

GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION

Analyses microbiologiques des eaux

LAB GTA 23

Révision 02

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



Section LABORATOIRES

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| 1. OBJET DU DOCUMENT | 4 |
| 2. DEFINITIONS ET REFERENCES | 4 |
| 3. DOMAINE D'APPLICATION..... | 5 |
| 4. MODALITES D'APPLICATION | 5 |
| 5. SYNTHESE DES MODIFICATIONS..... | 5 |
| 6. NOMENCLATURE DES ANALYSES ET EXPRESSION DES PORTEES | 5 |
| 7. GUIDES DE LECTURE DES EXIGENCES NORMATIVES ET RECOMMANDATIONS..... | 6 |
| 7.1 Introduction..... | 6 |
| 7.2 Revue des demandes et de contrat, et services au client..... | 7 |
| 7.3 Personnel..... | 7 |
| 7.4 Installations et conditions ambiantes..... | 8 |
| 7.5 Méthode d'essai..... | 9 |
| 7.5.1 Sélection de méthodes..... | 9 |
| 7.5.2 Validation des méthodes..... | 10 |
| 7.5.3 Incertitudes de mesure..... | 10 |
| 7.6 Equipement et traçabilité du mesurage | 11 |
| 7.6.1 Enceintes thermostatées (étuves, réfrigérateurs, bains d'eau, etc.)..... | 11 |
| 7.6.2 Algorithme décisionnel « Gestion des dépassements de température » | 12 |
| 7.6.3 Pipettes et Micropipettes..... | 12 |
| 7.6.4 Thermocycleur | 13 |
| 7.7 Prélèvement et échantillonnage | 13 |
| 7.8 Manutention des objets d'essai..... | 13 |
| 7.9 Qualité des résultats d'essai | 14 |
| 7.9.1 Consommables..... | 14 |
| 7.9.1.1 Verrerie et consommables stériles | 14 |
| 7.9.1.2 Membranes..... | 14 |
| 7.9.1.3 Milieux de culture et réactifs | 14 |
| 7.9.2 Contrôles qualité interne | 15 |
| 7.9.2.1 Essais à blanc | 15 |
| 7.9.2.2 Contrôles quantitatifs | 15 |
| 7.9.3 Comparaisons inter laboratoires..... | 16 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| 7.10 | Rapport sur les résultats..... | 16 |
| 7.10.1 | Rapport d'essais | 16 |
| 7.10.2 | Déclarations de conformité, avis et interprétations..... | 16 |
| 7.11 | Recommandations particulières | 16 |
| 7.11.1 | Cas de la veille normative..... | 16 |
| 7.11.2 | Cas des méthodes alternative (validées par tierce partie) | 16 |
| 7.11.3 | Condition d'acheminement des eaux de consommation..... | 17 |
| 7.11.4 | Legionella et Legionella pneumophila selon la norme NF T90-431 | 17 |
| 7.11.5 | Spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs selon la norme NF EN 26461-2 | 17 |
| 7.11.6 | Cas des eaux minérales naturelles, des eaux de sources et des eaux carbo-gazeuses | 18 |
| 7.11.7 | Biologie moléculaire des eaux | 18 |
| Annexe n° 1 | : Exemple à titre informatif de schéma décisionnel en microbiologie des eaux | 19 |

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

1. OBJET DU DOCUMENT

La norme NF EN ISO/CEI 17025 définit les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages, d'essais et d'analyses.

En ligne avec l'annexe B de la norme NF EN ISO/CEI 17025, le présent Guide Technique d'Accréditation (GTA) a pour objet d'expliciter certaines exigences de cette norme, présente un état des lieux des bonnes pratiques dans le domaine de la Microbiologie appliquée aux analyses des eaux et établit des recommandations résultant de l'application de cette norme aux domaines de compétences recensés dans le document LAB INF 32.

Enfin, il contient des informations utiles aux laboratoires dans le cadre de leur démarche d'accréditation, notamment celles relatives à l'expression de la portée d'accréditation et aux règles particulières d'évaluation des laboratoires par le Cofrac.

Ce guide ne se substitue pas aux exigences et/ou aux normes applicables au sein du laboratoire. Les recommandations qu'il contient sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO/CEI 17025 et du document LAB REF 02. Dans tous les cas, il appartient au laboratoire de démontrer que les dispositions qu'il prend permettent de satisfaire pleinement les exigences de la norme citée supra.

2. DEFINITIONS ET REFERENCES

Les termes utilisés dans ce document font appel à des définitions précisées dans la norme NF EN ISO/CEI 17025, dans les textes réglementaires et/ou les normes techniques des domaines concernés.

