

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

**LIGNES DIRECTRICES CONCERNANT
LES TRAVAUX ANALYTIQUES EN
MICROBIOLOGIE DE L'AIR**

DR-12-SCA-08

Édition : 6 mai 2013

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

ou communiquer avec nous :

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

Complexe scientifique
2700, rue Einstein, bureau E-2-220
Québec (Québec) G1P 3W8

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

Référence à citer :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie de l'air*, DR-12-SCA-08, Québec, Ministère du développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, 2013.

Dépôt légal – Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2013

ISBN-978-2-550-67823-6 (PDF)
ISBN 978-2-550-56189-7 (PDF), Édition précédente

© Gouvernement du Québec, 2013

AVANT-PROPOS

Ce document s'adresse à tous les laboratoires accrédités en microbiologie de l'air. Il précise les lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie de l'air, lesquelles sont passées en revue lors de l'évaluation sur site des procédures de contrôle de la qualité effectuée à l'intérieur 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 de conformité. Le laboratoire doit, par la suite, soumettre un rapport de correction des éléments non conformes établis lors de l'évaluation sur site et démontrer l'application effective de son programme d'assurance et de contrôle de la qualité. Des éléments supplémentaires touchant les bonnes pratiques de laboratoire peuvent faire l'objet de non-conformités lors des évaluations sur site. Le suivi apporté à ces éléments doit être le même que celui prévu aux non-conformités soulevées dans le 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)	7
1.1 Aménagement	7
1.2 Propreté.....	7
1.3 Conditions ambiantes.....	7
1.4 Qualité de l'environnement	8
2. MATÉRIEL ET RÉACTIFS (sections 4.6 et 5.9)	9
2.1 Verrerie et autres éléments.....	9
2.2 Milieux de culture et réactifs	9
2.3 Eau d'extraction ou de dilution.....	10
2.4 Eau déminéralisée ou distillée	10
2.5 Souches de contrôle et de référence.....	11
2.6 Réactifs de confirmation et d'identification	12
3. ÉQUIPEMENT (sections 5.5 et 5.6)	13
3.1 Système d'inventaire de l'équipement.....	13
3.2 Autoclave.....	13
3.3 Incubateurs et bains-marie	14
3.4 Réfrigérateurs	14
3.5 Thermomètres	15
3.6 Hotte biologique et lampes U.V.	15
3.7 pH-mètre	15
3.8 Balances.....	16
3.9 Micropipettes	16
3.10 Microscope et stéréomicroscope.....	16
4. MÉTHODES D'ANALYSE (sections 5.4 et 5.9)	17
4.1 Calendrier des contrôles de la qualité	17
4.2 Assurance et contrôle de la qualité – Méthode d'analyse.....	17
4.3 Vérification et suivi de la performance des méthodes utilisées	18
5. TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (sections 5.8 et 5.10)	19
5.1 Échantillonnage et conservation des échantillons.....	19
5.2 Demande d'analyse et enregistrement des échantillons par le laboratoire	19
5.3 Feuilles de travail.....	20
5.4 Rapport d'analyse	20
5.5 Transcription et suivi des données pour les échantillons.....	21
RÉFÉRENCES	23
BIBLIOGRAPHIE	23

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, de microbiologie et de 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;
- hotte biologique pour la manipulation des moisissures;
- 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, des tables de travail et de la hotte biologique. Le nom du désinfectant utilisé pour le nettoyage des surfaces de travail, de la hotte biologique 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. La température ambiante doit se situer entre 16 °C et 27 °C.

1.3.1 Température ambiante

Enregistrer la température du laboratoire principal une fois par jour, lorsque des travaux analytiques sont réalisés.

