

PROGRAMME D'ACCRÉDITATION DES LABORATOIRES D'ANALYSE



LIGNES DIRECTRICES CONCERNANT LES TRAVAUX ANALYTIQUES EN MICROBIOLOGIE (DR-12-SCA-02)

Mise à jour 20 mars 2018

Coordination et rédaction

Cette publication a été réalisée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec du ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC).

Renseignements

Pour tout renseignement complémentaire :

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

Ministère du Développement durable, de l'Environnement
et de la Lutte contre les changements climatiques
Complexe scientifique
2700, rue Einstein, bureau E-2-220
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301

Télécopieur : 418 528-1091

Courriel : ceaeg@mddelcc.gouv.qc.ca

Pour vous procurer nos documents, veuillez consulter notre site Web au www.mddelcc.gouv.qc.ca, section « CEAEQ » ou au www.ceaeg.gouv.qc.ca.

Référence à citer

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2018, 38 p.

Dépôt légal – 2018

Bibliothèque et Archives nationales du Québec

ISBN 978-2-550-80745-2 (PDF)

ISBN-978-2-550-70239-9 (PDF), Édition précédente

Tous droits réservés pour tous les pays.

© Gouvernement du Québec - 2018

AVANT-PROPOS

Le présent document s'adresse à tous les laboratoires de microbiologie accrédités par le ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec. Il précise les lignes directrices auxquelles les laboratoires de microbiologie doivent se conformer. L'application de ces lignes directrices est revue lors de l'évaluation sur site des procédures d'assurance et de contrôle de la qualité effectuée dans le cadre du *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse (PALA)*¹.

Tous les éléments dont il est question dans ce document sont vérifiés au cours de l'évaluation sur site et font l'objet d'un rapport d'évaluation. Le laboratoire doit, par la suite, soumettre un rapport de correction des éléments non conformes établis lors de l'évaluation et démontrer l'application effective de son programme d'assurance et de contrôle de la qualité. Des lacunes concernant des éléments touchant les bonnes pratiques de laboratoire peuvent également faire l'objet de non-conformités additionnelles lors des évaluations. Le suivi apporté à ces éléments devrait être le même que celui prévu aux non-conformités soulevées par rapport aux exigences du présent document.

La correspondance entre les sections présentées dans ce document et celles apparaissant au chapitre III du document intitulé *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse* est indiquée entre parenthèses au début de chacune des sections.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	3
1 LOCAUX ET ENVIRONNEMENT (section 5.3)	5
1.1 Aménagement.....	5
1.2 Propreté.....	5
1.3 Conditions ambiantes.....	5
1.4 Qualité de l'environnement.....	6
2 MATÉRIEL ET RÉACTIFS (sections 4.6 et 5.9)	6
2.1 Membranes filtrantes.....	6
2.2 Verrerie et autres éléments.....	7
2.3 Milieux de culture, réactifs et produits chimiques.....	8
2.4 Solutions (y compris l'eau de rinçage, l'eau de dilution et l'eau déminéralisée stérile).....	9
2.5 Eau déminéralisée ou distillée.....	10
2.6 Conteneurs de prélèvement.....	11
2.7 Souches de contrôle.....	12
3 ÉQUIPEMENT (sections 5.5 et 5.6)	13
3.1 Système d'inventaire de l'équipement.....	13
3.2 Autoclave.....	14
3.3 Incubateurs et bains-marie.....	14
3.4 Réfrigérateurs.....	15
3.5 Thermomètres.....	16
3.6 Équipement de filtration.....	17
3.7 Stérilisateurs UV pour désinfection de l'équipement de filtration.....	17
3.8 pH-mètre.....	18
3.9 Balances.....	18
3.10 Micropipettes.....	19
3.11 Appareil UV servant à l'observation de la fluorescence pour l'obtention d'un résultat analytique.....	19
4 MÉTHODES D'ANALYSE (sections 5.4 et 5.9)	19
4.1 Calendrier des contrôles de la qualité.....	19
4.2 Contrôle de la stérilité.....	19
4.3 Confirmation des résultats.....	20
4.4 Validation, vérification et suivi de la performance des méthodes.....	22
4.5 Conformité réglementaire.....	27
5 TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (sections 5.8 et 5.10)	28
5.1 Échantillonnage et conservation des échantillons.....	28
5.2 Demande d'analyse et enregistrement des échantillons au laboratoire.....	29
5.3 Feuille de travail.....	30
5.4 Registre de confirmation.....	30
5.5 Rapport d'essai.....	31
5.6 Transcription et suivi des données pour les échantillons.....	31
RÉFÉRENCES	32
BIBLIOGRAPHIE	33
ANNEXE I	35

1 LOCAUX ET ENVIRONNEMENT (section 5.3)

1.1 Aménagement

L'aménagement du laboratoire de même que la disposition du matériel et des différents appareils doivent être adéquats pour faciliter le travail des analystes. Les activités de chimie, microbiologie et toxicologie doivent être effectuées dans des locaux séparés. De plus, une séparation efficace doit être aménagée entre les zones avoisinantes lorsque des activités incompatibles s'y déroulent.

Les locaux doivent contenir les espaces suivants :

- espace de réception des échantillons;
- espace d'entreposage;
- salle de lavage et de stérilisation;
- espace de préparation des milieux de culture;
- espace de travail pour l'analyse.

1.2 Propreté

La propreté de l'équipement des tables de travail et du laboratoire constitue une condition essentielle à un travail de qualité en microbiologie. Le responsable du laboratoire doit s'assurer que des mesures sont prises pour maintenir la propreté requise à la bonne marche des divers travaux de microbiologie. L'entretien des planchers du laboratoire de microbiologie doit s'effectuer à l'aide d'une vadrouille humide et d'une solution désinfectante. De plus, le désinfectant utilisé pour nettoyer les surfaces de travail doit être d'une efficacité suffisante pour détruire un large spectre de micro-organismes. Les désinfectants utilisés pour le nettoyage des planchers et des surfaces de travail doivent être changés périodiquement.

1.2.1 Calendrier d'entretien

Le laboratoire doit disposer d'un calendrier d'entretien des locaux et des tables de travail. Le nom du désinfectant utilisé pour le nettoyage des surfaces de travail et du plancher doit être indiqué sur ce calendrier.

1.3 Conditions ambiantes

Des conditions de température particulières sont nécessaires pour assurer le bon fonctionnement de certains équipements, comme les incubateurs et les bains-marie.

1.3.1 Température ambiante

Enregistrer la température des salles concernées du laboratoire une fois par jour, lorsque des travaux analytiques sont réalisés. La température ambiante doit se situer entre 16 °C et 27 °C.

1.4 Qualité de l'environnement

Le maintien d'une bonne qualité bactériologique de l'air et des surfaces de travail est nécessaire pour le déroulement normal des travaux de laboratoire.

1.4.1 Air ambiant

D'avril à octobre, vérifier mensuellement la qualité bactériologique de l'air ambiant; pour le reste de l'année, vérifier une fois aux trois mois.

Un résultat $< 15 \text{ UFC}/1000 \text{ cm}^2$ est jugé satisfaisant. Avec un appareil volumétrique, un résultat de $< 150 \text{ UFC}/\text{m}^3$ est également satisfaisant.

1.4.2 Surfaces de travail

Vérifier aux trois mois la stérilité des surfaces de travail (incubateurs, espace de réception des échantillons, réfrigérateurs). La stérilité des tables de travail doit être vérifiée mensuellement.

Un résultat $< 25 \text{ UFC}/25 \text{ cm}^2$ est satisfaisant.

2 MATÉRIEL ET RÉACTIFS (sections 4.6 et 5.9)

L'ensemble du matériel et des réactifs utilisés dans le laboratoire doit avoir été contrôlé avant la première utilisation et les critères spécifiés doivent être respectés. Les données brutes doivent être disponibles et facilement accessibles.

2.1 Membranes filtrantes

Le laboratoire doit exercer des contrôles sur les nouveaux lots de membranes filtrantes utilisés. La présence des caractéristiques suivantes doit être vérifiée : bonne diffusion du milieu de culture, non diffusion de l'encre du quadrillé et absence de région hydrophobe.

2.1.1 Conserver une copie de la fiche technique de chaque lot utilisé et enregistrer les numéros de lot ainsi que la date de la première utilisation.

2.1.2 Vérifier la conformité des colonies aux caractéristiques des protocoles d'analyse pour chaque nouveau lot, en utilisant les différents milieux de culture employés pour la technique de la membrane filtrante et enregistrer les données obtenues.