Les normes citées dans ce document sont celles en vigueur le jour de la parution du guide technique d'accréditation LAB GTA 23.

Il appartient au laboratoire de se tenir à jour des textes régissant les domaines concernés tant sur le plan technique que réglementaire.

Le présent document s'appuie et se réfère notamment aux documents suivants, dans leur version en vigueur :

- NF EN ISO/CEI 17025 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais
- LAB REF 02 : Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17025
- LAB REF 05 : Règlement d'accréditation
- LAB REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation
- GEN REF 11 : Règles générales d'utilisation de la marque Cofrac
- LAB GTA 29 : Echantillonnages d'eau et essais physico-chimiques des eaux sur site
- LAB INF 32 : Nomenclature et expression des lignes de portée d'accréditation pour les analyses microbiologiques des eaux

3. DOMAINE D'APPLICATION

Ce guide technique d'accréditation s'adresse aux :

- Laboratoires d'essais accrédités ou candidats à l'accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour le domaine cité en objet,
- Evaluateurs du Cofrac, pour lesquels il constitue une base d'harmonisation pour l'évaluation,
- Membres des instances du Cofrac (Comité de Section Laboratoires, Commission d'Accréditation Chimie-Environnement),
- Structure permanente du Cofrac,
- Clients des laboratoires d'essais accrédités sur ce domaine,
- Instances officielles concernées par ce domaine.

4. MODALITES D'APPLICATION

Le présent document est applicable à compter du **15 juillet 2017**.

5. SYNTHÈSE DES MODIFICATIONS

Les modifications sont indiquées à l'aide d'une marque de révision, en marge gauche du document. Elles portent sur :

- La reformulation de l'expression des portées d'accréditation, telles que définies dans le document LAB REF 08 révision 04 ; ces modifications touchent uniquement la forme des dénominations des portées d'accréditation et ne modifient pas le champ de compétence revendiqué ;
- L'intégration de la matrice « Eaux des établissements de santé » ;
- L'ajout de précisions concernant les chapitres 7.6 « Equipements et traçabilité du mesurage » et 7.11 « Recommandations particulières ».

6. NOMENCLATURE DES ANALYSES ET EXPRESSION DES PORTEES

La portée d'accréditation demandée est définie par le laboratoire suivant les principes du document LAB REF 08, à partir des quatre éléments suivants :

1. Objet (matrice)
2. Caractéristique mesurée ou recherchée (paramètre analytique)
3. Principe de la méthode
4. Référence de la méthode

Pour établir sa portée, le laboratoire se reporte aux tableaux qui listent les différents types d'analyses / d'essais les plus couramment rencontrés et pratiqués dans le domaine des analyses microbiologiques des eaux (liste non exhaustive) présentés dans le document LAB INF 32.

Le laboratoire désirant une accréditation sur tout autre essai non répertorié dans le document LAB INF 32 et relevant de ces domaines prendra contact avec le Cofrac. En effet, des essais non

présentés dans cette nomenclature, mais pour lesquels le type de produit, les principes techniques et les compétences mises en œuvre peuvent être considérés comme de même nature, pourront faire l'objet d'une accréditation.

Les analyses du présent guide technique étant réalisées majoritairement dans un cadre réglementaire, seules les portées de type FIXE et FLEX1 sont présentées.

Portée FIXE : portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire ne souhaitant pas faire évoluer les versions de ses méthodes reconnues, ou les protocoles techniques de ses méthodes non reconnues, entre deux évaluations du Cofrac.

Portée flexible FLEX1 : portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre deux évaluations du Cofrac, d'adopter les révisions successives des méthodes reconnues de sa portée d'accréditation.

Lors du changement des textes normatifs cités en référence, à la suite de nouvelles éditions, révisions, remplacement de norme AFNOR par norme CEN, le laboratoire met en application la nouvelle version dans un délai de 6 mois à défaut de date de mise en application normative. Si la révision de la norme d'analyse implique une nouvelle compétence, le laboratoire doit se soumettre à une évaluation du Cofrac avant de pouvoir revendiquer l'application de la norme révisée sous accréditation.