1.4 Qualité de l'environnement

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

1.4.1 Air ambiant

Vérifier mensuellement la qualité de l'air ambiant à l'aide d'un appareil volumétrique :

Qualité bactérienne (un résultat < 150 UFC/m³ est jugé satisfaisant)

Qualité mycologique (un résultat < 150 UFC/m³ est jugé satisfaisant)

1.4.2 Surfaces de travail

Vérifier aux trois mois la stérilité des surfaces de travail (incubateurs, espace de réception des échantillons, réfrigérateurs). Cependant, la stérilité des tables de travail et de la hotte biologique doivent être vérifiées mensuellement (un résultat < 25 UFC/25 cm² est jugé 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 Verrerie et autres éléments

La verrerie et les autres éléments 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 autres éléments doit être disponible.

2.1.1 Le laboratoire doit élaborer une instruction de lavage efficace pour ses diverses activités comprenant au moins les étapes suivantes : lavage au détergent, rinçage à l'eau chaude du robinet, dernier rinçage à l'eau distillée ou déminéralisée.

2.1.2 Pour le lavage à la main, le détergent utilisé doit être sans phosphate et de pH neutre.

2.1.3 Vérifier et enregistrer aux trimestres, et lorsque l'instruction de lavage ou le détergent sont changés, la présence de résidus inhibiteurs acides ou alcalins sur différents articles. Le cas échéant, la vérification doit être réalisée sur les contenants de prélèvement. Le résultat doit être à l'intérieur des limites acceptables soit entre 6,5 et 7,3, si le bleu de bromothymol est utilisé comme indicateur. La solution de bleu de bromothymol doit être conservée à l'abri de la lumière.

2.2 Milieux de culture et réactifs

Les milieux de culture déshydratés 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 de sa conformité aux critères des méthodes d'analyse. L'efficacité des nouveaux lots reçus doit être vérifiée par un test de sélectivité (s'il y a lieu) et de croissance.

Également, lors de chaque préparation de milieu de culture, la stérilité, le pH, la sélectivité et la croissance doivent être vérifiés et enregistrés. Les milieux réhydratés doivent être utilisés selon les délais acceptables prescrits dans les méthodes d'analyse.

2.2.1 Le laboratoire doit maintenir un inventaire à jour des milieux déshydratés et des réactifs. Le registre doit contenir au moins les renseignements suivants :

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

2.2.2 Vérifier et enregistrer la sélectivité et la croissance des nouveaux lots de milieux de culture à l'aide de souches de contrôle positives et négatives; enregistrer les résultats.

2.2.3 Le registre de la préparation des milieux de culture doit au moins contenir les renseignements suivants :

- identification du milieu de culture;
- date de préparation;
- date d'expiration de la préparation;
- numéro de lot;
- test de stérilité;
- test de sélectivité et de croissance ;
- pH final;
- initiales de l'analyste.

2.3 Eau d'extraction ou de dilution

2.3.1 La stérilité de chaque lot de bouteilles d'eau d'extraction ou de dilution doit être vérifiée et enregistrée. Le registre de la préparation de l'eau d'extraction ou de dilution doit au moins contenir les renseignements suivants :

- date de préparation;
- date d'expiration;
- numéro de lot;
- test de stérilité;
- initiales de l'analyste.

2.4 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, car la qualité des résultats d'analyse en dépend. Les résultats des contrôles doivent être disponibles dans le laboratoire de microbiologie.

2.4.1 Dénombrer et enregistrer sur une base mensuelle les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (un résultat d'eau fraîche < 1000 UFC/ml est jugé satisfaisant).

2.4.2 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 dans le laboratoire.

2.4.3 Vérifier les paramètres suivants selon les fréquences établies et enregistrer les résultats :

PARAMÈTRE	FRÉQUENCE	RÉSULTATS ATTENDUS
Conductivité	1/semaine	< 2 µmhos/cm à 25 °C
pH ⁽¹⁾	1/semaine	5,5 - 7,5
Chlore résiduel	1/mois	< 0,1 mg/l
Carbone organique total	1/6 mois ⁽²⁾	< 1 mg/l
Métaux ⁽³⁾	1/année ⁽²⁾	< 0,05 mg/l individuel
Métaux totaux ⁽⁴⁾	1/année ⁽²⁾	< 0,1 mg/l
Azote ammoniacal	1/6 mois	< 0,1 mg/l

(1) Lorsque la conductivité de l'eau est inférieure à 1 µmho/cm à 25 °C, la mesure du pH peut être problématique.