- 2.1.3 La vérification des colonies sur les membranes déposées sur les milieux permettant la détection simultanée de plus d'un type de micro-organismes (milieux combinés) doit inclure des souches permettant de vérifier les différents types de morphologies coloniales typiques des micro-organismes recherchés. Par exemple, pour le domaine 1, les milieux combinés doivent être vérifiés avec une souche d'*Escherichia coli* et avec une souche d'un autre coliforme.
- 2.1.4 Mesurer et enregistrer le pourcentage de récupération des membranes filtrantes. Il doit être supérieur à 80 %.

2.2 Verrerie et autres éléments

La verrerie et les contenants de prélèvement utilisés en microbiologie doivent être exempts de tout produit bactériostatique ou bactéricide et être en parfait état après le lavage.

L'instruction de travail concernant le lavage de la verrerie et des contenants de prélèvement doit être disponible et affichée dans le laboratoire.

- 2.2.1 Le laboratoire doit élaborer une instruction de lavage efficace pour ses diverses opérations comprenant au moins les étapes suivantes : lavage au détergent, rinçage à l'eau chaude du robinet, dernier rinçage à l'eau distillée ou déminéralisée.
- 2.2.2 Pour le lavage à la main, le détergent utilisé doit être exempt de phosphates et son pH doit être neutre.
- 2.2.3 Vérifier et enregistrer la présence de résidus inhibiteurs acides ou alcalins sur différents articles, y compris la verrerie et les contenants de prélèvement chaque trimestre et lorsque l'instruction de lavage ou le détergent sont changés. Le bleu de bromothymol peut être utilisé comme indicateur. Il indiquera un pH se situant à l'intérieur des limites acceptables, soit entre 6,5 et 7,3. La solution de bleu de bromothymol doit être conservée à l'abri de la lumière.

2.3 Milieux de culture, réactifs et produits chimiques

Le laboratoire doit créer et maintenir à jour un registre des milieux de culture, des réactifs et des produits chimiques. Les milieux de culture déshydratés et préparés, les milieux achetés en plaques et les réactifs doivent être entreposés selon les recommandations du fabricant. De plus, ils doivent être utilisés dans les délais acceptables prescrits par celui-ci.

Chaque nouveau lot de milieu de culture doit être contrôlé pour s'assurer qu'il satisfait aux critères des méthodes d'analyse. L'efficacité des nouveaux lots reçus doit être vérifiée par une mesure du pourcentage de récupération et par un test de sélectivité, s'il y a lieu. Ces contrôles doivent être répétés sur chaque contenant du lot au minimum six mois après leur ouverture. Les contrôles de la sélectivité des milieux combinés pour le domaine 1 doivent inclure une souche d'*Escherichia coli* et une souche d'un autre coliforme.

La sélectivité doit être vérifiée sur chaque nouveau lot de substrat enzymatique.

En outre, à chaque préparation de milieu de culture, la stérilité et le pH doivent être vérifiés et enregistrés avant utilisation. Lors de la vérification de la stérilité, la température et le temps d'incubation doivent correspondre à ceux que prescrivent les méthodes du laboratoire. Les milieux réhydratés doivent être utilisés dans les délais prescrits par les méthodes d'analyse.

2.3.1 Registre d'inventaire des milieux de culture déshydratés, des réactifs et des produits chimiques

2.3.1.1 Le registre doit être maintenu à jour et contenir les renseignements suivants :

- identification du produit;
- nom du fabricant;
- numéro de lot du produit;
- date de réception;
- date d'expiration.

2.3.1.2 Le laboratoire doit vérifier et enregistrer le pourcentage de récupération des nouveaux lots de milieux de culture. Cette vérification doit être répétée au minimum six mois après l'ouverture du contenant. Le pourcentage de récupération doit être compris entre 80 et 120 %.

2.3.1.3 Le laboratoire doit vérifier et enregistrer la sélectivité des nouveaux lots de milieux de culture et de substrats enzymatiques à l'aide de souches de contrôle positives et négatives et enregistrer les résultats.

2.3.1.4 Si le substrat enzymatique est utilisé dans le cadre d'une méthode de dénombrement par le nombre le plus probable, le pourcentage de récupération de la méthode doit être vérifié et le résultat doit être enregistré.

2.3.2 Registre de préparation des milieux de culture

Les renseignements suivants doivent être inscrits au registre :

- identification du milieu de culture;
- date de préparation;
- date d'expiration de la préparation;
- numéro de lot de la préparation;
- masses ou volumes utilisés;
- numéro de lot des produits utilisés (milieux déshydratés, réactifs et solution);
- test de stérilité;
- pH final;
- initiales de l'analyste.

2.3.3 Réactifs de confirmation et d'identification

Tous les nouveaux lots des réactifs utilisés pour la confirmation et l'identification des colonies doivent être contrôlés avant leur utilisation, et ce contrôle doit être refait périodiquement, en fonction de leur fréquence d'utilisation.

- Enregistrer les résultats des contrôles de chaque lot de réactifs de confirmation et d'identification.

2.4 Solutions (y compris l'eau de rinçage, l'eau de dilution et l'eau déminéralisée stérile)

2.4.1 Le laboratoire doit disposer d'un cahier ou d'un registre de préparation pour toutes les solutions qui y sont préparées et utilisées. Le cahier ou le registre doivent être disponibles au laboratoire.

Les éléments suivants, entre autres, doivent être indiqués dans le registre :

- identification de la solution;
- concentration de la solution;
- masses ou volumes utilisés;
- numéro de lot ou autre référence des produits utilisés;
- date de préparation;
- initiales de l'analyste;
- date de péremption.

2.4.2 Identification et conservation des solutions

Les éléments suivants doivent être indiqués sur le contenant de toutes les solutions préparées :

- identification claire et retraçable dans le registre de préparation;
- date de préparation;
- date de péremption ou durée de vie.

Le mode de conservation de chacune des solutions doit être décrit (durée de vie de la solution et température de conservation).

2.4.3 Eau de rinçage ou de dilution (tampon phosphate, eau peptonée ou eau déminéralisée stérile)

La stérilité de chaque lot de bouteilles d'eau de rinçage, de dilution ou d'eau déminéralisée stérile doit être vérifiée et enregistrée. Le pH de l'eau de rinçage ou de dilution doit satisfaire aux critères des méthodes d'analyse. Le registre de la préparation de l'eau de rinçage, de dilution ou d'eau déminéralisée stérile doit contenir, notamment, les renseignements définis au point 2.4.1 en plus des éléments suivants :

- test de stérilité;
- volume d'eau de dilution après stérilisation, lorsque requis.

2.5 Eau déminéralisée ou distillée

Les milieux de culture, les réactifs de même que l'eau de dilution ou de rinçage servant aux analyses microbiologiques sont nécessairement préparés à l'aide d'eau déminéralisée ou distillée. L'efficacité du système de purification de l'eau doit être vérifiée à intervalles réguliers, et les mesures correctives nécessaires doivent être appliquées et enregistrées. Les résultats des contrôles doivent être disponibles au laboratoire. Idéalement, les prélèvements doivent être effectués au robinet d'eau déminéralisée utilisée lors de la préparation des milieux de culture.

2.5.1 L'eau entreposée ne doit pas être conservée plus d'une semaine dans un contenant stérilisé. S'il est impossible de stériliser le contenant à l'autoclave, un entretien régulier doit être effectué. Une instruction d'entretien doit être disponible et affichée au laboratoire.

2.5.2 Les paramètres suivants doivent être vérifiés et les résultats doivent être enregistrés selon les fréquences établies.

Tableau 1 : Paramètres vérifiés et enregistrés selon les fréquences indiquées

PARAMÈTRE	FRÉQUENCE	RÉSULTAT ATTENDU
Conductivité	1/semaine	< 2 µmhos/cm à 25 °C
BHAA	1/mois	< 500 UFC/ml
Chlore résiduel total	1/mois	< 0,1 mg/l
Carbone organique total	1/mois	< 1,0 mg/l
Métaux ⁽²⁾	1/année ⁽¹⁾	< 0,05 mg/l individuel
Métaux totaux ⁽³⁾	1/année ⁽¹⁾	< 0,10 mg/l

(1) Plus fréquemment, si des problèmes surviennent dans les travaux d'analyse.

(2) Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn.

(3) La somme des concentrations des métaux indiqués au point (2).

