



## **MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE DE TYPE PIPELINE** POUR VALIDER LES NOUVELLES TECHNOLOGIES D'ANALYSE DE L'EAU

---

JUDITH ISAAC-RENTON ET NATALIE PRYSTAJECKY, UNIVERSITÉ DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE; LABORATOIRE DE SANTÉ PUBLIQUE ET DE RÉFÉRENCE EN MICROBIOLOGIE DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE

*Recherche effectuée de 2011 à 2014, Rapport publié en avril 2016*



Réseau  
canadien  
de l'eau

# MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE DE TYPE PIPELINE POUR VALIDER LES NOUVELLES TECHNOLOGIES D'ANALYSE DE L'EAU

JUDITH ISAAC-RENTON ET NATALIE PRYSTAJECKY, UNIVERSITÉ DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE; LABORATOIRE DE SANTÉ PUBLIQUE ET DE RÉFÉRENCE EN MICROBIOLOGIE DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE

Recherche effectuée de 2011 à 2014

## POURQUOI AVONS-NOUS RÉALISÉ CETTE RECHERCHE?



Les pathogènes d'origine hydrique peuvent être dangereux pour la santé de l'environnement, des milieux aquatiques et de l'homme. Actuellement, pour surveiller la qualité de l'eau, on évalue la contamination fécale en se basant sur la présence de bactéries indicatrices, comme *Escherichia coli* (*E. coli*). Pour des raisons de simplicité, étant donné le grand nombre possible de pathogènes d'origine hydrique, on préfère détecter des organismes indicateurs plutôt que détecter directement les agents pathogènes. Cependant, la présence d'*E. coli* indique une contamination récente, mais n'indique pas nécessairement la présence de virus, de bactéries ou de protozoaires pathogènes et elle ne donne pas d'autre indice concernant la source de la contamination. En outre, il importe de souligner que l'eau exempte de ces marqueurs substitués peut encore contenir des pathogènes, comme ça a été le cas au Nevada en 1994 lors de la flambée de *Cryptosporidium parvum*. De plus, le temps de traitement des méthodes d'analyse par culture est assez lent et ces méthodes peuvent donner des résultats faux positifs et faux négatifs.

En comparaison, les tests moléculaires sont des méthodes rapides et sensibles permettant de détecter directement les agents pathogènes. Dans le domaine des tests diagnostiques cliniques, la détection des acides nucléiques (c.-à-d. l'ADN ou l'ARN) a donné des résultats forts prometteurs, car ces

méthodes sont un moyen rapide et sensible de détecter le pathogène auquel on s'intéresse. Alors que l'obtention de résultat à l'aide des méthodes d'analyse par culture peut prendre jusqu'à quelques jours, ces tests moléculaires rapides peuvent donner des résultats en quelques heures. Les tests moléculaires (essais) ont en plus l'avantage de cibler de nombreux pathogènes en même temps, avec une plus grande précision.

Ces mêmes aspects qui améliorent rapidement le diagnostic des maladies infectieuses pourraient aussi être appliqués à l'analyse de l'eau. Il existe une abondante documentation concernant des tests moléculaires novateurs qui permettent de détecter des organismes indicateurs ou des agents pathogènes et qui peuvent aussi déterminer la source de contamination avec une grande précision. Ces tests moléculaires ont le potentiel de révolutionner le secteur de la qualité de l'eau, pourtant leur adoption pour l'évaluation de la qualité de l'eau demeure limitée.

Pour qu'un laboratoire adopte un nouveau test, ce test doit donner des résultats équivalents si non supérieurs à ceux de la méthodologie courante. Le laboratoire doit être convaincu que le nouveau test va améliorer le déroulement général du travail, tout en fournissant la meilleure qualité et les plus hautes normes de rendement. L'analyse de l'eau exige une validation précise et rigoureuse dans un cadre réglementaire intensif.

L'adoption limitée des tests moléculaires par les laboratoires d'analyse est en partie due à l'absence de directives pour évaluer le rendement de ces essais dans des situations réelles. Ces renseignements sont essentiels pour que les laboratoires aient suffisamment de preuves pour utiliser avec confiance la nouvelle méthode. Il n'existe toutefois pas de directives claires dans la littérature scientifique publiée sur la façon de valider des tests moléculaires pour l'analyse de la qualité de l'eau. Ce projet avait donc pour but de rapprocher les concepteurs de tests des utilisateurs finaux, en mettant en place une approche de type pipeline pour l'interprétation des tests microbiens.

## COMMENT AVONS-NOUS EFFECTUÉ LA RECHERCHE?

Le projet portait sur l'évaluation de l'applicabilité des nouveaux tests prometteurs. Ces tests ont été examinés en laboratoire selon des critères de validation normalisés, et les rendements des tests ont été résumés dans le cadre d'un rapport afin de faciliter la communication entre les concepteurs de ces tests et les utilisateurs des connaissances qu'ils génèrent.