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

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

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

Si les analyses de carbone organique total, des métaux et de l'azote ammoniacal sont réalisées à l'interne, l'usage de l'eau provenant du même système d'eau distillée ou déminéralisée à titre de blanc d'analyse est à éviter. Les analyses de carbone organique total, des métaux et de l'azote ammoniacal doivent être réalisées dans un laboratoire accrédité.

2.5 Souches de contrôle et de référence

2.5.1 Souches de contrôle

Les souches de contrôle sont utilisées, entre autres choses, 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.

- 2.5.1.1 Le laboratoire doit posséder une liste à jour des souches de contrôle disponibles.
- 2.5.1.2 Le laboratoire doit avoir une instruction de conservation et de manipulation des souches de contrôle permettant de maintenir leur intégrité et d'éviter toute mauvaise utilisation. Il doit enregistrer les résultats relatifs à l'application de cette instruction.
- 2.5.1.3 Le laboratoire doit avoir une instruction pour assurer la vérification des caractères phénotypiques et de l'activité biochimique des souches de contrôle pour chaque nouvelle culture d'une souche à partir d'un disque *bactrol*[®], d'un *culti-loop*[®], d'un « cryobille », d'une décongélation, etc. Au minimum, il doit en assurer la vérification une fois par année. Il doit enregistrer les résultats relatifs à l'application de cette instruction.

2.5.2 *Souches de référence*

Les souches de référence sont utilisées, entre autres choses, pour la formation du personnel technique; elles servent également comme référence pour l'identification des colonies. 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 de vérifier périodiquement les caractères phénotypiques et l'activité biochimique.

- 2.5.2.1 Le laboratoire doit posséder une liste à jour des souches de référence disponibles.
- 2.5.2.2 Le laboratoire doit avoir une instruction de conservation et de manipulation des souches de contrôle permettant de maintenir leur intégrité et d'éviter toute mauvaise utilisation. Le laboratoire doit enregistrer les résultats relatifs à l'application de cette instruction.
- 2.5.2.3 Le laboratoire doit avoir une instruction pour assurer la vérification des caractères phénotypiques et de l'activité biochimique des souches de contrôle. Il doit également enregistrer les résultats relatifs à l'application de cette instruction.

2.6 Réactifs de confirmation et d'identification

Tous les réactifs utilisés pour la confirmation et l'identification des colonies doivent être contrôlés à la réception et périodiquement selon l'utilisation du réactif. Les résultats de ces contrôles doivent être enregistrés.

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

3. ÉQUIPEMENT (sections 5.5 et 5.6)

L'équipement de laboratoire doit être en bon état et conforme aux méthodes d'analyse utilisées. Chaque équipement 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 par écrit. Les instructions du fabricant, si elles sont disponibles, doivent être accessibles dans le laboratoire même. Les instruments et l'équipement défectueux ou non performant sont retirés et clairement identifiés jusqu'à la résolution du problème. De façon générale, tout l'équipement doit satisfaire aux spécifications du fabricant. Des instructions concernant l'utilisation et l'entretien de l'équipement doivent être disponibles et le personnel doit être formé pour l'utiliser adéquatement.

3.1 Système d'inventaire de l'équipement

Le registre d'inventaire de l'équipement indiqué dans cette section doit contenir au moins les renseignements suivants :

- 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, remis en état de fonctionnement);
- date de la mise en service.