Si les analyses de carbone organique total et métaux sont réalisées à l'interne, le laboratoire ne doit pas utiliser de l'eau provenant du même système d'eau distillée ou déminéralisée à titre de blanc d'analyse. Les analyses de carbone organique total et métaux doivent être réalisées par un laboratoire accrédité.

2.6 Contenants de prélèvement

Les contenants de prélèvement doivent pouvoir contenir un volume suffisant d'échantillon pour les tests requis. Ils doivent protéger les échantillons des contaminations extérieures jusqu'à ce que les analyses soient complétées. Ils doivent également permettre un nettoyage et une stérilisation adéquate lorsqu'ils ne sont pas à usage unique. Lors des prélèvements, un espace d'air d'au moins 2,5 cm doit être prévu entre l'échantillon et le bouchon. On utilise nécessairement des contenants de verre ou de plastique non toxique comme le polypropylène.

Une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) doit être utilisée comme agent de conservation. La concentration finale dans l'échantillon doit être de 100 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Cette concentration en thiosulfate permet de neutraliser une quantité de chlore résiduel libre correspondant à 15 mg/l.

Le laboratoire doit vérifier la stérilité d'au moins un contenant par lot de stérilisation et d'un minimum de 2 % de l'ensemble des contenants. La stérilité des contenants prérépandus provenant d'un fournisseur doit être vérifiée, avant leur mise en circulation, sur au moins un contenant pour chacune des sous-unités (boîte, sac, etc.) d'emballage reçues, et ce, sans

tenir compte des numéros de lots. Ces vérifications doivent être effectuées à l'aide d'un bouillon riche non sélectif.

Une date d'expiration, correspondant à une période de 120 jours, doit être inscrite sur chacun des contenants, à moins qu'ils ne soient protégés par un sceau de sécurité (scellé). Un numéro de lot doit également être inscrit sur chacun des contenants.

Les laboratoires peuvent avoir recours à des pharmacies comme dépositaires de contenants de prélèvement. Lorsque des contenants sont en consigne, le laboratoire doit apposer un sceau de sécurité (scellé) sur les bouchons des contenants afin d'assurer leur intégrité et leur stérilité aux clients. Une note avertissant les clients de ne pas utiliser un contenant lorsque le sceau est brisé doit être jointe. De plus, le laboratoire doit s'assurer que la direction de la pharmacie protège les contenants contre les sources de contamination potentielles. Tous les résultats de ces vérifications doivent être enregistrés.

- 2.6.1 Vérifier la stérilité des contenants de prélèvement et enregistrer les résultats. Identifier les lots de contenants placés en consigne dans une pharmacie.
- 2.6.2 Enregistrer la date d'expiration des contenants de prélèvement, s'il y a lieu.
- 2.6.3 Le laboratoire doit avoir une instruction de préparation des contenants et de la solution de thiosulfate de sodium.
- 2.6.4 Le laboratoire doit vérifier la teneur en thiosulfate de sodium pour chaque lot de contenants de prélèvement obtenus d'un fabricant.

2.7 Souches de contrôle

Les souches de contrôle sont utilisées, entre autres, pour vérifier la qualité des matériaux d'analyse. Le laboratoire doit maintenir un inventaire à jour des souches disponibles. Il doit également s'assurer de conserver et de manipuler adéquatement les souches et vérifier périodiquement les caractères phénotypiques et l'activité biochimique.

- 2.7.1 Le laboratoire doit posséder une liste à jour des souches de contrôle disponibles.
- 2.7.2 Le laboratoire doit établir une instruction de conservation et de manipulation des souches de contrôle permettant de maintenir leur intégrité et d'éviter toute mauvaise utilisation. L'instruction doit prévoir un nombre maximal de cinq passages excluant la mise en culture de la souche-mère pour chacune des souches de contrôle. Les résultats relatifs à l'application de cette instruction doivent être enregistrés.

2.7.3 Le laboratoire doit établir une instruction pour assurer la vérification, au minimum une fois par année, des caractères phénotypiques et de l'activité biochimique des souches de contrôle à chaque nouveau lot de culti-loop®, de « cryobille », ou à chaque nouveau lot de congélation. Les résultats relatifs à l'application de cette instruction doivent être enregistrés.

3 ÉQUIPEMENT (sections 5.5 et 5.6)

De façon générale, tous les instruments doivent être conformes aux spécifications du manufacturier. L'équipement de laboratoire doit être en bon état et conforme aux spécifications des méthodes d'analyse utilisées. Chaque instrument ou appareil doit posséder un registre d'entretien et de réparation et faire l'objet d'un programme de vérification périodique de la performance. Toutes les activités d'entretien et de réparation doivent être consignées. Les instructions du fabricant, si elles sont disponibles, sont rendues accessibles dans le laboratoire. Les instruments et les appareils défectueux ou non performants sont retirés et clairement identifiés jusqu'à la résolution du problème. Une vérification doit être effectuée avant leur remise en service. Des instructions concernant l'utilisation et l'entretien des instruments et appareils doivent être disponibles et le personnel doit être formé pour leur utilisation.

3.1 Système d'inventaire de l'équipement

Le registre d'inventaire de l'équipement doit contenir les renseignements suivants, sans s'y limiter:

- type d'équipement;
- numéro d'inventaire;
- modèle et numéro de série;
- nom du fabricant;
- emplacement actuel, le cas échéant;
- date de réception;
- état à la réception (neuf, usagé);
- date de la mise en service.

3.2 Autoclave

À chaque cycle de stérilisation, le laboratoire doit s'assurer que l'autoclave atteint et maintient la température de 121 °C et une pression interne adéquate. Pour préserver la qualité des milieux et réactifs utilisés, les procédures doivent permettre une diminution lente de la température et de la pression de l'autoclave. Une surcharge de l'appareil empêche une stérilisation efficace.

3.2.1 Pour chaque cycle de stérilisation, les renseignements suivants doivent être enregistrés:

- date;
- durée et température de stérilisation;
- matériel stérilisé;
- réaction du ruban thermosensible;
- initiales du préposé.

3.2.2 Le bon fonctionnement et l'efficacité de stérilisation de l'autoclave doivent être vérifiés mensuellement avec un indicateur biologique dans un cycle habituel contenant du matériel et les résultats doivent être enregistrés.

3.3 Incubateurs et bains-marie

Les incubateurs et les bains-marie doivent être propres et en bon état de fonctionnement. Le niveau de contamination des incubateurs doit être inférieur à la limite spécifiée à la section 1.4.2 du présent document. Pour les incubateurs, les thermomètres sont placés à l'intérieur de l'enceinte et doivent baigner dans de l'eau, du glycérol ou toute autre substance adéquate. Le laboratoire doit s'assurer de maintenir une humidité adéquate dans les incubateurs.

Les incubateurs et les bains-marie doivent être contrôlés lors de leur mise en service et, par la suite, au moins une fois tous les deux ans, pour s'assurer de leur efficacité à maintenir une température uniforme et pour éviter l'apparition d'un gradient de température. Le thermomètre de lecture, conservé à son emplacement habituel, doit être comparé avec un autre thermomètre qui est déplacé dans l'unité. Le laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité relatif aux lectures des deux thermomètres qui respecte les exigences des méthodes d'analyse. Si ces vérifications démontrent une instabilité récurrente, la fréquence de ce contrôle doit être augmentée.

- 3.3.1 Les incubateurs et les bains-marie doivent être nettoyés régulièrement.
- 3.3.2 Le niveau de contamination des incubateurs doit être mesuré selon la fréquence spécifiée à la section 1.4.2.
- 3.3.3 Le laboratoire doit enregistrer les températures des incubateurs et des bains-marie en avant-midi et en après-midi, pour chaque jour d'utilisation ou au moins deux fois par jour, à des intervalles de lecture d'au moins quatre heures. Les températures doivent se situer dans les intervalles prescrits par les protocoles analytiques. Dans le cas des laboratoires qui utilisent des systèmes d'enregistrement de la température en continu, il faut se référer aux exigences de la section 3.5.3.
- 3.3.4 Les résultats des vérifications de l'efficacité des incubateurs et des bains-marie doivent être enregistrés.

3.4 Réfrigérateurs

Les réfrigérateurs doivent être propres et le niveau de contamination doit être inférieur à la limite spécifiée à la section 1.4.2 du présent document. Tout le matériel doit être identifié et bien rangé de façon à éviter les risques de contamination croisée entre, par exemple, les échantillons contaminés et l'eau de dilution. Le matériel périssable doit porter une date d'expiration. Il faut s'assurer que le contrôleur de température est bien calibré et qu'il maintient la température à 5 ± 3 °C. Les thermomètres, placés à l'intérieur, doivent baigner dans l'eau ou du glycérol.