Ce sont les données de validation qui constituent l'élément clé de l'approche de type pipeline pour l'interprétation des tests microbiens. Elles permettent aux concepteurs de s'assurer qu'ils ont rigoureusement vérifié le rendement de leur essai, et de démontrer que le test est équivalent ou supérieur aux méthodes d'essai courantes.

L'Environmental Protection Agency des États-Unis a publié des directives à suivre pour des tests de remplacement (*Alternative Test Procedure - ATP*), mais celles-ci ne concernent que l'évaluation de méthodes d'analyse par culture par rapport à une méthode de référence d'analyse par culture. Il n'existe pas de directives pour la validation d'un test moléculaire diagnostique pour des échantillons d'eau. Nous avons donc adapté les renseignements publiés sur la validation clinique à l'analyse de l'eau et nous avons ainsi déterminé sept paramètres qui sont essentiels pour valider un test :

Tableau 1 : Critères de validation d'un test moléculaire

CRITÈRES	DÉFINITION
Plage communicable	La plage des valeurs que la méthode permet de communiquer
Limite de détection	La plus faible quantité de l'organisme ciblé détectée par la méthode
Précision	La concordance des mesures répétées
Spécificité	L'efficacité avec laquelle la méthode mesure uniquement l'organisme ciblé
Exactitude	La proximité de la valeur mesurée et de la valeur connue
Intervalle de référence	La plage des quantités normales d'organisme ciblé dans des échantillons d'eau jugés sécuritaires
Essai sur le terrain	Le rendement du test dans des conditions réelles, habituellement en parallèle avec une méthode de référence



Nous avons fourni l'ébauche des directives de validation à quatre laboratoires partenaires (universitaires et gouvernementaux) au pays et nous leur avons demandé de mettre ces instructions à l'épreuve en les appliquant au test moléculaire de leur choix. Les laboratoires ont validé des essais semi-quantitatifs et quantitatifs de réactions en chaîne de la polymérase (qPCR) pour *E. coli*, *Enterococci* et *Bacteroides* qui ont été publiés dans la littérature scientifique, en utilisant de l'eau de surface comme matrice d'eau.

Les laboratoires ont fourni leurs rétroactions pendant tout le processus, en répondant aux questions suivantes :

- Le document d'orientation est-il clair et facile à lire ou à interpréter?
- Le plan d'expérience peut-il être suivi?
- Peut-on effectuer des tests statistiques?
- L'étude de validation génère-t-elle assez de preuves pour envisager l'adoption de la nouvelle méthode?

## QUELS ONT ÉTÉ LES RÉSULTATS?

Les laboratoires partenaires ont indiqué que si les directives de validation et les analyses statistiques étaient faciles à suivre, le plan d'expérience leur avait paru lourd pour certains des critères de validation. Les nombres requis d'échantillons de validation et de répétitions du test étaient trop élevés, étant donné les défis associés à la collecte et au traitement des échantillons d'eau.

Un des problèmes cernés dans le cadre de l'examen des publications sur les tests moléculaires de l'eau est le fait que ces tests ont été validés avec des matières inadéquates. Par exemple, la limite de détection était basée sur une culture pure d'un organisme plutôt que sur des échantillons d'eau. Le plan expérimental pour certains critères de validation est conçu pour résoudre ce problème (p. ex., ajout de quantités connues d'un organisme dans des échantillons d'eau de surface, plutôt que d'utiliser de l'eau de qualité « laboratoire »). Cependant, les laboratoires partenaires ont signalé que cela était particulièrement difficile à réaliser, car la quantité d'acide nucléique présente en arrière-plan dans les vrais échantillons d'eau complique l'interprétation des données.

D'après cette rétroaction, nous avons modifié les directives de validation pour qu'elles demeurent rigoureuses, mais qu'elles comportent une charge de travail plus raisonnable. Les directives révisées satisfont les concepteurs de tests, tout en permettant de produire assez de données pour fournir des preuves du rendement du test aux utilisateurs.

Il faut souligner que pour tous les tests évalués, les résultats obtenus par les laboratoires partenaires ont été inférieurs à ceux documentés dans les articles scientifiques évalués par des pairs, ce qui met en évidence la difficulté inhérente à l'application des méthodes publiées dans des conditions réelles.