7. GUIDES DE LECTURE DES EXIGENCES NORMATIVES ET RECOMMANDATIONS

7.1 Introduction

L'accréditation peut être délivrée notamment pour des analyses (ou recherches) pour les différents types d'eau suivants :

- **Eaux douces :** eaux destinées à la consommation humaine, eaux de loisirs naturelles ou traitées (piscine), eaux de rivière, eaux souterraines, eaux thermales, eaux de réseaux sanitaires (froides et chaudes), eaux minérales naturelles, eaux carbo-gazeuses, eaux embouteillées... ;
- **Eaux des établissements de santé :** eaux bactériologiquement maîtrisées, eaux pour soins standard, eaux du service d'endoscopie... ;
- **Solution de contrôle des endoscopes ;**
- **Eaux décrites selon la pharmacopée :** eaux purifiées et hautement purifiées, eaux de dialyse ou d'hémodialyse... ;
- **Eaux salines et saumâtres ;**
- **Eaux résiduaires ;**
- **Eaux de refroidissement** (eaux de tours aéroréfrigérantes).

Pour les exigences et recommandations qui suivent et sauf si cela est précisé, on entendra par « analyses » les analyses microbiologiques.

7.2 Revue des demandes et de contrat, et services au client

NF EN ISO CEI 17025 § 4.4, 4.7 et 5.8

La norme NF EN ISO/CEI 17025 stipule notamment que le laboratoire doit établir et maintenir des procédures pour la revue de demande et de contrat. Ces dernières doivent, au moins, assurer que les exigences implicites et explicites, y compris les méthodes, sont adéquatement définies, documentées et comprises, que la méthode d'essai appropriée est choisie et qu'elle est capable de répondre aux exigences des clients.

Il appartient au laboratoire de clarifier avec son client le contexte dans lequel s'inscrivent les analyses (contexte réglementaire, agrément, ...). En effet, celui-ci peut potentiellement avoir un impact sur le mode opératoire mis en œuvre et/ou sur les déclarations de conformité des résultats.

Le laboratoire informera le client en cas de recours à des méthodes validées par une tierce partie (AFNOR validation ou tout autre organisme équivalent).

La revue de contrat prend notamment en compte les conditions d'acheminement et de conservation des échantillons et les volumes d'échantillons à fournir. Il appartient au laboratoire de s'assurer que les échantillons lui parviennent dans des conditions préservant leurs propriétés intrinsèques et dans les quantités nécessaires aux essais. Les critères d'acceptation des échantillons tels que le volume, la température, la durée de transport et l'intégrité (etc.) sont définis et communiqués au client.

L'évaluateur s'assurera de l'existence et de l'application d'une procédure décrivant l'attitude à tenir vis-à-vis des échantillons dont les caractéristiques à réception sont différentes des spécifications ou des critères d'acceptation.

7.3 Personnel

NF EN ISO CEI 17025 § 5.2

LAB REF 02 § 9.1

Il revient au laboratoire de définir sa procédure de formation et d'habilitation du personnel (incluant le maintien des compétences). Le laboratoire définit des critères d'habilitation objectifs selon les méthodes de sa portée et argumente ses choix pour apporter la preuve de leur pertinence.

La validation de l'habilitation des techniciens pourra se faire, par exemple :

- Par le biais d'essais en double,
- Par l'utilisation des matériaux de référence,
- Sur des échantillons naturels dilués / dopés,
- Sur des échantillons d'essais inter-laboratoires.

La pertinence des critères d'habilitation est appréciée par l'équipe d'évaluation en fonction :

- Du nombre d'essais (expérience du personnel à habiliter et utilisation de différents niveaux de concentration),
- De la représentativité des essais choisis (positifs et négatifs, l'ensemble des matrices de la portée d'accréditation, prises en compte des exigences réglementaires...),

- Et de l'habilitation sur les lectures présomptives et/ou confirmatives (examen macroscopique des colonies) qui fera l'objet d'une méthodologie spécifique (type de colonie, stratégie de repiquage, type de confirmation...).

En conséquence, les résultats de comparaisons inter laboratoires ou l'utilisation d'un échantillon dopé ne peuvent à eux seuls servir à habilitier une personne.

Par ailleurs, le laboratoire définira les modalités d'obtention d'une habilitation par expérience, le cas échéant.

L'habilitation d'une personne peut se faire pour l'ensemble d'une méthode ou uniquement pour certaines étapes de cette dernière (exemple : étape de filtration, étape de lecture, ...).

Le maintien d'habilitation ne concerne pas seulement le cas d'une absence prolongée, il convient que le maintien des compétences de chaque personnel habilité soit systématiquement vérifié et tracé de manière claire et précise (opérations d'observations, de pratique sous contrôle, d'essais de validation...) à une fréquence et selon des critères définis.

Le maintien d'habilitation concerne toutes les fonctions techniques du laboratoire (technicien, signataire des rapports d'essais, métrologue, ...).

