,0 \log_{10}$  (soit  $10^5$ ) a été obtenu, et
- si un écart-type de reproductibilité  $S_R$  de  $0,15 \log_{10}$  a été trouvé; donc l'incertitude élargie  $U$ , avec un facteur d'élargissement de 2 (lequel correspond à un niveau de confiance de 95%) sera de  $0,15 \log_{10} \times 2 = 0,3 \log_{10}$

Alors, le résultat d'essai pourra être exprimé selon l'une ou l'autre des possibilités suivantes :

- $5,0 \log \pm 0,3 \log$
- $10^5$  UFC/ml ( $5 \times 10^4$  ;  $2 \times 10^5$ )
- 100 000 UFC/ml (50 000 ; 200 000)

Pour les méthodes microbiologiques sans résultat quantitatif (ex.: méthode avec résultat positif ou négatif), l'incertitude peut être exprimée en pourcentage de faux négatif.

COPIE DE COURTOISIE

**ANNEXE 4****Test de Grubbs**

Le test de Grubbs (G) permet d'éliminer les valeurs aberrantes d'une série de résultats, en assumant une courbe de distribution normale.

- 1- Mettre en ordre numérique les résultats obtenus (on détermine ainsi facilement la valeur maximale ( $v_{\max}$ ) et la valeur minimale ( $v_{\min}$ ));
- 2- Effectuer la moyenne arithmétique ( $x_7$ ) et l'écart type ( $s_7$ ) des résultats;
- 3- Calculer  $G_{\max}$  et  $G_{\min}$  :

$$G_{\max} = (v_{\max} - x_7) / s_7$$

$$G_{\min} = (v_{\min} - x_7) / s_7$$

- 4- Comparer les valeurs de G aux valeurs critiques du tableau ci-dessous.

Si  $G_{\max}$  est supérieur à la valeur G du tableau ci-dessous, alors  $v_{\max}$  est aberrante.

Si  $G_{\min}$  est supérieur à la valeur G du tableau ci-dessous, alors  $v_{\min}$  est aberrante.

**TABLEAU DES VALEURS CRITIQUES DE G**

<i>n</i>	G	<i>n</i>	G	<i>n</i>	G	<i>n</i>	G
3	1.15	15	2.55	27	2.86	39	3.03
4	1.48	16	2.59	28	2.88	40	3.04
5	1.71	17	2.62	29	2.89	50	3.13
6	1.89	18	2.65	30	2.91	60	3.20
7	2.02	19	2.68	31	2.92	70	3.26
8	2.13	20	2.71	32	2.94	80	3.31
9	2.21	21	2.73	33	2.95	90	3.35
10	2.29	22	2.76	34	2.97	100	3.38
11	2.34	23	2.78	35	2.98	110	3.42
12	2.41	24	2.80	36	2.99	120	3.44
13	2.46	25	2.82	37	3.00	130	3.47
14	2.51	26	2.84	38	3.01	140	3.49

Calcul automatisé disponible à l'adresse suivante :

<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>

**ANNEXE 5****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 *Quality Assurance of Chemical Measurements*, Taylor, J., 1987, page 267