- 3.4.1 Les réfrigérateurs doivent être nettoyés périodiquement et le matériel périmé éliminé.
- 3.4.2 Le niveau de contamination des réfrigérateurs doit être déterminé selon la fréquence spécifiée à la section 1.4.2.
- 3.4.3 La température des réfrigérateurs doit être enregistrée une fois par jour. Dans le cas des laboratoires qui utilisent des systèmes d'enregistrement de la température en continu, il faut se référer aux exigences de la section 3.5.3.

3.5 Thermomètres

La précision des thermomètres et des sondes de température utilisés en laboratoire doit être inférieure à 0,5 °C et être conforme aux exigences de l'analyse. Les thermomètres et les sondes doivent être vérifiés annuellement à l'aide d'un thermomètre certifié d'une précision de $\pm 0,1$ °C, et cette vérification doit être enregistrée. Si la vérification est effectuée par une firme externe, celle-ci doit être accréditée par un organisme reconnu. Le laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité qui respecte les exigences des méthodes d'analyse. Le statut d'étalonnage doit être indiqué sur le thermomètre.

3.5.1 La vérification des thermomètres du laboratoire est enregistrée annuellement. Le laboratoire doit tenir compte des écarts de température ainsi déterminés lors de l'utilisation des thermomètres.

3.5.2 Le laboratoire doit s'assurer que la précision des thermomètres utilisés satisfait aux exigences de l'analyse.

3.5.3 Système d'enregistrement de la température en continu

Un système d'enregistrement de la température en continu peut être utilisé afin d'automatiser la prise des différentes températures. Le laboratoire doit établir une instruction qui définit l'utilisation, l'entretien et la calibration du système, de même que la gestion des critères d'acceptabilité de température. Les sondes devraient être immergées dans un liquide adéquat lorsqu'il est possible de le faire.

Toutes les sondes et tous les lecteurs d'un système d'enregistrement des températures en continu doivent être identifiés. L'inventaire de l'équipement doit indiquer ces éléments et permettre l'association entre le lecteur et la sonde, le cas échéant.

L'enregistrement des températures doit être effectué à une fréquence minimale d'une fois toutes les heures. Le laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité qui respecte les exigences des méthodes d'analyse. Tout dépassement de critère pour une période consécutive de quatre heures ou plus dans le cadre d'une utilisation régulière devra être documenté, et des actions devront être entreprises lorsque cela sera requis. Les dépassements enregistrés lors des activités de maintenance doivent être documentés, mais une seule fois par événement.

3.5.3.1 La vérification annuelle des sondes avec le thermomètre certifié doit tenir compte de l'association entre la sonde et le lecteur, lorsque cela est applicable. La vérification peut être effectuée par une firme externe et les données qui en découlent doivent être disponibles. La vérification des sondes du laboratoire doit être enregistrée annuellement. Le laboratoire doit tenir compte des écarts de température ainsi déterminés lors de l'utilisation des thermomètres.

3.5.3.2 Le laboratoire doit s'assurer que la précision des sondes satisfait aux exigences de la méthode d'analyse.

3.5.4 Thermomètre certifié

Le thermomètre certifié doit être étalonné à chacune des températures d'utilisation au minimum une fois tous les trois ans par un laboratoire d'étalonnage accrédité par un organisme reconnu. L'organisme doit pouvoir fournir un certificat d'étalonnage.

3.6 Équipement de filtration

Les entonnoirs doivent être en acier inoxydable, en verre ou en plastique pouvant aller à l'autoclave, de façon à éviter la corrosion. Les entonnoirs qui causent des fuites doivent être réparés ou remplacés. Les entonnoirs en acier inoxydable sont enduits d'une solution de silicone non bactéricide aux six mois. Tout l'équipement de filtration, tels que rampe, entonnoirs et pompe, doit être propre et en bon état. Un calibrage des entonnoirs est requis également afin de s'assurer l'utilisation d'un volume d'échantillon adéquat lors des analyses.

3.6.1 Le laboratoire doit s'assurer du bon état et de la propreté des équipements de filtration.

3.6.2 Effectuer et enregistrer le calibrage des entonnoirs à la réception, et annuellement par la suite, si le support du filtre est muni d'une grille. Les entonnoirs doivent être appariés avec leur support.

3.7 Stérilisateurs UV pour désinfection de l'équipement de filtration

À chaque utilisation, on doit s'assurer que les réflecteurs sont bien polis et vérifier le bon fonctionnement des lampes UV. L'efficacité germicide doit être vérifiée semestriellement par une analyse bactériologique de contrôle et à la suite de tout changement de lampe dans l'appareil. Au besoin, la surface des réflecteurs ainsi que les lampes UV doivent être nettoyées avec un linge humide puis asséchées.

3.7.1 Le bon fonctionnement des lampes doit être vérifié hebdomadairement et les résultats enregistrés.

3.7.2 Des tests d'efficacité germicide doivent être effectués deux fois par année et les résultats enregistrés. Un pourcentage supérieur à 99 % est attendu.

3.8 pH-mètre

Le pH-mètre doit détecter des variations de 0,1 unité de pH ou moins. Les électrodes doivent être entretenues selon les recommandations du fabricant.

À chaque utilisation, on doit étalonner l'appareil à l'aide d'au moins deux solutions tampons différentes dont les pH se situent de part et d'autre du pH de la solution à mesurer. La valeur de la pente du pH-mètre de même que le critère d'acceptabilité doivent pouvoir être consultés.

3.8.1 Le laboratoire doit s'assurer de la disponibilité d'une instruction d'étalonnage du pH-mètre et inscrire dans un registre, chaque jour d'utilisation, la valeur de la pente, les solutions tampons utilisées et la date de vérification.

3.9 Balances

Le calibrage de toutes les balances du laboratoire doit être vérifié à l'aide d'un assortiment de poids certifiés, au minimum une fois tous les ans et selon une procédure et des critères d'acceptabilité établis. Cette vérification doit être enregistrée. Si la vérification du calibrage est effectuée par une firme externe, celle-ci doit être accréditée par un organisme reconnu. Les poids certifiés du laboratoire doivent être étalonnés au minimum une fois tous les trois ans par un organisme reconnu. L'organisme doit pouvoir fournir un certificat d'étalonnage. Même si la vérification des balances est effectuée par une firme externe, le laboratoire doit avoir en sa possession un assortiment de poids certifiés.

Chaque jour d'utilisation d'une balance, le personnel doit s'assurer qu'elle est à niveau et exempte de poussière. Les balances doivent être placées à l'abri des courants d'air, dans un endroit peu fréquenté du laboratoire et sur une table à l'épreuve des vibrations. On doit s'assurer de la bonne opération de la balance au moins une fois par semaine d'utilisation à l'aide de poids de référence. Le résultat de cette vérification doit être enregistré, et des actions doivent être entreprises lors du dépassement des critères établis.

Il est important de souligner que l'assortiment de poids certifiés utilisé pour la vérification annuelle de la balance ne doit pas être utilisé pour cette vérification hebdomadaire.

3.9.1 Le calibrage de la balance doit être vérifié chaque semaine à l'aide d'un assortiment de poids de référence et la vérification doit être enregistrée.

3.9.2 Le calibrage de la balance doit être vérifié annuellement à l'aide d'un assortiment de poids certifiés et la vérification doit être enregistrée.

3.9.3 Les poids de référence doivent être vérifiés trimestriellement avec un assortiment de poids certifiés et la vérification doit être enregistrée.

3.10 Micropipettes

Les micropipettes doivent être vérifiées ou étalonnées avant la mise en service et après chaque réparation ou prêt. La procédure d'étalonnage des micropipettes doit définir la fréquence de l'étalonnage ainsi et des critères d'acceptabilité qui respectent les exigences des méthodes. Les données d'étalonnage doivent être enregistrées. Les micropipettes doivent être vérifiées au minimum une fois par mois et les résultats de la vérification doivent être enregistrés.

3.11 Appareil UV servant à l'observation de la fluorescence pour l'obtention d'un résultat analytique

Les appareils UV servant à l'observation de la fluorescence des colonies ou d'un substrat enzymatique doivent être vérifiés deux fois par année avec un échantillon positif.

Pour les laboratoires accrédités pour le domaine 4, les exigences de cette section sont incluses dans la section 4.3.4.