3.2 Autoclave

Pour chaque cycle de stérilisation, il faut s'assurer que l'autoclave atteint et maintient la bonne température (121 °C) et la bonne pression interne. Pour préserver la qualité des milieux et des 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, enregistrer les renseignements suivants :

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

3.2.2 Vérifier le bon fonctionnement et l'efficacité de stérilisation de l'autoclave mensuellement avec un indicateur biologique et enregistrer les résultats.

3.3 Incubateurs et bains-marie

Les unités d'incubation 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 à l'intérieur et baignent dans l'eau ou le glycérol (ne s'applique pas au système de suivi en temps réel). Le taux d'humidité des incubateurs doit être vérifié à l'aide d'un hygromètre placé à l'intérieur (environ 30 à 40 %).

Le laboratoire doit enregistrer la température des incubateurs et des bains-marie en avant-midi et en après-midi, chaque jour d'utilisation ou au moins deux fois par jour, à des intervalles de lecture d'au moins 4 heures. Les températures doivent se situer dans les intervalles prescrits aux protocoles analytiques.

Les incubateurs et les bains-marie doivent être contrôlés au moins une fois l'an pour s'assurer de leur efficacité à maintenir une température d'incubation 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 d'incubation. Le laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité qui respecte les exigences des méthodes d'analyse.

3.3.1 Nettoyer les unités d'incubation régulièrement.

3.3.2 Déterminer le niveau de contamination des unités d'incubation selon la fréquence spécifiée à la section 1.4.2.

3.3.3 Enregistrer la température des unités d'incubation deux fois par jour.

3.3.4 S'assurer de la présence d'un hygromètre dans les incubateurs. Enregistrer une fois par jour le taux d'humidité de l'incubateur.

3.3.5 Enregistrer les résultats des vérifications annuelles de l'efficacité des incubateurs.

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 disposé, de façon à éviter les risques de contamination croisée (eau de dilution versus échantillons contaminés, etc.). Le matériel périssable doit porter une date d'expiration. Il faut s'assurer que le contrôle 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 le glycérol. La température doit être enregistrée au moins une fois par jour.

- 3.4.1 Nettoyer les réfrigérateurs périodiquement et éliminer le matériel périmé.
- 3.4.2 Déterminer le niveau de contamination selon la fréquence spécifiée à la section 1.4.2.
- 3.4.3 Enregistrer la température des réfrigérateurs une fois par jour.

3.5 Thermomètres

La graduation des thermomètres ou des appareils enregistreurs de température, pour les unités d'incubation, ne doit pas excéder 1°C selon la méthode analytique utilisée. La colonne de mercure des thermomètres doit être continue. Les thermomètres du laboratoire sont vérifiés annuellement avec un thermomètre de référence (précision de $\pm 0,1$ °C). Ce thermomètre 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. Le laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité qui respecte les exigences des méthodes d'analyse.

- 3.5.1 La vérification des thermomètres du laboratoire est enregistrée annuellement.
- 3.5.2 S'assurer que la précision des thermomètres est conforme aux exigences de l'analyse.

3.6 Hotte biologique et lampes U.V.

La hotte doit être propre et en bon état de fonctionnement. Le niveau de contamination des surfaces de travail doit être inférieur à la limite spécifiée à la section 1.4.2 du présent document. Pour chaque utilisation, on doit s'assurer que le débit d'air de la hotte est suffisant. Au besoin, nettoyer la surface des lampes U.V. avec un linge humide et assécher. Annuellement, **le fonctionnement adéquat de** la hotte doit être **certifié** par une firme externe **reconnue**.

- 3.6.1 Vérifier, **avant** chaque utilisation, **la pression** de la hotte et enregistrer les résultats. **La pression doit demeurer stable.**
- 3.6.2 Faire certifier **la pression** et vérifier les lampes U.V. de la hotte annuellement par une firme externe **ou changer la lampe UV après le nombre d'heures d'utilisation recommandée par le fabricant.**

3.7 pH-mètre

Le pH-mètre doit détecter des variations de 0,1 unité de pH ou moins. Pour chaque utilisation, on doit vérifier si l'électrode est saturée d'électrolyte et étalonner l'appareil à l'aide de deux tampons différents 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 doit être également disponible.

