

Programme
d'accréditation
des laboratoires
d'analyse
environnementale



**LIGNES DIRECTRICES CONCERNANT
L'APPLICATION DES CONTRÔLES
DE LA QUALITÉ
EN MICROBIOLOGIE**

**DR-12-SCA-02
Édition : 2002-04-01**

Pour information, vous pouvez communiquer avec

Le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

Téléphone : (418) 643-1301

Télécopieur : (418) 528-1091

Courriel : ceaeq@menv.gouv.qc.ca

Internet : www.menv.gouv.qc.ca/ceaeq

ISBN 2-550-39059-8

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Québec, 2002

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Canada, 2002

ENVIRODOQ : ENV/2002/0089

AVANT-PROPOS

Le présent document s'adresse à tous les laboratoires de microbiologie accrédités par le ministère de l'Environnement du Québec. Il précise les lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie. Ces lignes directrices sont passées en revue lors de l'audit des procédures de contrôle de la qualité effectué dans le cadre du Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse environnementale.

Tous les éléments dont il est question dans ce document sont vérifiés au cours de l'audit et ils 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'audit et démontrer l'application effective de son programme d'assurance et de contrôle de la qualité.

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 environnementale* » est indiquée entre parenthèses au début de chacune des sections.

TABLE DES MATIÈRES

1	LOCAUX ET ENVIRONNEMENT (SECTION 5.3)	7
1.1	AMÉNAGEMENT	7
1.2	SÉCURITÉ	7
1.3	PROPRETÉ	7
1.4	CONDITIONS AMBIANTES	8
1.5	QUALITÉ DE L'ENVIRONNEMENT	8
2	MATÉRIEL ET RÉACTIFS (SECTIONS 4.6 ET 5.9)	9
2.1	MEMBRANES FILTRANTES	9
2.2	TAMPONS ABSORBANTS	9
2.3	VERRERIE ET AUTRES ÉLÉMENTS	9
2.4	MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	10
2.5	EAU DE RINÇAGE OU DE DILUTION	11
2.6	EAU DÉMINÉRALISÉE OU DISTILLÉE	11
2.7	CONTENANTS DE PRÉLÈVEMENT	12
2.8	SOUCHES DE CONTRÔLE	13
2.9	RÉACTIFS DE CONFIRMATION ET D'IDENTIFICATION	13
3	ÉQUIPEMENTS (SECTIONS 5.5 ET 5.6)	15
3.1	SYSTÈME D'INVENTAIRE DES ÉQUIPEMENTS	15
3.2	AUTOCLAVE	15
3.3	INCUBATEURS ET BAINS-MARIE	15
3.4	RÉFRIGÉRATEURS	16
3.5	THERMOMÈTRES	16
3.6	ÉQUIPEMENTS DE FILTRATION	17
3.7	STÉRILISATEURS U.V. POUR DÉSINFECTION DES ÉQUIPEMENTS DE FILTRATION	17
3.8	PH-MÈTRE	17
3.9	BALANCES	18
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	CONTRÔLE DE LA MÉTHODE D'ANALYSE	19
4.4	VÉRIFICATION DES MÉTHODES UTILISÉES	21
4.5	CONFORMITÉ RÉGLEMENTAIRE	21
5	TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (SECTIONS 5.8 ET 5.10)	23
5.1	ÉCHANTILLONNAGE ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	23
5.2	DEMANDE D'ANALYSE ET ENREGISTREMENT DES ÉCHANTILLONS AU LABORATOIRE	23
5.3	FEUILLE DE TRAVAIL	24
5.4	REGISTRE DE CONFIRMATION	24
5.5	RAPPORT D'ANALYSE	24
5.6	TRANSCRIPTION ET SUIVI DES DONNÉES POUR LES ÉCHANTILLONS	25
	BIBLIOGRAPHIE	27
	ANNEXE I	29
	ANNEXE II	31

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 d'analyse.

1.2 Sécurité

La sécurité doit être une priorité dans les opérations quotidiennes du laboratoire. Ce dernier doit être pourvu des équipements de sécurité nécessaires et se conformer à un programme de prévention en milieu de travail, afin de minimiser les risques.