4 MÉTHODES D'ANALYSE (sections 5.4 et 5.9)

4.1 Calendrier des contrôles de la qualité

Le laboratoire doit avoir un calendrier des contrôles de la qualité, afin d'effectuer les différentes opérations de vérification décrites dans ce document. Le calendrier doit contenir la liste des contrôles et leur fréquence d'application. Les initiales des analystes qui ont effectué les contrôles doivent être inscrites sur le calendrier ou sur les enregistrements correspondants. Ce calendrier est affiché dans le laboratoire, à la vue du personnel.

4.2 Contrôle de la stérilité

Pour assurer des résultats d'analyse fiables, il est essentiel d'intégrer des contrôles de stérilité au travail de routine. Ces contrôles devront tenir compte des paramètres analysés, de la méthode utilisée et de la sélectivité. Les résultats doivent être inscrits sur la feuille de travail.

4.2.1 Membrane filtrante

Pour la méthode de la membrane filtrante, la stérilité de l'équipement de filtration doit être vérifiée avant chaque série de filtrations (1 échantillon sur 10) pour chacun des milieux de culture utilisés et le résultat doit être clairement enregistré sur la feuille de travail.

4.2.2 Incorporation à la gélose

Pour la méthode d'incorporation à la gélose, la stérilité doit être vérifiée une fois par 10 échantillons et au moins une fois par série d'analyses.

4.2.3 Présence / absence

Pour l'analyse des coliformes totaux, des *E. coli* et des salmonelles, la stérilité doit être vérifiée à chaque série d'analyses. Finalement, pour la méthode de présence/absence des coliphages, vérifier la stérilité au début et à la fin de chaque série d'analyses, avant le contrôle positif et les contrôles de matrices. De plus, un contrôle de stérilité supplémentaire doit être effectué pour chaque tranche de 10 échantillons de façon à répartir uniformément ces contrôles dans la série. Les résultats doivent être clairement enregistrés sur la feuille de travail.

4.3 Confirmation des résultats

4.3.1 Coliformes totaux (colonies atypiques) : méthode de la membrane filtrante pour l'eau potable (domaine 1)

Le laboratoire doit confirmer les colonies atypiques sur le milieu utilisé pour le dénombrement des coliformes totaux sans tenir compte des coliformes totaux déjà dénombrés sur le milieu lorsque ces derniers se situent sous la limite supérieure de quantification de la méthode. Les confirmations doivent être effectuées selon la fréquence prévue et les résultats notés dans un registre.

4.3.1.1 Un minimum de deux colonies atypiques doit être confirmé et enregistré pour les échantillons d'eau potable ayant une numération inférieure à 30 UFC par membrane pour les colonies atypiques. De plus, au moins une colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.

4.3.1.2 10 % des colonies atypiques jusqu'à concurrence de cinq colonies doivent être confirmées et enregistrées pour les échantillons d'eau potable ayant une numération égale ou supérieure à 30 UFC par membrane pour les colonies atypiques. De plus, au moins une colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.

4.3.2 *Escherichia coli* (domaines 30 et 32) : méthode de la membrane filtrante pour les eaux brutes conformément au Règlement sur la qualité de l'eau potable (Q-2, R. 40)⁴ (RQEP), articles 22 et 53.

Le laboratoire doit s'assurer de dénombrer les bactéries *Escherichia coli* présentes en filtrant des volumes inférieures à 100 ml ou en diluant l'échantillon au besoin.

Le laboratoire doit confirmer les colonies typiques de coliformes fécaux pour les échantillons d'eaux brutes du RQEP⁴ de la façon suivante pour produire des résultats en *E. coli* lorsque le milieu de culture utilisé n'est pas à détection directe de la bactérie :

4.3.2.1 Confirmer et enregistrer un minimum de deux colonies typiques pour les échantillons ayant une numération inférieure à 30 UFC par membrane. De plus, au moins une colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.

4.3.2.2 Confirmer et enregistrer 10 % des colonies typiques jusqu'à concurrence de cinq colonies pour les échantillons ayant une numération supérieure à 30 UFC par membrane. De plus, au moins une colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.

4.3.3 Méthode de la membrane filtrante

Le laboratoire doit confirmer, avec des échantillons contaminés naturellement, la présence de micro-organismes pour les paramètres dont il détient une accréditation. Le laboratoire doit déterminer une fréquence de confirmation des colonies typiques et atypiques, le cas échéant, pour chaque paramètre, en fonction du nombre d'échantillons analysés, au moins une fois par année.

4.3.4 Méthodes de présence/absence et du nombre le plus probable (NPP) par substrat enzymatique (coliformes totaux et *E. coli*)

4.3.4.1 Un échantillon positif ou, à défaut, un échantillon fortifié avec une souche positive, doit être confirmé au moins une fois par semaine pour les coliformes totaux à l'aide d'un autre test ONPG ou d'un système d'identification biochimique et de la cytochrome oxydase et les résultats doivent être enregistrés.

4.3.4.2 Un échantillon positif ou, à défaut, un échantillon fortifié avec une souche positive, doit être confirmé au moins une fois par semaine pour *E. coli* à l'aide d'un autre test MUG ou d'un système d'identification biochimique et de la cytochrome oxydase et les résultats doivent être enregistrés.

4.4 Validation, vérification et suivi de la performance des méthodes

La validation initiale ou primaire d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres : la limite de détection (LDM), la limite de quantification (LQM), la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la performance, la sélectivité et finalement, la récupération. Ce type de validation doit être effectué par l'organisme ou le laboratoire qui conçoit une nouvelle méthode d'analyse.

À l'intérieur du *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse* (PALA), les laboratoires doivent utiliser des méthodes de référence normalisées provenant d'organismes reconnus tels que CEAEQ, MOH, USEPA, Santé Canada, ISO, AFNOR, et autres. Ils doivent effectuer une vérification des méthodes au laboratoire avant de les utiliser et démontrer qu'ils sont capables d'obtenir une performance comparable ou supérieure aux données de validation disponibles dans les méthodes de référence normalisées. On parle ici de validation secondaire.

Lorsque les méthodes sont utilisées au laboratoire, elles doivent faire l'objet d'un suivi pour s'assurer qu'elles répondent en continu aux données de validation obtenues lors de la validation initiale. De plus, les analystes doivent avoir été formés et reconnus comme compétents avant de pouvoir analyser des échantillons à l'aide d'une méthode donnée. Des preuves de cette formation et de la reconnaissance des compétences doivent être conservées. Les critères d'acceptabilité déterminés par le laboratoire se doivent d'être égaux ou inférieurs à 2 CVR (selon le document DR-12-CVR, *Critères de variation relatifs*²).

Le document *Protocole pour la validation et la vérification d'une méthode d'analyse en microbiologie*, DR-12-VMM³, décrit l'approche de validation préconisée par le CEAEQ qui doit être suivie par l'ensemble des laboratoires accrédités pour ce secteur.

4.4.1 Validation d'une nouvelle méthode préalable à l'implantation au laboratoire (demande d'accréditation ou extension de portée).

Le laboratoire doit effectuer une évaluation d'une nouvelle méthode d'analyse en analysant vingt échantillons positifs différents ou plus, comprenant chacune des matrices qui peuvent être analysées à l'aide de cette méthode. Les résultats obtenus peuvent servir par la suite aux calculs de la performance et de la sélectivité de la méthode.

Selon la technique utilisée le laboratoire doit documenter la performance (sensibilité, spécificité, taux de faux positifs, taux de faux négatifs, efficacité) et la sélectivité de la méthode, établir la répétabilité et la replicabilité ainsi que le pourcentage de récupération à partir d'échantillons naturels qui peuvent êtreensemencés avec l'organisme cible. Il doit comparer les données de validation obtenues à celles publiées dans les méthodes de référence normalisées.

Les échantillons utilisés doivent être, autant que possible, semblables aux échantillons qui sont analysés de routine à l'aide de cette méthode. Les éléments de validation propres aux techniques utilisées par le laboratoire sont spécifiés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Éléments de validation en fonction des techniques utilisées

Éléments de validation	Membranes filtrantes	Nombre le plus probable (NPP)	Incorporation à la gélose	Présence/Absence
Répliquabilité	X	X	X	
Répétabilité	X	X	X	
Pourcentage de récupération	X	X		
Performance (sensibilité, spécificité, taux de faux positifs et de faux négatifs)	X	X		
Sélectivité	X	X		

X : Ces éléments de validation doivent être documentés par le laboratoire.