3.7.1 S'assurer de la disponibilité d'une instruction d'étalonnage du pH et inscrire dans un registre chaque semaine, ou à l'utilisation, la valeur de la pente et la date de la vérification.

3.8 Balances

Pour chaque jour d'utilisation d'une balance, on doit s'assurer qu'elle est de niveau et qu'elle est exempte de poussière. Les balances doivent être placées à l'abri de courants d'air, dans un endroit peu fréquenté du laboratoire et sur une table à l'épreuve des vibrations. La balance doit être d'une précision d'un minimum de $\pm 0,1$ g. Le calibrage de la balance est vérifié aux trois mois à l'aide d'un assortiment de poids de référence. Ces poids doivent être étalonnés 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. Si l'étalonnage de la balance est effectué par une firme externe, celle-ci doit être accréditée par un organisme reconnu. Cet étalonnage ne remplace pas le besoin de vérifier le calibrage sur une base trimestrielle.

3.8.1 Vérifier le calibrage de la balance trimestriellement à l'aide d'un assortiment de poids de référence étalonnés par un organisme reconnu et enregistrer la vérification.

3.9 Micropipettes

Les micropipettes utilisées pour les analyses doivent être étalonnées annuellement. La méthode d'étalonnage doit fournir des critères d'acceptabilité qui respectent les exigences des méthodes.

3.9.1 Vérifier l'étalonnage des micropipettes annuellement et enregistrer la vérification.

3.10 Microscope et stéréomicroscope

Le laboratoire doit posséder un microscope ayant un objectif de pouvoir grossissant de 100X (N.A. 1.25). Il doit être en bon état de fonctionnement et être ajusté quotidiennement. Lorsque le contraste de phase est requis, le laboratoire doit procéder au centrage des anneaux régulièrement.

Il doit aussi posséder un stéréomicroscope.

3.10.1 S'assurer de la disponibilité d'une instruction pour le centrage des anneaux du contraste de phase.

3.10.2 S'assurer de la disponibilité d'une instruction pour le calibrage des réticules.

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 pour effectuer les différentes opérations de vérification décrites dans ce document. Le calendrier peut contenir la liste des contrôles, leur fréquence d'application et les initiales des analystes. Ce calendrier est affiché dans le laboratoire, à la vue du personnel.

4.2 Assurance et contrôle de la qualité – Méthode d'analyse

4.2.1 Méthodes d'extraction – Blanc d'analyse

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

4.2.1.1 Effectuer un blanc de méthode analytique pour chaque série et enregistrer clairement le résultat sur la feuille de travail.

4.2.1.2 S'assurer que le blanc de méthode analytique tient compte des paramètres analysés. Enregistrer le milieu de culture utilisé pour le blanc de méthode analytique.

4.2.2 Contrôle de la qualité sur les méthodes de dénombrement et identification des colonies

Pour assurer une fiabilité des résultats de dénombrement et d'identification des colonies, le laboratoire doit mettre en place des contrôles de la qualité pour uniformiser le travail des techniciens et s'assurer de la qualité de leur travail. Le laboratoire doit effectuer des lectures de dénombrement et d'identification en duplicata pour une proportion de 5 % des analyses. Il doit aussi effectuer des comparaisons inter-techniciens selon la même fréquence.

4.2.2.1 Effectuer le dénombrement et l'identification en duplicata pour 5 % des analyses (même analyste) pour chaque type de paramètres et enregistrer les résultats.

4.2.2.2 Effectuer une comparaison inter-techniciens pour le dénombrement et l'identification pour 5 % des analyses pour chaque type de paramètres et enregistrer les résultats.