7.4 Installations et conditions ambiantes

NF EN ISO CEI 17025 § 5.3

Il convient que la conception et l'agencement du laboratoire (installations d'essai) tendent à réduire au minimum les contaminations potentielles provenant de l'environnement et des produits manipulés dans le laboratoire. En conséquence, les locaux d'essai (zone de réalisation des essais) sont distincts des locaux annexes (laverie, zones de stockage, préparation et stérilisation des milieux de culture et verrerie, local de décontamination, locaux administratifs).

Les circuits au sein du laboratoire sont organisés de façon à minimiser les risques de contamination croisée et à satisfaire aux exigences des référentiels appropriés. La norme indique que « des secteurs voisins qui sont le siège d'activités incompatibles doivent être effectivement séparés. Des mesures doivent être prises pour prévenir la contamination ».

Pour les activités de biologie moléculaire, il est recommandé de disposer d'espace de travail séparé entre les activités de préparation (concentration) et d'amplification.

Conformément aux pratiques de la profession, les laboratoires manipulent dans des conditions d'ambiance maîtrisées, près d'un bec bunsen, d'un bec électrique ou sous un poste de sécurité microbiologique par exemple.

Il est nécessaire, selon la nature des essais, de réaliser dans la zone de travail, des contrôles appropriés de l'environnement (surface, aérobiocontamination...) à des fréquences prédéfinies. La fréquence et la pertinence de ces contrôles sont à établir en fonction de l'activité et de l'environnement de travail.

L'exploitation des résultats peut justifier une réduction ou une augmentation de la fréquence des contrôles et peut contribuer à établir les critères d'acceptation de réalisation des analyses/essais. Les modifications de fréquence seront documentées et tracées.

Les blancs d'analyse ne suffisent pas à assurer seuls la maîtrise des conditions ambiantes. En effet, l'obtention de blancs d'analyse non conformes peut être un signe trop tardif de la dégradation de ces conditions.

Il appartient au laboratoire d'apporter la preuve de la maîtrise des risques microbiologiques induits et de l'efficacité des mesures préventives adoptées : par exemple mise en place d'un programme de nettoyage et de contrôle des surfaces, procédure de désinfection à suivre en cas de contamination accidentelle, ...

7.5 Méthode d'essai

NF EN ISO CEI 17025 § 5.4
LAB REF 02 § 9.2
LAB REF 08

Il appartient au laboratoire de décrire dans sa documentation toutes les étapes des méthodes qu'il utilise. Notamment, lorsque la méthode sélectionnée laisse le choix entre plusieurs options (ex : essais de confirmation pour une méthode de recherche, ...).

Une attention particulière sera portée sur ce point en évaluation.

7.5.1 *Sélection de méthodes*

La norme NF EN ISO/CEI 17025 indique que le laboratoire doit confirmer qu'il peut correctement appliquer des méthodes normalisées avant de les mettre en œuvre pour des essais ou des étalonnages. En cas de changement de la méthode normalisée, la confirmation doit être répétée.

Ceci s'applique à toute mise en place de méthode dans le laboratoire (méthode normalisée ou reconnue) et à chaque révision / évolution de méthode (principe, milieux, étapes de confirmation etc.). Les confirmations et « autorisations » d'emploi font l'objet d'enregistrement (conformément au document LAB REF 08).

Composition d'un « dossier type » de confirmation de méthode en flexibilité FLEX1

- Revue de la méthode et plan d'action pour la mise en place de la méthode révisée.
- En cas d'évolution significative de la méthode :
 - ⇒ Données permettant de démontrer que le laboratoire maîtrise la nouvelle méthode (par exemple, des résultats de CQI quantitatifs obtenus avec la méthode révisée et réalisée ou non en parallèle avec l'ancienne méthode, des essais inter-opérateurs ou inter-laboratoires, des résultats d'EIL, etc...).
 - ⇒ Confirmation de la capacité du personnel habilité à mettre en œuvre la nouvelle méthode (techniciens et signataires), à en maîtriser les points critiques et à en réévaluer les incertitudes de mesure.
 - ⇒ Dossiers de validation exigés dans la méthode, le cas échéant (par exemple pour la norme NF-T-90-431 : validation du temps de vortex, détermination du rendement de référence...).
- Autorisation d'emploi de la méthode révisée reconnaissant la méthode techniquement valide dans un domaine d'application défini, maîtrisée, et apte à satisfaire les besoins des clients.

Il est recommandé que l'ensemble des données soient regroupées au sein d'un même dossier.

7.5.2 Validation des méthodes

Pour chaque analyse, il convient de se reporter au domaine d'application défini par la norme.