Le laboratoire doit s'assurer que les équipements de sécurité suivants sont disponibles et fonctionnels :

- extincteur;
- trousse de premiers soins;
- fontaine oculaire;
- système de détection de chaleur ou de fumée.

1.3 Propreté

La propreté des équipements, 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 tables de travail doit être d'une efficacité suffisante pour détruire un large spectre de microorganismes et il doit être changé périodiquement.

1.3.1 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 doit être indiqué sur ce calendrier.

1.4 Conditions ambiantes

Des conditions de température particulières sont nécessaires pour assurer le bon fonctionnement de certains équipements, comme les incubateurs et les bains-marie. La température ambiante doit se situer entre 16 °C et 27 °C.

1.4.1 Température ambiante

Enregistrer la température du laboratoire principal une fois par jour ouvrable.

1.5 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.

1.5.1 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 UFC/1000 cm² est jugé satisfaisant).

1.5.2 Surfaces de travail

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

2.1 Membranes filtrantes

Le laboratoire doit exercer des contrôles sur les nouveaux lots de membranes filtrantes utilisés. Il est recommandé de vérifier la présence des caractéristiques suivantes : 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; enregistrer les données obtenues.
- 2.1.3 Mesurer et enregistrer le pourcentage de récupération des membranes filtrantes. Il doit être supérieur à 80 %.

2.2 Tampons absorbants

Les tampons absorbants, que certains laboratoires utilisent dans la technique de la membrane filtrante, doivent être évalués.

- 2.2.1 Vérifier la capacité d'absorption, l'absence de région hydrophobe et l'acidité totale libérée des nouveaux lots de tampons absorbants; enregistrer les résultats.

2.3 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.

- 2.3.1 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.
- 2.3.2 Pour le lavage à la main, le détergent utilisé doit être sans phosphate et de pH neutre.
- 2.3.3 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 incluant la verrerie et 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.

2.4 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 une mesure du pourcentage de récupération et par un test de sélectivité (s'il y a lieu). Ces contrôles doivent être répétés après six mois d'utilisation si le contenant de milieu de culture en utilisation n'est pas épuisé.

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

Également, à chaque préparation de milieu de culture, la stérilité et le pH doivent être vérifiés et enregistrés. Les milieux réhydratés doivent être utilisés selon les délais acceptables prescrits dans les méthodes d'analyse (voir Annexe I).

2.4.1 Le laboratoire doit maintenir un inventaire à jour des produits 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.

2.4.2 Vérifier et enregistrer le pourcentage de récupération des nouveaux lots de milieux de culture; répéter après six mois si le contenant de milieu n'est pas épuisé. Vérifier également la sélectivité des milieux à l'aide de souches de contrôle positives et négatives; enregistrer les résultats.

2.4.3 Vérifier et enregistrer la sélectivité des nouveaux lots de substrat enzymatique à l'aide de souches de contrôle positive et négative ; enregistrer les résultats. Si le substrat enzymatique est utilisé dans le cadre d'une méthode de dénombrement (nombre le plus probable), le pourcentage de récupération de la méthode doit être vérifié et le résultat doit être enregistré.

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

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

2.5 Eau de rinçage ou de dilution

La stérilité de chaque lot de bouteilles d'eau de rinçage ou de dilution doit être vérifiée et enregistrée. Le pH de l'eau de rinçage ou de dilution doit satisfaire aux critères des méthodes d'analyse.

2.5.1 Le registre de la préparation de l'eau de rinçage ou de dilution doit au moins contenir les renseignements suivants :

- date de préparation;
- date d'expiration;
- numéro de lot;
- test de stérilité;
- pH;
- volume d'eau de dilution après stérilisation, lorsque requis;
- initiales de l'analyste.

2.6 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.

2.6.1 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).

2.6.2 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 au laboratoire.

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

PARAMÈTRE	FRÉQUENCE	RÉSULTATS ATTENDUS
Conductivité	1 / semaine	< 2 micromhos/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 micromhos/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).

2.7 Contenants de prélèvement

Les contenants de prélèvement doivent être capables de contenir un volume suffisant d'échantillon pour les tests requis. Ils doivent posséder une large ouverture et un bouchon adéquat. 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.