4.4.2 Validation d'une nouvelle méthode préalable à l'implantation au laboratoire pour un paramètre déjà accrédité (changement de méthode)

Le laboratoire doit effectuer une comparaison de la performance de la nouvelle méthode avec celle qui est remplacée, à l'aide de vingt échantillons réels positifs différents ou plus, comprenant chaque matrice analysée à l'aide de cette méthode, suivie d'une analyse des résultats.

Pour les méthodes quantitatives, une analyse statistique des résultats doit être faite par exemple à l'aide d'une régression linéaire, d'un test de T pairé ou de F, entre la méthode actuelle et la nouvelle méthode, et ce, avant et après confirmation biochimique (pour les analyses requérant une confirmation).

Selon la technique utilisée, le laboratoire doit documenter la performance (sensibilité, spécificité, taux de faux positifs, taux de faux négatifs et efficacité) et la sélectivité à partir des données obtenues selon les éléments du tableau 2. Dans le cas des domaines 1, 2 et 3, des échantillons réels fortifiés peuvent être utilisés. La performance et la sélectivité peuvent être vérifiées ultérieurement, après l'analyse et la confirmation d'au moins 10 échantillons réels contaminés naturellement.

De plus, également selon la technique utilisée et les éléments prescrits dans le tableau 2, le laboratoire doit établir la répétabilité et la réplicabilité ainsi que le pourcentage de récupération à partir d'échantillons naturels qui peuvent être ensemencés avec l'organisme cible. Il doit comparer les données de validation obtenues à celles obtenues pour la méthode qui est remplacée et celles publiées dans les méthodes de référence normalisées.

Les échantillons utilisés doivent être, autant que possible, semblables aux échantillons qui seront analysés de routine à l'aide de cette méthode.

4.4.3 Suivi de la performance des méthodes

4.4.3.1 Des données de validation doivent être disponibles pour l'ensemble des méthodes utilisées. Selon la technique utilisée et les éléments du tableau 2, le laboratoire doit documenter les éléments suivants et les comparer aux données publiées dans les méthodes de référence normalisées :

- répétabilité;
- réplicabilité de chaque analyste;
- performance (sensibilité, spécificité, taux de faux positifs, taux de faux négatifs, efficacité);
- sélectivité.

Ces deux derniers éléments peuvent être déterminés à l'aide des confirmations biochimiques effectuées pour satisfaire aux exigences de la section 4.3 du présent document.

4.4.3.2 Techniques de filtration sur membrane filtrante, NPP et d'incorporation à la gélose

Le laboratoire doit inclure l'analyse de duplicatas, qui peuvent être des échantillons naturels ensemencés avec l'organisme cible (échantillons fortifiés), à raison d'une fréquence d'un duplicata intra-analyste par paramètre par 50 échantillons analysés. Au moins un duplicata intra-analyste par paramètre doit être effectué chaque année. L'analyse doit inclure la réalisation de dilutions, s'il y a lieu. Des critères d'acceptabilité doivent être établis et être inférieurs au critère de variation relatif du document DR-12-CVR.

S'il possède plus d'un analyste, le laboratoire doit trimestriellement s'assurer que des duplicatas sont analysés par des analystes différents pour des matrices naturellement contaminées (échantillons positifs) ou pour des échantillons naturels fortifiés pour chacun des paramètres. Des critères d'acceptabilité doivent être établis et être inférieurs au critère de variation relatif provenant du document DR-12-CVR.

S'il possède plus d'un analyste, le laboratoire doit annuellement effectuer une comparaison de lecture d'un échantillon naturel positif pour l'ensemble des analystes et pour chacun des paramètres analysés. Des critères d'acceptabilité doivent être établis et être inférieurs à 10 %.

Pour les méthodes de présence/absence et du nombre le plus probable (NPP) par substrat enzymatique (par exemple, coliformes totaux et *E. coli*), le laboratoire doit inclure des contrôles positifs en utilisant une souche positive de coliformes totaux et une souche d'*E. coli* au minimum une fois par semaine d'analyse.

Pour la méthode de présence/absence des salmonelles, un contrôle de matrice doit être réalisé pour chaque échantillon.

Pour la méthode de présence/absence des coliphages, un contrôle de matrice doit être réalisé pour chaque série d'analyses.

Le tableau 3 résume les éléments de contrôle de la méthode qui doivent être effectués selon la technique utilisée.

Tableau 3. Exigences de suivi de la performance des méthodes

Éléments de contrôle	Membranes filtrantes	Nombre le plus probable (NPP)	Incorporation à la gélose	Présence/Absence (coliformes totaux, <i>E. coli</i>)	Présence/Absence (salmonelles)	Présence/Absence (coliphages)
Duplicata intra-analyste	X	X	X			
Duplicata inter-analyste trimestriel	X	X	X			
Comparaison de lecture annuelle	X	X	X			
Contrôle positif au minimum une fois par semaine d'analyse		X		X		
Contrôle de matrice par échantillon ¹					X	
Contrôle de matrice par série d'analyses à effectuer à la fin de la série ¹		X				X

X : Ces éléments de contrôle doivent être effectués par le laboratoire.

¹ : Des particularités liées aux méthodes de référence peuvent s'appliquer.

4.4.4 Évaluation et suivi de la compétence des analystes

La compétence des analystes doit être évaluée avant de les autoriser à utiliser une méthode donnée, à l'exception des méthodes de présence/absence. Cette évaluation est réalisée à l'aide d'un essai de réplicabilité effectué sur des échantillons synthétiques ou naturels contaminés pour chaque paramètre pour lequel l'analyste est évalué. Également, un duplicata inter-analyste doit être effectué entre l'analyste à qualifier et un analyste déjà autorisé à réaliser la méthode considérée. Des critères d'acceptabilité basés sur les données de validation doivent être établis pour chacune des méthodes.

Dans le cas où un analyste n'est autorisé qu'à effectuer des filtrations (sans lecture de membranes), au moins un essai de réplicabilité et un duplicata inter-analyste doivent être effectués pour chaque type de matrice. Dans ce cas, la filtration est réalisée par l'analyste à qualifier et la lecture est effectuée par un analyste autorisé.

Un suivi de la compétence est effectué annuellement à l'aide des résultats obtenus lors des analyses de duplicata en cours d'année. Des critères d'acceptabilité basés sur les données de validation doivent être établis pour chacune des méthodes.

4.4.5 Vérification des données de validation

Les données de validation doivent être vérifiées au minimum une fois par année et de nouvelles données doivent être produites lorsque des changements importants sont apportés aux équipements ou lorsqu'il y a une modification importante de l'équipe d'analystes. L'information concernant l'actualisation des méthodes doit être conservée. La vérification des données de validation peut se faire à l'aide des résultats des duplicatas inter-analyste, intra-analyste et des résultats des essais d'aptitude. La performance et la sélectivité doivent être mises à jour annuellement à partir des données recueillies lors des confirmations des colonies d'échantillons naturellement contaminés. La vérification de ces données doit permettre, entre autres, d'ajuster les fréquences de confirmation des colonies typiques et atypiques obtenues avec les différentes méthodes.

4.4.6 Suivi des résultats des essais d'aptitude

Le laboratoire doit être en mesure de démontrer qu'un suivi de ses résultats d'essai d'aptitude est effectué et qu'il entreprend des mesures correctives ou préventives, selon le cas, lorsqu'il ne satisfait pas aux exigences du Programme d'accréditation.

4.4.7 Vérification des méthodes utilisées

Les méthodes d'analyse employées doivent être connues et assimilées par les analystes. Les évaluateurs vérifieront sur place lors des évaluations sur site, la connaissance des différentes méthodes d'analyse.

4.5 Conformité réglementaire

Le laboratoire doit respecter tous les règlements en vigueur et pour lesquels des responsabilités sont prévues pour les laboratoires accrédités. Les modalités d'interprétations relatives au RQEP⁴ se trouvent à l'annexe I.

4.5.1 Les évaluateurs vérifieront sur place le respect des exigences réglementaires et, entre autres, les modalités de transmission des résultats d'analyse et l'interprétation des normes applicables en fonction du type d'échantillon analysé.

5 TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (sections 5.8 et 5.10)

Le mode d'enregistrement des données constitue un facteur important dans l'obtention de résultats fiables. Tous les renseignements concernant les analyses doivent être enregistrés et disponibles afin que la direction du laboratoire puisse démontrer que ses opérations sont contrôlées. Le laboratoire doit avoir un système documenté permettant d'identifier de façon unique les échantillons à analyser, afin qu'il n'y ait à aucun moment de confusion sur l'identité de tels échantillons. Tous les enregistrements manuscrits doivent être faits à l'encre.