4.2.2.3 Établir le seuil d'acceptabilité pour chaque méthode et type d'analyse.

4.2.2.4 Disposer de directives en cas de dépassement du seuil.

4.3 Vérification et suivi de la performance des méthodes utilisées

Dans le cadre du *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse (PALA)*, les laboratoires doivent utiliser des méthodes de référence normalisées provenant d'organismes reconnus (CEAEQ, IRSST, MOH, USEPA, Santé Canada, ISO, AFNOR, etc.). Ils doivent effectuer une vérification des méthodes au laboratoire avant de les utiliser.

Lorsque les méthodes sont utilisées au laboratoire, elles doivent faire l'objet d'un suivi en continu à l'aide des contrôles de la qualité. 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.

4.3.1 *Vérification d'une nouvelle méthode préalable à l'implantation au laboratoire (demande d'accréditation ou extension de portée)*

Le laboratoire doit effectuer une évaluation de la nouvelle méthode en analysant vingt échantillons positifs différents ou plus, comprenant chaque matrice analysée à l'aide de cette méthode. Les échantillons utilisés doivent être, autant que possible, semblables aux échantillons qui sont analysés de routine à l'aide de cette méthode.

4.3.2 *Évaluation et suivi de la compétence des analystes*

La compétence des analystes doit être évaluée avant de les autoriser à réaliser une méthode donnée. Un suivi de la compétence est effectué annuellement à l'aide des résultats obtenus lors des analyses de duplicata en cours d'année, selon 4.2.2. Des critères d'acceptabilité doivent être établis pour chacune des méthodes.

4.3.3 *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.

4.3.4 *Vérification des méthodes utilisées*

Les méthodes d'analyse employées doivent être connues et assimilées par les utilisateurs. **Les exigences minimales liées à la méthode d'analyse des légionelles par culture se retrouvent à l'annexe I.**

Les évaluateurs doivent vérifier sur place la connaissance des différentes méthodes d'analyse.

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 de façon que la direction du laboratoire puisse démontrer que ses activités sont contrôlées. Le laboratoire doit avoir un système défini par écrit permettant d'identifier de façon unique les échantillons à analyser, de sorte qu'il n'y ait confusion à aucun moment sur l'identité des échantillons. Si un système électronique est utilisé, le laboratoire doit enregistrer la même information que celle exigée dans la présente section. Tous les enregistrements manuscrits doivent être 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 le matériel d'échantillonnage (s'il y a lieu).

Tous les échantillons **nécessitant une culture** doivent parvenir au laboratoire moins de 48 heures après le prélèvement et être **protégés des extrêmes de température. Les agents réfrigérants ne doivent pas entrer en contact avec les géloses et les échantillons liquides.**

Pour les échantillons d'eau prélevés, ceux-ci doivent parvenir dans des contenants de prélèvement ayant du thiosulfate de sodium à la concentration précisée dans les méthodes d'analyse.

Lors de la réception d'échantillons, le laboratoire doit s'assurer que ces derniers sont conformes aux exigences suivantes :

- 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 échantillons qui parviennent dans des contenants non conformes ou endommagés sont rejetés.

5.1.1 Enregistrer les raisons liées au rejet des échantillons non conformes

5.2 Demande d'analyse et enregistrement des échantillons par le 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 minimaux suivants doivent être disponibles sur support papier ou informatique :

- date du prélèvement;
- identification de l'échantillon;
- identification du point de prélèvement (facultatif);
- identification du préleveur et adresse;
- identification du client*;
- nature de l'échantillon;
- état de l'échantillon à la réception;
- paramètres demandés;
- date de réception;
- numéro de projet (s'il y a lieu);
- numéro de l'échantillon (s'il y a lieu);
- numéro de laboratoire;
- nombre de contenants (s'il y a lieu);
- commentaires appropriés.