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. Les contenants pré-stérilisés obtenus d'un fabricant doivent être vérifiés pour la stérilité sur 2 % de l'ensemble des contenants d'un lot avant leur mise en circulation. Ces vérifications sont effectuées à l'aide d'un bouillon riche non sélectif.

Une date d'expiration de 120 jours doit être inscrite sur chaque contenant à moins que les contenants soient protégés par un sceau de sécurité (scellé). Un numéro de lot doit également être inscrit sur chacun des contenants.

Certains laboratoires ont recours à des pharmacies comme dépositaires de contenants de prélèvement (seules les pharmacies peuvent être utilisées à cette fin.). Lorsque des contenants sont en consigne, le laboratoire doit apposer un sceau de sécurité (scellé) sur les bouchons des contenants afin d'assurer aux clients l'intégrité et la stérilité des contenants et joindre une note avertissant ceux-ci de ne pas utiliser un contenant lorsque le sceau est brisé. 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.

2.7.1 Vérifier la stérilité des contenants de prélèvement et enregistrer les résultats. Identifier les lots de contenants placés en consigne dans une pharmacie.

2.7.2 Enregistrer la date d'expiration des contenants de prélèvement, s'il y a lieu.

2.8 Souches de contrôle

2.8.1 Le laboratoire doit posséder une liste à jour des souches de contrôle disponibles.

2.8.2 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. Enregistrer les résultats relatifs à l'application de cette instruction.

2.8.3 Le laboratoire doit avoir une instruction pour assurer la vérification des caractères phénotypiques et de l'activité biochimique des souches de contrôle entre chaque utilisation. Enregistrer les résultats relatifs à l'application de cette instruction.

2.9 Réactifs de confirmation et d'identification

Tous les réactifs utilisés pour la confirmation et l'identification des colonies doivent être contrôlés et les résultats de ces contrôles doivent être enregistrés.

3 ÉQUIPEMENTS (SECTIONS 5.5 ET 5.6)

Les équipements de laboratoire doivent être en bon état et conformes 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, sont rendues accessibles dans le laboratoire. Les instruments et équipements défectueux ou non performants sont retirés et clairement identifiés jusqu'à la résolution du problème. De façon générale, tous les équipements devraient satisfaire aux spécifications du manufacturier.

3.1 Système d'inventaire des équipements

Le registre d'inventaire des équipements 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;
- mauvais fonctionnements, modifications ou réparations de l'équipement.

3.2 Autoclave

À 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 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 incubateurs et bains-marie doivent être propres et en bon état de fonctionnement. Le niveau de contamination des incubateurs doit être inférieur à la limite spécifiée au point

1.5.2 du présent document. Pour les incubateurs, les thermomètres sont à l'intérieur et baignent dans l'eau ou le glycérol. Le taux d'humidité des incubateurs doit être vérifié à l'aide d'un hygromètre placé à l'intérieur.

Le laboratoire doit enregistrer les températures des incubateurs et 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 4 heures. Les températures doivent se situer dans les intervalles prescrits aux protocoles analytiques.

Les incubateurs et 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 laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité qui respecte les exigences des méthodes d'analyse.

3.3.1 Nettoyer les incubateurs et les bains-marie régulièrement.

3.3.2 Déterminer le niveau de contamination des incubateurs selon la fréquence spécifiée au point 1.5.2.

3.3.3 Enregistrer la température des incubateurs et bains-marie 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 et des bains-marie.

3.4 Réfrigérateurs

Les réfrigérateurs doivent être propres et le niveau de contamination doit être inférieur à la limite spécifiée au point 1.5.2 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 4 ± 2 °C. Les thermomètres, placés à l'intérieur, doivent être baignés dans l'eau ou du 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 au point 1.5.2.

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 0,2 °C ou 0,5 °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 à tous les trois ans 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 Équipements 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 aux six mois. Tout l'équipement de filtration (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 S'assurer du bon état et de la propreté des équipements de filtration.

3.6.2 S'assurer de la disponibilité de silicone au laboratoire, lorsque les entonnoirs de filtration sont en métal.

3.6.3 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.

3.7 Stérilisateurs U.V. pour désinfection des équipements 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. Au besoin, nettoyer la surface des réflecteurs et les lampes UV avec un linge humide et assécher.