5.1 Échantillonnage et conservation des échantillons

Le responsable du laboratoire doit s'assurer que ses clients prélèvent adéquatement les échantillons pour les analyses microbiologiques. Un dépliant dans lequel est décrite la technique de prélèvement doit être remis aux clients, avec le formulaire de demande d'analyse et les contenants de prélèvement.

Tous les échantillons d'eau doivent parvenir au laboratoire moins de 48 heures après le prélèvement et être maintenus idéalement à une température d'environ 4 °C. Le thiosulfate de sodium doit être utilisé dans tous les contenants de prélèvement à la concentration précisée dans les méthodes d'analyse.

Pour tous les échantillons d'eau prélevés pour l'application du RQEP⁴ et du *Règlement sur la qualité de l'eau des piscines et autres bassins artificiels* (Q-2, r. 39)⁵, le responsable du laboratoire doit s'assurer que les informations transmises au client pour le prélèvement de l'échantillon respectent les exigences du règlement ou du document de référence DR-09-05⁷. Lors de la réception d'échantillons, le laboratoire doit s'assurer que ces derniers sont conformes aux exigences suivantes :

Pour les prélèvements d'eau potable :

- les échantillons reçus congelés, partiellement dégelés ou contenant des traces de frasil sont rejetés de même que ceux dépassant le délai de conservation prévu pour les paramètres microbiologiques (48 heures);
- les volumes prélevés (quantité d'échantillon reçu) pour chacun des paramètres doivent respecter les exigences de la réglementation en vigueur;

- la température des échantillons reçus plus d'une heure après le prélèvement doit être mesurée dès leur réception à l'aide d'un thermomètre infrarouge. Le thermomètre infrarouge doit être vérifié annuellement. Le laboratoire doit aviser le responsable du réseau de distribution d'eau si les échantillons dépassent 12 °C;
- lorsque le laboratoire fournit des glacières et des agents réfrigérants, il doit s'assurer qu'ils sont propres (nettoyage régulier) et autant que possible réservés à l'analyse de l'eau potable.

Pour les piscines et autres bassins artificiels :

Les échantillons doivent toujours être prélevés dans des contenants stériles à large ouverture.

5.1.1 Mesurer et enregistrer la température des échantillons d'eau potable dès la réception au laboratoire. Un avis est transmis au responsable du système de distribution lorsqu'il y a dépassement.

5.1.2 Enregistrer les raisons liées au rejet des échantillons non conformes.

5.2 Demande d'analyse et enregistrement des échantillons au laboratoire

Le laboratoire doit mettre en place un système d'enregistrement des échantillons permettant de conserver tous les renseignements nécessaires pour assurer une traçabilité adéquate de l'information. Pour tous les échantillons, les renseignements suivants, sans s'y limiter, doivent être disponibles sur support papier ou informatique :

- date du prélèvement;
- identification de l'échantillon;
- identification du point de prélèvement;
- identification du préleveur;
- identification du client*;
- nature de l'échantillon;
- état de l'échantillon à la réception;
- paramètre(s) demandé(s);
- date de réception;
- numéro de laboratoire (numéro attribué à l'échantillon par le laboratoire);
- nombre de contenants (s'il y a lieu);
- la température des échantillons (échantillons d'eau potable reçus au laboratoire plus d'une heure après le prélèvement);
- tout autre commentaire approprié.

* Ne s'applique pas aux laboratoires n'offrant pas de services à la clientèle externe.

Le RQEP⁴ exige que les échantillons d'eau prélevés et transmis pour fins d'analyse soient accompagnés de formulaires de demande d'analyse fournis par le ministre. Un formulaire conforme au modèle fourni par le ministre et accepté par la direction régionale peut également être utilisé.

5.3 Feuille de travail

Les feuilles de travail doivent contenir, sans s'y limiter, les renseignements suivants, inscrits à l'encre :

- numéro de l'échantillon;
- date et heure de l'analyse;
- date et heure de lecture;
- type d'eau analysé;
- volumes d'eau servant à l'analyse;
- résultats correspondant à chaque volume d'eau analysé;
- témoins de stérilité;
- résultats des contrôles positifs (s'il y a lieu);
- numéro de lot des membranes;
- numéros de lot de préparation des milieux de culture et de l'eau de rinçage ou de dilution;
- numéro de l'unité d'incubation utilisée (si plus d'une unité disponible);
- résultats des dénombrements avant la confirmation, s'il y a lieu (colonies typiques et atypiques);
- identification des échantillons confirmés;
- résultats confirmés, le cas échéant;
- résultats analytiques accompagnés des unités pertinentes;
- initiales de l'analyste;
- initiales de la personne qui vérifie l'exactitude des calculs effectués.

5.4 Registre de confirmation

Le registre de confirmation doit au moins contenir les renseignements suivants :

- numéro de l'échantillon;
- date de la confirmation;
- résultats de la confirmation;
- interprétation des résultats;
- initiales de l'analyste.

5.5 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir, sans s'y limiter, les renseignements suivants, en référence à la disposition 5.10 de la section III du Programme d'accréditation :

- un titre, par exemple « Rapport d'essai »;
- le nom et l'adresse du laboratoire, ainsi que le lieu où l'analyse a été effectuée, s'il diffère de l'adresse du laboratoire;
- l'indication unique du rapport d'essai (tel que le numéro de série) et, sur chaque page, une indication permettant d'assurer que la page est reconnue comme faisant partie du rapport, avec une indication claire de la fin du rapport;
- le nom et l'adresse du client (s'il y a lieu);
- le numéro ou une description non ambiguë de l'échantillon;
- les caractéristiques principales et l'état de l'échantillon analysé;
- la date de l'échantillonnage;
- la date de réception de l'échantillon;
- la date de l'analyse (date du début de l'analyse);
- l'identification de la méthode employée;
- toute divergence, ajout ou suppression par rapport à la méthode d'analyse utilisée;
- les résultats des analyses, accompagnés des unités pertinentes;
- la signature du rapport par le superviseur ou un signataire autorisé et la date d'émission.

5.6 Transcription et suivi des données pour les échantillons

Lors des évaluations sur site, les évaluateurs retraceront une série d'échantillons par domaine accrédité et vérifieront les éléments spécifiés dans la *Grille d'évaluation microbiologie*⁶, DR-12-GAM.

RÉFÉRENCES

1. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse : Normes et exigences*, DR-12-PALA, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, 2012, 77p.
2. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Critères de variation relatifs*, DR-12-CVR, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de lutte contre les changements climatiques, 2017, 26 p.
3. 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, 2012, 17 p.
4. QUÉBEC. *Règlement sur la qualité de l'eau potable, chapitre Q-2, r. 40*, à jour au 15 novembre 2017, [Québec], Éditeur officiel du Québec, 2017.
5. QUÉBEC. *Règlement sur la qualité de l'eau des piscines et autres bassins artificiels, chapitre Q-2, r. 39*, à jour au 1^{er} décembre 2017, [Québec], Éditeur officiel du Québec, 2017.
6. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Grille d'évaluation microbiologie*, DR-12-GAM, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de lutte contre les changements climatiques, 2014, 55 p.
7. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Méthodes de prélèvement, de conservation et d'analyse des échantillons relatifs à l'évaluation de la qualité de l'eau des piscines et autres bassins artificiels*, DR-09-05, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2009, 13 p.

BIBLIOGRAPHIE

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). *Standard Specification for Reagent Water*, D 1193-91, 1991.