5.3 Feuilles de travail

Les feuilles de travail doivent au moins contenir les renseignements suivants, inscrits à l'encre :

- numéro de l'échantillon;
- paramètres analysés;
- date de l'analyse;
- blanc d'analyse;
- résultats des contrôles positifs (s'il y a lieu);
- numéros de lot de préparation des milieux de culture et de l'eau d'extraction ou de dilution;
- numéro de l'unité d'incubation utilisée (si plus d'une unité disponible);
- résultats d'analyse;
- résultats analytiques accompagnés des unités pertinentes;
- initiales de l'analyste;
- initiales de la personne qui vérifie l'exactitude des calculs effectués.

5.4 Rapport d'analyse

Le rapport d'analyse doit au moins contenir les renseignements suivants, en référence à la disposition 5.10 de la section III du Programme d'accréditation :

- un titre (par exemple « Rapport d'analyse »);
- 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'analyse (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 réception de l'échantillon et la date de l'analyse;
- l'identification de la méthode employée;
- toute divergence, tout ajout ou toute suppression par rapport à la méthode d'analyse utilisée;
- **les volumes d'air ou de liquide si nécessaire;**
- les résultats des analyses, accompagnés des unités pertinentes;
- la signature du rapport par le superviseur ou par un signataire autorisé et la date d'émission;
- **la limite de détection;**
- la date de l'échantillonnage.

5.5 Transcription et suivi des données pour les échantillons

Les évaluateurs retraceront une série d'échantillons par domaine d'accréditation pendant la visite d'audit et ils vérifieront les éléments suivants :

- numéro de l'échantillon dans le registre d'entrée;
- date de prélèvement;
- date de réception;
- date d'analyse;
- paramètres demandés;
- données brutes de la feuille de travail;
- témoins de stérilité, contrôles positifs (s'il y a lieu);
- contrôle de la qualité – milieux de culture et réactifs;
- contrôle de la qualité – eau d'extraction ou de dilution (s'il y a lieu);
- contrôle de la qualité – eau déminéralisée;
- calculs des résultats d'analyse;
- températures d'incubation;
- rapport d'analyse.

RÉFÉRENCES

- (1) CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse : Normes et exigences*, DR-12-PALA, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2013, Édition courante.
- (2) Règlement modifiant le Code de sécurité. Loi sur le bâtiment (RLRQ, chapitre B-1.1, a. 175, 176.1, 185, par. 33° et 38° et a.192)

BIBLIOGRAPHIE

- APHA-AWWA-WPCF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21^e édition, Washington D.C., 2005.
- Botton, B. *Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle*, Paris, Masson, 1985, 364 p.
- Domsch, K. H., W. Gaus et T. N. Anderson. *Compendium of Soil Fungi*, vol. 1 et 2, IHW, Verlag, 1993, 860 p. et 406 p.
- Hoog, G. S. et J. Guarro. *Atlas of Clinical Fungi*, Netherland, CBS, 1995, 720 p.
- INSTITUT DE RECHERCHE ROBERT-SAUVÉ EN SANTÉ ET EN SÉCURITÉ DU TRAVAIL. *Méthode analytique – Méthode d'échantillonnage et d'identification de bactéries et de moisissures par la méthode des prélèvements de surface*, MA-343, 2009.
- INSTITUT DE RECHERCHE ROBERT-SAUVÉ EN SANTÉ ET EN SÉCURITÉ DU TRAVAIL. *Méthode analytique – Caractérisation et dénombrement des spores de moisissures prélevées par impaction sur cassette*, MA-367, 2008.
- INSTITUT DE RECHERCHE ROBERT-SAUVÉ EN SANTÉ ET EN SÉCURITÉ DU TRAVAIL. *Méthode analytique – Identification des bactéries cultivables*, MA-341, 2009.
- INSTITUT DE RECHERCHE ROBERT-SAUVÉ EN SANTÉ ET EN SÉCURITÉ DU TRAVAIL. *Méthode analytique – Identification des moisissures cultivables*, MA-340, 2008.
- INSTITUT DE RECHERCHE ROBERT-SAUVÉ EN SANTÉ ET EN SÉCURITÉ DU TRAVAIL. *Méthode analytique – Évaluation des bactéries et moisissures viables dans des matrices solides ou liquides*. MA-342, 2008.
- INSTITUT DE RECHERCHE ROBERT-SAUVÉ EN SANTÉ ET EN SÉCURITÉ DU TRAVAIL. *Méthode analytique – Évaluation de structures mycologiques par examen microscopique*, MA-360, 2008.