3.7.1 Vérifier le bon fonctionnement des lampes hebdomadairement et enregistrer les résultats.

3.7.2 Effectuer les tests d'efficacité germicide deux fois par année et enregistrer les résultats. 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. À chaque utilisation, on doit vérifier si l'électrode est saturée d'électrolyte et étalonner l'appareil à l'aide de 2 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.

3.8.1 S'assurer de la disponibilité d'une instruction d'étalonnage du pH et inscrire hebdomadairement dans un registre la valeur de la pente et la date de vérification.

3.9 Balances

À chaque jour d'utilisation d'une balance, on doit s'assurer qu'elle est au 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 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 à tous les trois ans par un organisme reconnu. L'organisme doit pouvoir fournir un certificat d'étalonnage.

3.9.1 Vérifier le calibrage de la balance trimestriellement et enregistrer la vérification.

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 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 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 Pour la méthode de la membrane filtrantes, vérifier la stérilité de l'équipement de filtration avant chaque série de filtrations (1/10 échantillons) pour chacun des milieux de culture utilisés et enregistrer clairement le résultat sur la feuille de travail.

4.2.2 Pour les méthodes autres que la méthode de la membrane filtrante, vérifier la stérilité selon les prescriptions de la méthode d'analyse et enregistrer clairement les résultats sur la feuille de travail (ex. : tubes multiples avec substrats enzymatiques, présence/absence, incorporation à la gélose).

4.3 Contrôle de la méthode d'analyse

4.3.1 Méthodes par membranes filtrantes – milieu m-Endo

Pour tous les échantillons d'eau potable, le laboratoire doit confirmer les colonies typiques et atypiques sur le milieu utilisé pour le dénombrement des coliformes totaux. Les confirmations doivent être effectuées selon la fréquence prévue et les résultats notés dans un registre. En tout temps, la fréquence minimale de confirmation, sur le milieu utilisé pour le dénombrement des coliformes totaux, est de 5 colonies typiques par semaine.

4.3.1.1 Confirmer et enregistrer un minimum de 2 colonies atypiques pour les échantillons d'eau potable ayant une numération inférieure à 30 UFC par membrane pour les colonies atypiques. De plus, au moins 1 colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.

4.3.1.2 Confirmer et enregistrer 10 % des colonies atypiques jusqu'à concurrence de 5 colonies pour les échantillons d'eau potable ayant une numération supérieure à 30 UFC par membrane pour les colonies atypiques. De plus, au moins une colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.

4.3.1.3 Maintenir en tout temps la fréquence minimale hebdomadaire de confirmation de 5 colonies de coliformes totaux.

4.3.2 Méthodes par membranes filtrantes – milieu m-Fc

Pour tous les échantillons d'eau potable, le laboratoire doit confirmer les colonies atypiques sur le milieu utilisé pour le dénombrement des coliformes fécaux (en absence de colonie typique seulement). Les confirmations doivent être effectuées selon la fréquence prévue et les résultats notés dans un registre. Le laboratoire doit confirmer les colonies de coliformes fécaux selon la fréquence prévue et noter les résultats dans un registre.

- 4.3.2.1 Confirmer et enregistrer un minimum de 2 colonies atypiques pour les échantillons d'eau potable ayant une numération inférieure à 30 UFC par membrane pour les colonies atypiques. De plus, au moins 1 colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.
- 4.3.2.2 Confirmer et enregistrer 10 % des colonies atypiques jusqu'à concurrence de 5 colonies pour les échantillons d'eau potable ayant une numération supérieure à 30 UFC pour les colonies atypiques. De plus, au moins 1 colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.
- 4.3.2.3 Confirmer et enregistrer, sur une base mensuelle, 5 colonies de coliformes fécaux d'un ou plusieurs échantillons positifs ou à défaut, d'une souche pure d'*E. coli*.

4.3.3 Méthodes par membranes filtrantes –autres milieux

Le laboratoire doit posséder des moyens pour confirmer la présence de micro-organismes des paramètres Entérocoques, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, ou les identifier, s'il est accrédité pour analyser ces paramètres.