Il est fortement recommandé de respecter les méthodes normalisées ou reconnues (AFNOR, CEN, ISO, PHARMACOPEE, ...). Cependant, conformément au document LAB REF 08, le laboratoire a la possibilité d'appliquer des méthodes internes (généralement basées sur des normes). Le recours à des méthodes internes est réalisé en accord avec le client et/ou avec la réglementation (santé ou environnement) lorsqu'applicable.

Pour toute méthode développée au laboratoire ou pour tout écart à une norme existante (par exemple: utilisation hors du domaine défini dans celle-ci, non respect d'une étape analytique, ajout de tests complémentaires...), la méthode est considérée comme « interne ». En conséquence, il convient qu'elle soit validée.

Le laboratoire définit et argumente sa méthode de validation. Pour valider sa méthode, il peut s'appuyer, par exemple, sur les normes suivantes :

- ISO/DIS 13843 : Qualité de l'eau - Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques quantitatives,
- NF EN ISO 16140 : Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

Une expertise documentaire peut être nécessaire pour que le Cofrac puisse se prononcer sur la possibilité d'évaluer la demande d'accréditation du laboratoire pour l'emploi de la méthode concernée par cette validation.

Le dossier pourra être composé des données suivantes :

- Données de fidélité : répétabilité, reproductibilité intra-laboratoire, et incertitudes de mesure (au moins l'évaluation des sources et des moyens de maîtrise - Cf § 7.5.3),
- Données de spécificité : détection de souches cibles et non détection de souches non cibles pour les méthodes de recherche.

Dans le cas des méthodes de biologie moléculaire, notamment des méthodes PCR, il est recommandé au laboratoire de s'appuyer sur la norme NF EN ISO 22118 qui décrit les critères de performance à évaluer lors de la validation d'une méthode nouvelle développée au laboratoire.

7.5.3 Incertitudes de mesure

Conformément au document LAB REF 02, que ce soit pour des méthodes quantitatives ou qualitatives, le laboratoire identifie au moins les sources d'incertitudes et les moyens de maîtrise associés.

Il est recommandé au laboratoire de mettre en œuvre les dispositions des fascicules de documentation relatifs aux incertitudes de mesures en microbiologie des eaux (série des FD T 90-465) pour évaluer leurs incertitudes de mesures.

Dans l'attente de la publication de l'ensemble des fascicules permettant de calculer les incertitudes relatives à chaque microorganisme, le laboratoire établit un plan d'action précisant les étapes mises en œuvre pour estimer ses incertitudes de mesure.

7.6 Équipement et traçabilité du mesurage

NF EN ISO CEI 17025 § 5.5 et 5.6
LAB REF 02 § 9.3

Tout matériel et équipement détenu en vue d'effectuer les analyses /essais est entretenu selon les exigences définies dans la norme. Le laboratoire établit une liste des équipements dits « critiques » nécessaires à l'exécution des analyses.

7.6.1 *Enceintes thermostatées (étuves, réfrigérateurs, bains d'eau, etc.)*

Pour toute incubation dans des étuves thermostatées, ayant un impact critique sur les essais, et notamment celle au-dessus de 20 °C, le contrôle effectif de la température est recommandé par enregistrement en continu.

Dans tous les cas, il appartient au laboratoire de gérer les dépassements de température et prendre les dispositions nécessaires pour garantir la validité des résultats fournis au client. Faute de preuve de la maîtrise de la température et de la durée de dépassement, les résultats sont invalidés.

Préalablement à la mise en service et en cas d'intervention suite à une panne, une cartographie est réalisée. Il appartient au laboratoire de vérifier à une fréquence définie l'homogénéité de son parc d'enceintes. Il est recommandé d'effectuer cette cartographie en condition réelle (à mi-charge ou charge pleine). Ces dispositions s'appliquent également pour les bains d'eau utilisés comme incubateurs.

Le laboratoire pourra par exemple suivre le fascicule de documentation FD X 15-140 : « Mesure de l'humidité de l'air - Enceintes climatiques et thermostatiques - Caractérisation et vérification » pour effectuer leur cartographie. Les zones acceptables sont matérialisées.

Pour les chambres froides, les réfrigérateurs et les congélateurs, il appartient au laboratoire de démontrer que la cartographie n'est pas nécessaire compte tenu de la tolérance des échantillons et des réactifs à conserver. Il est toutefois recommandé de réaliser une cartographie lors de la première mise en service.