APHA-AWWA-WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd edition, Washington DC, 2017.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche des coliformes totaux et de Escherichia coli avec le milieu de culture Colilert® : méthode présence/absence*, MA. 700 – Ecct. 1.0, Rév. 2, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2015, 9 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche des coliphages F-spécifiques et des coliphages somatiques : méthode présence/absence*, MA. 700 – Colph 1.0, Rév. 3, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2015, 24 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement des coliformes totaux : Méthode par filtration sur membrane*, MA. 700 – Col 1.0, Rév. 4, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2016, 20 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (thermotolérants) et confirmation à l'espèce Escherichia coli : Méthode par filtration sur membrane*, MA. 700 – Fec. Ec 1.0, Rév. 4, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2014, 21 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives : Méthode par incorporation à la gélose*, MA. 700 – BHA35 1.0, Rév. 3, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2011, 15 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement des entérocoques : Méthode par filtration sur membrane*, MA. 700 – ENT 1.0, Rév. 5, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2014, 23 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement de Staphylococcus aureus : Méthode par filtration sur membrane*, MA. 700 – STA 1.0, Rév. 5, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2016, 18 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement de Pseudomonas aeruginosa : Méthode par filtration sur membrane*, MA. 700 – PSE 1.0, Rév. 4, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2016, 18 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement simultanés des coliformes totaux et d'Escherichia coli dans l'eau potable avec le milieu de culture MI : Méthode par filtration sur membrane*, MA. 700 – Ecctmi. 1.0, Rév. 3, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2015, 19 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche des salmonelles : méthode présence/absence*, MA. 700 – Sal-PA 1.0, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, 2013, 25 p.

ANNEXE I

Modalités d'interprétation applicables au Règlement sur la qualité de l'eau potable (Q-2, r. 40)

1) Pour les réseaux alimentant 21 personnes ou plus

La présente section précise les modalités applicables à l'interprétation des résultats générés pour le suivi des réseaux alimentant 21 personnes ou plus. En aucun temps, ces modalités ne remplacent celles du Règlement ou des documents connexes publiés par le Ministère.

Escherichia coli

Lors du contrôle bactériologique régulier, le Règlement sur la qualité de l'eau potable spécifie qu'un résultat positif d'*Escherichia coli* entraîne un avis d'ébullition automatique émis par l'exploitant. Cet avis ne sera levé que par le retour à la conformité du système de distribution, selon les exigences du Règlement. Un résultat positif d'*Escherichia coli* est un résultat final qui ne nécessite aucune confirmation. La méthode utilisée doit détecter directement la bactérie *Escherichia coli*.

Le terme « coliformes fécaux » ne doit pas être utilisé pour la transmission des résultats dans le cadre de l'application du présent Règlement.

Un rapport préliminaire est considéré comme un résultat final et ne peut pas être annulé ou modifié par un rapport officiel confirmant l'absence ou la présence d'*E. coli*. Cette pratique ne respecte pas le libellé du Règlement.

Coliformes totaux

Contrairement à *Escherichia coli*, le résultat de l'analyse des coliformes totaux n'est final qu'après confirmation des colonies selon la fréquence définie. Le laboratoire doit attendre le résultat des confirmations avant de transmettre l'information dans le cas d'un résultat positif.

Le laboratoire doit éviter de transmettre deux résultats différents (préliminaire et final). Ceci entraîne de la confusion et des difficultés dans le suivi de la situation par les intervenants concernés.

Les colonies atypiques et les résultats TNI ou TNC

Les colonies atypiques sont des colonies qui ne présentent pas la morphologie coloniale attendue (aspect et couleur) sur le milieu de culture employé. Les colonies atypiques doivent être confirmées selon la fréquence indiquée à la section 4.3 du présent document.

Les résultats suivants ne respectent pas la norme et doivent être transmis sans délai :

- résultats supérieurs à 200 colonies atypiques (> 200 colonies atypiques);
- colonies trop nombreuses pour être comptées (TNC);
- ou trop nombreuses pour être identifiées (TNI).

Si une confirmation des colonies est effectuée, l'information supplémentaire n'ajoute rien au résultat préalablement obtenu lors du dénombrement.

Lors de la transmission de résultats > 200 colonies atypiques, aucun résultat de coliformes totaux ne doit être transmis. Pour un résultat TNI, émettre TNI pour les coliformes totaux.

Les résultats en colonies atypiques qui sont inférieurs à 200 UFC par membrane respectent la norme et nécessitent une confirmation.

Les colonies atypiques et les résultats TNI sur les milieux combinés

Le terme « milieu combiné » fait référence aux milieux de culture utilisés pour la détection et le dénombrement simultané des coliformes totaux et d'*Escherichia coli*. Ces milieux sont utilisés par certains laboratoires pour l'analyse de l'eau potable à l'intérieur du Règlement. Il s'agit de milieux tels que MI agar, DC medium et Chromocult®. Il y a cependant certaines particularités qui existent dans l'interprétation des résultats, hors-normes ou non, avec ces méthodes.

Un résultat > 200 colonies atypiques par 100 ml (aucune colonie d'*E. coli* présente) : il y a présence de plus de 200 colonies atypiques et une absence de confluence.

- Émission d'un résultat de > 200 colonies atypiques, aucun résultat pour les coliformes totaux et 0 UFC/100 ml pour *E. coli*. Il s'agit d'un résultat hors-norme. Le laboratoire doit transmettre immédiatement les résultats à l'exploitant et dans les meilleurs délais possibles pendant les heures ouvrables à la direction régionale et à la Direction de santé publique.

Un résultat > 200 colonies atypiques par 100 ml avec présence d'au moins une colonie d'*E. coli* : il y a présence de plus de 200 colonies atypiques et une absence de confluence.

- Émission d'un résultat > 200 colonies atypiques, aucun résultat de coliformes totaux et inscription du nombre de colonies observées par UFC/100 ml pour *E. coli*. Il s'agit d'un résultat hors norme pour *E. coli*, eau non potable. Le résultat doit être transmis immédiatement par téléphone à l'exploitant, à la direction régionale, au ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation (MAPAQ) et à la Direction de santé publique.

Un résultat TNI (colonies trop nombreuses pour être identifiées) : il y a présence d'un tapis de colonies non différenciées et d'aucune colonie d'*E. coli*. Il y a confluence importante.

- Émission d'un résultat TNI pour les coliformes totaux et *E. coli*. Il s'agit d'un résultat hors norme pour *E. coli*, eau non potable. Le résultat doit être transmis immédiatement par téléphone à l'exploitant, à la direction régionale, la Direction de santé publique et au MAPAQ.

Résultats TNI (colonies trop nombreuses pour être identifiées) : il y a présence d'un tapis de colonies non différenciées et de colonies d'*E. coli*. Il y a confluence importante.

- Émission d'un résultat TNI pour les coliformes totaux et pour *E. coli*. Inscrire le nombre de colonies observées. Il s'agit d'un résultat hors norme pour *E. coli*, eau non potable. Le résultat doit être transmis immédiatement par téléphone à l'exploitant, à la direction régionale, à la Direction de santé publique et au MAPAQ.

2) Pour les petits réseaux ou les puits individuels

Bien que les propriétaires de petits réseaux et de puits individuels ne soient pas assujettis à la majorité des prescriptions du Règlement sur la qualité de l'eau potable, selon l'article 3, l'eau destinée à la consommation humaine doit, lorsqu'elle est mise à la disposition des utilisateurs, satisfaire aux normes de qualité de l'eau potable. Ces normes sont définies dans l'annexe 1 du Règlement.

La présente section définit les exigences de suivi applicable à ce type de système en présence d'une contamination microbiologique qui ne respecte pas les normes du Règlement.

Présence d'organismes d'origine fécale

Une eau destinée à la consommation humaine doit être exempte d'organismes pathogènes et d'organismes indicateurs d'une contamination d'origine fécale, tels que des bactéries coliformes fécales, des bactéries *Escherichia coli*, des bactéries entérocoques et des virus coliphages F-spécifiques.

Dans le cas où cette eau s'avère contaminée par des organismes pathogènes ou recèle la présence d'organismes indicateurs de contamination d'origine fécale, il s'agit d'une eau non potable. Le laboratoire doit immédiatement prévenir le client que l'eau analysée est impropre à la consommation et que cette eau ne doit être consommée qu'après avoir été bouillie durant une minute. Des mesures correctives doivent également être apportées au système de captage de l'eau.

Présence d'autres organismes

Une eau destinée à la consommation ne doit pas contenir plus de 10 coliformes totaux par 100 ml d'eau prélevée, plus de 200 colonies atypiques par membrane. Elle ne doit pas non plus contenir des bactéries en quantité telle que celles-ci ne peuvent être ni identifiées ni dénombrées. Ces normes de qualité s'appliquent essentiellement lorsqu'une technique de dénombrement par membrane est utilisée.

Dans un tel cas, conformément aux dispositions du Règlement, cette eau ne respecte pas la norme mais l'avis d'ébullition n'est pas obligatoire. Face à une telle situation, le laboratoire doit suggérer de procéder à une désinfection, d'évaluer les sources de contamination et de procéder à un nouvel échantillonnage.

**Développement durable,
Environnement et Lutte
contre les changements
climatiques**

Québec 