4.3.4 Autre méthodes

- 4.3.4.1 Vérifier la performance de la méthode de présence/absence par substrat enzymatique (coliformes totaux et *E. coli*), au minimum une fois par semaine, en utilisant 1 souche positive de coliformes totaux et 1 souche d'*E. coli* et enregistrer les résultats.
 - 4.3.4.1.1 Confirmer 1 échantillon positif ou à défaut, 1 souche positive, 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 enregistrer les résultats.
 - 4.3.4.1.2 Confirmer 1 échantillon positif ou à défaut, 1 souche positive, 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 enregistrer les résultats.
- 4.3.4.2 Les autres méthodes utilisées (tubes multiples ou nombre le plus probable) doivent être contrôlées au minimum une fois par semaine en utilisant 1 échantillon positif ou à défaut, une souche positive et les résultats doivent être consignés dans un registre.
 - 4.3.4.2.1 Confirmer 1 échantillon positif ou à défaut, 1 souche positive, au minimum une fois par semaine à l'aide d'un autre test et enregistrer les résultats.

4.4 Vérification des méthodes utilisées

Les méthodes d'analyse employées doivent être connues et assimilées par les utilisateurs.

4.4.1 Les auditeurs vérifieront sur place 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 au niveau des laboratoires accrédités. Les modalités d'interprétations relatives au *Règlement sur la qualité de l'eau potable* (2001) se retrouvent à l'Annexe II. En aucun temps, ces modalités ne remplacent celles du Règlement.

4.5.1 Les auditeurs 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 de façon que la direction du laboratoire puisse démontrer que ses opérations sont contrôlées. Le laboratoire doit avoir un système défini par écrit 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.

5.1 Échantillonnage et conservation des échantillons

Le responsable du laboratoire doit s'assurer que ses clients prélèvent adéquatement les échantillons d'eau pour les analyses microbiologiques. Un dépliant dans lequel est décrit 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.

5.1.1 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 minimaux suivants doivent être disponibles sur support papier ou informatique :

- date du prélèvement;
- identification de l'échantillon;
- identification du point de prélèvement;
- identification du préleveur et adresse;
- identification du client*;
- nature de l'échantillon;
- état de l'échantillon à la réception;
- paramètre(s) demandé(s);
- 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.

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

5.3 Feuille de travail

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

- numéro de l'échantillon;
- date de l'analyse;
- type d'eau analysé;
- volumes d'eau servant à l'analyse;
- résultats correspondant à chaque volume d'eau analysé;
- témoins de stérilité;
- numéro de lot des membranes;
- numéros de lot de préparation des milieux de culture et de l'eau de rinçage ou de dilution;
- 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'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 2001 :

- 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, 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 remplaçant autorisé et la date d'émission;
- la date de l'échantillonnage.

5.6 Transcription et suivi des données pour les échantillons

Les auditeurs 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;
- paramètre(s) demandé(s);
- données brutes de la feuille de travail;
- témoins de stérilité;
- contrôle de la qualité - membranes filtrantes et autres méthodes ;
- contrôle de la qualité - milieux de culture et réactifs;
- contrôle de la qualité - eau de rinçage ou de dilution;
- contrôle de la qualité - eau déminéralisée;
- calculs des résultats d'analyse;
- température(s) d'incubation;
- échantillons confirmés;
- rapport d'analyse.

BIBLIOGRAPHIE

- APHA-AWWA-WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19^e édition, Washington DC, 1998.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard specification for reagent water, D 1193-91, 1991.
- MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT DU QUÉBEC (MENV). Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse environnementale, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2001, 44 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, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux; Méthode par filtration sur membrane, MA. 700 – Fec 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- 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, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Recherche et dénombrement des entérocoques; Méthode par filtration sur membrane, MA. 700 – ENT 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*; Méthode par filtration sur membrane, MA. 700 – STA 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*; Méthode par filtration sur membrane, MA. 700 – PSE 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. Règlement sur la qualité de l'eau potable, Gazette officielle du Québec. Partie 2, Lois et règlements, 133^e année, n^o 24, 13 juin 2001, p. 3561-3573.