L'exactitude sur la température à atteindre est plus stricte quand la température est plus élevée et utilisée comme agent sélectif. En appliquant les recommandations du fascicule de documentation FD X 15-140 :

- Calcul de l'incertitude de la mesure de température intégrant l'incertitude instrumentale et la répétabilité des mesures sur la période observée,
- Règle de conformité appliquée à chaque sonde prenant en compte l'incertitude de mesure de la température et l'écart maximal toléré spécifié,

Il advient que de nombreuses enceintes thermostatiques ne parviennent pas à respecter la spécification d'incubation de 44 °C +/- 0,5 °C exigée dans les normes analytiques NF EN ISO 9308-1, NF EN ISO 9308-3 et NF EN ISO 7899.

En conséquence, les membres de la commission AFNOR T90D s'accordent pour admettre que si lors de sa caractérisation, une enceinte thermostatique ne se conforme pas à la spécification d'incubation de 44 °C +/- 0.5 °C des normes analytiques citées ci-dessus, mais qu'elle satisfait à une spécification de 44 °C +/- 1 °C, la situation est acceptable.

Les étuves ventilées sont acceptables, à condition de prendre des précautions pour éviter la dessiccation des géloses.

Pour les boîtes dont l'incubation se termine lors de jours chômés et le dimanche, il est possible (à titre d'exemples) :

- Soit de passer les boîtes au réfrigérateur à l'issue de l'incubation habituelle (mais pour une durée inférieure à 48 heures),
- Soit d'utiliser des étuves programmables, dont la température descend automatiquement à $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ à l'issue de l'incubation habituelle, et reporter la lecture. Pour les étuves programmables, il est nécessaire qu'une cartographie soit réalisée aux différentes températures d'utilisation. (ex : 36 °C et 5 °C , ...),
- Soit d'assurer une permanence.

7.6.2 Algorithme décisionnel « Gestion des dépassements de température »

Il appartient au laboratoire d'établir un schéma décisionnel de gestion de température d'incubation afin notamment de montrer la maîtrise des dépassements en température.

Concernant les dépassements de température en cours d'incubation des milieux, cette maîtrise est dépendante entre autres :

- De la nature du dépassement (supérieur ou inférieur à la température maximale d'incubation normative),
- De la durée de dépassement, du paramètre analysé,
- Du type de détermination (étape de dénombrement ou confirmation).

Une attention particulière sera portée, en évaluation, aux limites supérieures et inférieures de dépassement de températures et de la durée de dépassement encadrant les températures et les délais d'incubation normatifs fixés par laboratoire. Il convient que ces limites soient documentées.

Tout dépassement des limites fixées par le schéma décisionnel conduit le laboratoire à prendre les dispositions en terme de validité des résultats (étude d'impact, actions correctives, ...). Le laboratoire tracera ces dépassements ainsi que les dispositions prises.

Un exemple de schéma décisionnel est donné en annexe 1.

7.6.3 Pipettes et Micropipettes

Pour les micropipettes, un certificat d'étalonnage avec logotype Cofrac (ou de tout autre organisme signataire des accords de reconnaissance multilatéraux d'EA Etalonnage) permet d'assurer un raccordement au SI. Un raccordement interne au SI par pesée suivant une procédure détaillée est également recevable. De plus, une vérification régulière de ce matériel est fortement recommandée (niveau de risque à évaluer par le laboratoire en fonction de son utilisation).

Cas particulier des micropipettes en location

Lorsque le laboratoire utilise des micropipettes en location, il lui appartient de s'assurer que l'état de fonctionnement et le statut de l'étalonnage (raccordement au SI entre autres) sont vérifiés et jugés satisfaisants avant de mettre ces équipements en service.

Il lui appartient également de s'assurer qu'au terme de leur période d'utilisation, les micropipettes sont toujours conformes aux spécifications attendues (par le biais d'un constat de vérification de fin de contrat, par exemple).

Conformément au § 5.5.8 de la norme NF EN ISO CEI 17025, les règles d'étiquetage doivent également être respectées sur ce type de matériel.

Cas particulier des pipettes à usage unique

NF EN ISO CEI 17025 § 4.6.2

Il appartient au laboratoire de mettre en place un moyen pertinent pour vérifier que les pipettes à usage unique dont l'utilisation a un impact sur le résultat (pour les prises d'essai, par exemple), lui permettent d'obtenir des résultats cohérents (linéarité) et que l'incertitude de mesure liée à celles-ci a peu d'impact sur l'incertitude globale.

7.6.4 *Thermocycleur*

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement une procédure de contrôle de ce type d'appareils. Ce contrôle peut être métrologique (raccordement au SI de la température, longueurs d'onde utilisées) et/ou biologique (absence de bruit de fond, homogénéité de la plaque, en particulier en présence d'échantillons témoins à une concentration proche de la limite de quantification).