### DIFFICULTÉS TECHNIQUES

Bien que cette recherche ait été axée sur le développement de directives de validation des méthodes moléculaires d'analyse de l'eau, nous avons pu cerner dans le processus certaines difficultés techniques importantes :

1. Alors que l'on décrit souvent les tests moléculaires comme étant simples ou faciles, le travail préparatoire pour traiter les échantillons d'eau afin d'obtenir l'acide nucléique (ADN/ARN) requis pour le test est beaucoup plus lourd que dans le cadre des méthodes traditionnelles d'analyse par culture. Tout comme le fait que de grandes quantités de microorganismes en arrière-plan puissent avoir une incidence sur les analyses par culture, de grandes quantités de certains éléments chimiques, comme les acides humiques présents dans la matière végétale en décomposition, peuvent avoir des incidences sur les tests moléculaires. Les méthodes pour réduire la présence de ces éléments chimiques peuvent être coûteuses en temps, rendant l'exécution des tests moléculaires plus difficile que la méthode comparable à l'aide de culture.  
L'extraction de l'acide nucléique est un aspect des tests moléculaires pour l'analyse de l'eau que les concepteurs doivent encore améliorer.
2. Contrairement aux échantillons cliniques, les échantillons environnementaux sont extrêmement complexes et dynamiques. Cela peut compliquer le processus de validation, puisque les matériaux de validation eux-mêmes sont dynamiques, avec des quantités différentes de matière ciblée ou même de matière organique qui peut empêcher le bon fonctionnement des tests moléculaires.  
La nature dynamique de l'eau peut rendre difficile l'adoption des tests moléculaires comme méthode courante et les concepteurs de tests tout comme les utilisateurs finaux doivent être au courant de ces défis lors de l'interprétation des résultats.
3. Dans une épreuve de validation, il faut toujours comparer la nouvelle méthode à un test de référence, ce qui soulève deux problèmes :  
Pour une méthode visant la détection d'*E. coli* par exemple, on compare normalement la méthode moléculaire au résultat de la culture; cela revient à dire que l'on compare des pommes et des oranges. Cela a d'ailleurs causé des difficultés pendant le projet de recherche, car les quantités d'*E. coli* détectées par la méthode qPCR étaient assez différentes de celles déterminées dans la culture. Il faudra peut-être mettre au point un calcul d'étalonnage, mais cela n'est pas encore disponible pour tous les microorganismes ciblés ou tous les tests moléculaires.  
Certaines méthodes, comme la surveillance de la source microbienne, n'ont pas de méthode de référence. Cette comparaison n'est donc pas possible et cela peut affecter l'étendue potentielle de validation du test.

# QUELLES SONT LES INCIDENCES POUR LES CONCEPTEURS DE TESTS ET LES LABORATOIRES?

Les applications potentielles des tests moléculaires pour l'analyse de la qualité de l'eau sont nombreuses, notamment pour la détection de pathogènes, d'organismes de remplacement ou pour des méthodes de surveillance de la source microbienne. Toutefois, l'utilisation de ces méthodes ne peut devenir courante sans preuves suffisantes du rendement du test.

Pour aller de l'avant, il faudra surmonter de nombreux obstacles et défis avant que les laboratoires d'analyse adoptent les tests moléculaires. Il faut de meilleures stratégies pour la filtration et l'extraction de l'acide nucléique, de sorte que l'on puisse obtenir un matériau cible de grande qualité pour un rendement robuste du test. L'intégration de pratiques exemplaires d'essais et d'une série rigoureuse de directives en matière de rendement aidera les concepteurs de tests et les utilisateurs à travailler ensemble pour concevoir un essai qui répond aux besoins des laboratoires. Bien qu'une formation élaborée et de l'équipement coûteux seront requis, l'usage des techniques moléculaires dans les laboratoires d'analyse donnera lieu à des tests plus rapides, une meilleure détection des pathogènes, l'attribution de la provenance de la contamination et une meilleure gestion des risques associés à nos sources d'approvisionnement en eau.

## CONSIDÉRATIONS POUR LES CONCEPTEURS DE TESTS ET LEURS UTILISATEURS

Les données de validation fournies dans les publications examinées par des pairs fournissent souvent des preuves insuffisantes à l'adoption d'un test, en partie parce qu'il n'y a pas de directives établies pour la validation.

La rigueur du processus d'examen par les pairs permet d'assurer la publication d'une recherche scientifiquement valable. Cependant, cela n'assure pas que les nouvelles méthodes d'essais moléculaires aient la rigueur nécessaire pour que l'on puisse les appliquer aux fins de l'analyse de l'eau. Il arrive souvent que les données présentées soient celles du meilleur scénario ou qu'elles soient spécifiques à une matrice d'eau précise.

Pour une évaluation robuste des nouvelles méthodes d'essai, il faut des directives de validation normalisées.

Étant donné la qualité variable des données de validation dans la littérature scientifique examinée par des pairs, il y a un besoin évident de normalisation non seulement en ce qui concerne les paramètres de validation qui seront évalués pour les nouveaux tests, mais aussi quant à la façon de recueillir et d'analyser les données. Les directives de validation développées dans le cadre de cette étude contribueront à cette validation normalisée.