ANNEXE I

DÉLAIS DE CONSERVATION ET pH ATTENDUS DES PRINCIPAUX MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS AVEC LA TECHNIQUE DE LA MEMBRANE FILTRANTE*

Milieux de culture	Délais de conservation	pH attendus
m-Endo	2 semaines à l'obscurité, 4 °C	7,2 ± 0,2
m-Fc	2 semaines à l'obscurité, 4 °C	7,4 ± 0,2
m- <i>Enterococcus</i>	3 semaines à l'obscurité, 4 °C	7,2 ± 0,2
R2A	4 semaines à l'obscurité, 4 °C	7,2 ± 0,2
Baird-Parker	4 semaines à l'obscurité, 4 °C (sans ajout) 48 heures à l'obscurité, 4 °C (avec ajout)	7,0 ± 0,2
m-PAC	1 semaine à l'obscurité, 4 °C	7,2 ± 0,2

* Tiré des méthodes d'analyse du ministère de l'Environnement du Québec (consultez la bibliographie pour plus de renseignements).

ANNEXE II

MODALITÉS D'INTERPRÉTATION APPLICABLES AU RÈGLEMENT SUR LA QUALITÉ DE L'EAU POTABLE (2001)

1) Pour les réseaux alimentant 21 personnes ou plus

Coliformes fécaux

- Lors du contrôle bactériologique régulier, le *Règlement sur la qualité de l'eau potable* spécifie qu'un résultat positif en coliformes fécaux entraîne un avis d'ébullition automatique émis par l'exploitant. Cet avis ne sera levé que par le reprélèvement et l'obtention d'échantillons conformes, selon les exigences du Règlement. La poursuite de l'analyse par une confirmation des coliformes fécaux qui pourrait déterminer l'absence d'*E. coli*, quelques jours plus tard, ne permettra pas de lever l'avis d'ébullition.
- Un résultat positif en coliformes fécaux est donc un résultat final qui ne nécessite aucune confirmation.
- Le terme « coliforme fécaux présumés » ne doit pas être utilisé pour la transmission des résultats dans le cadre de l'application du présent Règlement.
- Un rapport préliminaire avec un dénombrement de coliformes fécaux 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.
- En reprélèvement, si un avis d'ébullition a été émis, il est possible de confirmer les coliformes fécaux afin de vérifier la présence d'*E. coli* et de ne transmettre que le résultat final confirmé. Une analyse d'*E. coli* directement par une méthode enzymatique est recommandée surtout si les BHAA ou les colonies atypiques ne respectent pas la norme.

Coliformes totaux

- Contrairement aux coliformes fécaux, le résultat de l'analyse des coliformes totaux n'est final qu'après confirmation des colonies selon la fréquence indiquée à la section 4.3 du présent document. Le laboratoire doit attendre le résultat des confirmations avant de transmettre l'information dans le cas d'un résultat positif.
- Vous devez éviter de transmettre 2 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. Vous devez confirmer les colonies atypiques car il peut s'agir de colonies de coliformes totaux ou de coliformes fécaux (selon la fréquence indiquée à la section 4.3 du présent document).

- La confirmation des colonies atypiques permet donc de déterminer s'il s'agit de colonies de coliformes totaux, de coliformes fécaux ou de bactéries non coliformes.
- Les résultats suivants ne respectent pas la norme et doivent être transmis sans délais. Si une confirmation des colonies est effectuée, l'information supplémentaire n'ajoute rien au résultat préalablement obtenu lors du dénombrement. Il s'agit de résultats supérieurs à 200 colonies atypiques (> 200 colonies atypiques), colonies trop nombreuses pour être comptées (TNC) ou trop nombreuses pour être identifiées (TNI).
- Les résultats en colonies atypiques qui sont inférieurs à 200 UFC/100 ml respectent la norme et nécessitent une confirmation.

2) **Pour les petits réseaux ou les puits individuels**

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.

Dans le cas où cette eau s'avère contaminée par ces organismes pathogènes ou recèle la présence d'organismes indicateurs de contamination d'origine fécale, vous êtes en présence d'une eau non potable. Vous devez immédiatement prévenir votre client que l'eau analysée est impropre à la consommation et 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 et plus de 500 bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA) par ml. 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 à l'exception des BHAA 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, vous devez suggérer de procéder à une désinfection, d'évaluer les sources de contamination et de procéder à un nouvel échantillonnage.