INSTITUT DE RECHERCHE ROBERT-SAUVÉ EN SANTÉ ET EN SÉCURITÉ DU TRAVAIL. *Méthode analytique – Dénombrement et identification des bactéries et des moisissures viables*, MA-264-1, 1998.

Klich, M. A. et J. I. Pitt. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorph*, 1994, 115 p.

Larone, D. H. *Medically Important Fungi – A Guide to Identification*, New York, Elsevier, 1987, 230 p.

Nelson, P. E., T. A. Toussan et F. O. Marasas. *Fusarium Species, An Illustrated Manual for Identification*, The Pennsylvania State University Press, 1983, 193 p.

Pitt, J. I. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, 2^e édition, 1988, 187 p.

Raper, K. B., D. I. Fennell et P. K. C. Austwick. *The Genus Aspergillus*, Florida, Robert E. Hrieger Publishing Company, 1965, 686 p.

Samson, R. A., E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad et O. Filtenborg. *Introduction to Food-borne Fungi*, 4^e édition, 1995, 322 p.

St-Germain, G. et R. Summerbell. *Champignons filamenteux d'intérêt médical*, California, STAR, 1996, 314 p.

Wang, C. J. et R. A. Zabel. *Identification Manual for Fungi from Utility Poles in the Eastern US*, Kansas, ATCC, 1990, 356 p.

Annexe I

Exigences minimales de la méthode d'analyse de *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila* par culture

La méthode d'analyse choisie par le laboratoire doit comprendre les spécifications suivantes :

- La limite de détection calculée de *L. pneumophila* de la méthode en culture doit être égale ou inférieure à 5000 UFC/l;
- Au moins un traitement (acide ou thermique) limitant la flore interférente doit être disponible dans la méthode;
- Les colonies de légionelles doivent être confirmées par une méthode reconnue :
 - Le laboratoire doit posséder la liste validée par le fournisseur des espèces de légionelles identifiées par le test de confirmation utilisé;
 - *L. pneumophila* doit être identifié par le test choisi;
 - Pour *Legionella spp.*, les colonies croissant avec cystéine et inhibées sans cystéine doivent au moins être confirmées par un Gram (montage humide) ou par PCR.
- L'incubation peut s'effectuer avec ou sans CO₂;
- Les milieux d'isolement primaire doivent provenir de méthodes de référence et au moins un de ces milieux doit être sélectif avec antibiotiques;
- La méthode doit limiter au maximum les résultats du type «*Présence de flore interférente empêchant la détection des légionelles*».

Des contrôles de la qualité supplémentaires sont également exigés :

- Au moins un contrôle positif doit être effectué par série d'échantillons, en plus des autres contrôles demandés à la section 4 du présent document. Ce contrôle doit suivre les étapes du protocole analytique appliquées aux échantillons.

Le rapport d'analyse doit contenir les renseignements suivants en plus des éléments requis à la section 5.4 du présent document :

- Les résultats de *Legionella spp.* et de *L. pneumophila*;
- La présence de flore interférente.

Ces exigences sont en accord avec le document accompagnant le [Règlement modifiant le Code de sécurité intégrant des dispositions relatives à l'entretien des tours de refroidissement à l'eau](#) de la Régie du bâtiment du Québec⁽²⁾.