Les utilisateurs ont besoin des preuves générées par les directives de validation pour être certains que le test donnera le rendement escompté.

La consultation d'intervenants dans le cadre d'un projet connexe, *Applied Metagenomics of the Watershed Microbiome* ([www.watersheddiscovery.ca](http://www.watersheddiscovery.ca)), a mis l'accent sur l'importance des preuves démontrant qu'un test donne des résultats équivalents ou supérieurs à la

méthode courante. Il faut également pouvoir communiquer de la bonne façon ce qu'un test peut et ne peut pas faire et comment en interpréter les résultats.

Les données de validation peuvent combler l'écart entre les concepteurs et les utilisateurs finaux en permettant aux concepteurs de tester de façon rigoureuse leur nouvelle méthode d'essai en fonction de critères stricts, et de démontrer aux utilisateurs finaux que le test répondra à leurs besoins.

Si les tests moléculaires pour l'analyse de la qualité de l'eau se sont grandement améliorés avec le temps, ils ne sont pas encore parfaits et d'autres recherches sont nécessaires pour en développer des meilleurs.

La plupart des épreuves ont donné de moins bons résultats que ceux décrits dans la littérature scientifique publiée. Cela illustre bien le caractère réellement dynamique et complexe des échantillons d'eau. Les techniques moléculaires ne fonctionnent souvent pas aussi bien lorsqu'il y a des éléments mélangés aux acides nucléiques, ce qui est courant dans le cas des échantillons environnementaux.

Les méthodes d'extraction de l'ADN couramment utilisées dans l'analyse de l'eau ne sont probablement pas assez efficaces pour récupérer les acides nucléiques de l'échantillon, ce qui affecte la limite de détection dans les échantillons réels comparativement aux échantillons de laboratoire.

D'autres études sont requises pour mieux comprendre la nature dynamique des matrices d'eau afin d'optimiser les protocoles d'échantillonnage. Il faudra aussi améliorer le traitement des échantillons pour accroître non seulement la limite de détection, mais aussi le déroulement du travail d'analyse.



**POUR JOINDRE L'ÉQUIPE DE RECHERCHE, VEUILLEZ ÉCRIRE À [RESEARCHSPOTLIGHT@CWN-RCE.CA](mailto:RESEARCHSPOTLIGHT@CWN-RCE.CA). VISITEZ LE RÉPERTOIRE DE NOS PROJETS AU [CWN-RCE.CA](http://CWN-RCE.CA).**

**RAPPORT RÉDIGÉ PAR MATTHEW CROXEN, NATALIE PRYSTAJECKY ET JUDITH ISAAC-RENTON**

**ÉQUIPE DE RECHERCHE – UNIVERSITÉ DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE; LABORATOIRE DE SANTÉ PUBLIQUE ET DE RÉFÉRENCE EN MICROBIOLOGIE DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE**

JUDITH ISAAC-RENTON

NATALIE PRYSTAJECKY

CHRISTINA COOK

MATTHEW CROXEN

BRIDGET LEE

JUSTIN DIRK

PATRICK TANG

**PARTENAIRES**

LABORATOIRE DE SANTÉ PUBLIQUE ET DE RÉFÉRENCE EN MICROBIOLOGIE DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE

ENVIRONNEMENT CANADA  
SANTÉ PUBLIQUE ONTARIO

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

**RÉFÉRENCES**

BUSTIN, S.A., V. BENES, J.A. GARSON, J. HELLEMANS, J. HUGGETT, M. KUBISTA, R. MUELLER, T. NOLAN, M.W. PFAFFL, G.L. SHIPLEY, ET COLL. (2009). « The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments », *Clin. Chem.*, vol. 55, p. 611–622.

DUNN, G., L. HARRIS, C. COOK ET N. PRYSTAJECKY (2014). « A comparative analysis of current microbial water quality risk assessment and management practices in British Columbia and Ontario », *Canada. Sci. Total Environ.*, 468-469, 544–552.

EREN, A.M., M.L. SOGIN, H.G. MORRISON, J.H. VINEIS, J.C. FISHER, R.J. NEWTON ET S.L. MCLELLAN (2014). « A single genus in the gut microbiome reflects host preference and specificity », *ISMEJ*.

GOLDSTEIN, S.T., D.D. JURANEK, O. RAVENHOLT, A.W. HIGHTOWER, D.G. MARTIN, J.L. MESNIK, S.D. GRIFFITHS, A.J. BRYANT, R.R. REICH ET B.L. HERWALDT (1996). « Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment », *Ann. Intern. Med.*, vol. 124, p. 459–468.