Afin de vérifier l'homogénéité des résultats, il est fortement recommandé d'effectuer des tests sur la totalité des positions utilisées, à une fréquence appropriée et au moins après une intervention sur l'appareillage.

7.7 Prélèvement et échantillonnage

NF EN ISO CEI 17025 § 5.7

Cette activité est décrite dans le guide technique d'accréditation LAB GTA 29 « Echantillonnages d'eau et essais physico-chimiques des eaux sur site ».

Lorsque le laboratoire n'est pas accrédité pour cette activité ou lorsque le prélèvement n'a pas été effectué par le laboratoire, ce dernier s'assure des conditions de prélèvement afin de garantir l'intégrité de l'échantillon (par exemple que le client a été informé des règles de prélèvement, des recommandations sur la façon de prélever, ...), et que les exigences liées à l'échantillonnage décrites dans les normes d'analyses ont été respectées (température et durée de conservation avant mise en analyse).

Lorsque le rapport sur les résultats ne couvre pas les prestations de prélèvements, il ne doit subsister aucune ambiguïté pour le client sur ce qui est effectivement couvert par l'accréditation (cf. document GEN REF 11). En outre, les rapports sur les résultats doivent comporter toute réserve, quant aux conditions d'acceptation à réception au laboratoire, susceptible d'influencer l'interprétation des résultats.

7.8 Manutention des objets d'essai

NF EN ISO CEI 17025 § 4.6 et 5.8

Il est recommandé que la stérilité des flacons de prélèvements et la présence de neutralisant dans ces derniers soient vérifiées par le laboratoire selon une fréquence définie (par exemple : à chaque nouveau lot ou en fonction du volume d'activité).

Afin de s'assurer que la quantité de neutralisant est adaptée au type d'eau prélevé, le contrôle de la concentration du neutralisant peut être réalisé par méthode chimique, en utilisant, par exemple, la méthode décrite dans le § 4.2 de la norme NF EN ISO 19458.

Le laboratoire peut également s'appuyer sur le certificat de conformité des flacons de prélèvements qui lui a été remis par son fournisseur. Dans ce cas, il est de la responsabilité du laboratoire de démontrer que ce certificat apporte des garanties équivalentes aux contrôles qu'il pourrait réaliser lui-même.

7.9 Qualité des résultats d'essai

NF EN ISO CEI 17025 § 4.6 et 5.9
LAB REF 02 § 9.5

7.9.1 *Consommables*

7.9.1.1 Verrerie et consommables stériles

Les matériels et verreries stériles sont facilement identifiables et des tests périodiques de stérilité sont entrepris.

7.9.1.2 Membranes

La stérilité des membranes filtrantes (stériles) est contrôlée.

Il appartient au laboratoire de s'assurer que le taux de récupération des membranes est satisfaisant. Il peut par exemple exploiter les résultats des rendements ou encore utiliser la norme ISO 7704.

Il n'est par contre pas nécessaire de vérifier le niveau de dépression, toutefois le laboratoire s'assurera du bon fonctionnement de son système.

7.9.1.3 Milieux de culture et réactifs

Le laboratoire s'assurera de la traçabilité de la date d'ouverture, de préparation et de péremption des milieux et réactifs.

Les flacons de milieux gélosés ne peuvent être refondus ni maintenus en surfusion plus de quatre heures (cf. NF EN ISO 8199).

Le laboratoire réalise le contrôle de la qualité des milieux de culture qu'il utilise (stérilité, fertilité et sélectivité). Si la norme d'analyse n'impose pas l'application d'une norme de contrôle ou ne décrit pas les contrôles à réaliser, il est recommandé d'appliquer la norme NF EN ISO 11133.

Cas des milieux de culture préparés par le laboratoire

Les milieux de culture déshydratés sont conservés au sec, réhydratés avec de l'eau distillée sur verre ou déminéralisée non chlorée avec contrôles de conductivité ($< 25 \mu\text{s/cm}$ à $+ 25 \text{ }^\circ\text{C}$) et de stérilité.

Un contrôle de chaque lot fabriqué est réalisé selon la norme de contrôle qualité en vigueur.

Cas des milieux de culture achetés prêts à l'emploi

Dans le cas des milieux prêts à l'emploi, le contrôle peut être allégé en terme de fréquence à condition que le certificat du fournisseur fasse référence à la norme de contrôle qualité en vigueur (NF EN ISO 11133) et/ou au fascicule de documentation associé (FD T 90-461) qui prend en compte les milieux de confirmation et les milieux de culture issus des normes françaises non décrits dans la norme internationale.

Il appartient au laboratoire de définir sa fréquence de contrôle (en fonction notamment de son volume d'activité) et de justifier son choix.

Pour des volumes d'activité faibles, il est recommandé de réaliser au moins un contrôle par an et à chaque changement de fournisseur.

Dans le cadre de la mise en œuvre de la norme NF T 90-431, le milieu GVPC étant utilisé à la fois pour le dénombrement en direct et pour le dénombrement après concentration par filtration, il devrait être contrôlé selon les paragraphes 7.2 et 7.3 de la norme NF EN ISO 11133. Toutefois, le contrôle des performances analytiques réalisé selon la norme analytique permettant de vérifier indirectement le couple milieu/membrane, seul le protocole de contrôle des milieux pour le dénombrement en direct (paragraphe 7.2 de la norme NF EN ISO 11133) peut être réalisé.

Réactifs de confirmation

Lorsque cela n'est pas spécifié dans les normes analytiques, il appartient au laboratoire de contrôler périodiquement les processus de confirmation de colonies ou cultures suspectes avec des souches de collection (caractéristiques et faux positifs). Ces contrôles portent sur les aspects qualitatifs (aspects des colonies, réactions colorées...).

7.9.2 Contrôles qualité interne

7.9.2.1 Essais à blanc

Il appartient au laboratoire de réaliser un essai à blanc par « série analytique » pour permettre de tester l'ensemble milieux, réactifs et matériels divers entrant dans la totalité de la manipulation. En cas de résultat non satisfaisant d'un essai à blanc, il est nécessaire d'en rechercher la cause précise et d'évaluer l'impact sur les essais réalisés de manière concomitante.

Une série analytique est définie comme étant un ensemble de mesures successives réalisées sur une même chaîne analytique, et dans des conditions suffisamment stables pour que l'on puisse les considérer comme des « conditions de répétabilité ».

7.9.2.2 Contrôles quantitatifs

Il appartient au laboratoire de réaliser des contrôles quantitatifs avec une fréquence définie.

Ces contrôles permettent d'assurer la qualité des résultats et de cumuler des données nécessaires au calcul des incertitudes.

Ces contrôles ne se substituent pas aux déterminations de rendement réalisées dans le cadre d'un contrôle de milieu de culture et inversement. Ils ne se substituent pas non plus aux déterminations de rendements réalisées dans le cadre des contrôles de performances des méthodes analytiques.

7.9.3 Comparaisons inter laboratoires

Conformément à la politique ad hoc présentée dans le document LAB REF 02, sauf exigences réglementaires particulières, le laboratoire doit, lorsqu'elles existent et sont appropriées, participer aux comparaisons inter-laboratoires pour démontrer ses compétences et assurer la qualité de ses résultats. Ceci s'applique aussi aux laboratoires en démarche d'accréditation et pour les demandes d'extension.

Dans le domaine des analyses microbiologiques des eaux, il est recommandé de participer au moins deux fois par an à des comparaisons inter-laboratoires pour chaque paramètre et pour chaque matrice.

Lorsqu'aucun programme de comparaison n'existe, il appartient au laboratoire, pour assurer la cohérence de ses résultats, de recourir à l'utilisation régulière de matériaux de référence ou de corrélés ses résultats avec ceux d'autres laboratoires ou de réitérer ses analyses à l'aide de méthodes équivalentes.

7.10 Rapport sur les résultats

NF EN ISO CEI 17025 § 5.10
LAB REF 02 § 9.4 et 10

7.10.1 Rapport d'essais

Concernant la date d'exécution des essais, le laboratoire précisera au moins la première date de mise en analyse (1er essai démarré au laboratoire en dehors des essais réalisés in situ) ou la période pendant laquelle ont été réalisés les essais. Il n'est pas acceptable de n'avoir aucune date d'analyse sur le rapport. Par ailleurs l'heure et la date de prélèvement figureront sur les rapports d'essais.

7.10.2 Déclarations de conformité, avis et interprétations

Les déclarations de conformité portant sur des analyses/essais tous réalisés sous couvert de l'accréditation font partie intégrante du rapport et sont couvertes par l'accréditation. Ceci s'applique pour les avis et interprétations.

L'origine des critères (textes réglementaires, cahier des charges etc.) sur lesquels s'appuie le laboratoire est clairement mentionné dans le rapport et conforme à la revue de contrat ou de demande.

Le laboratoire précisera, en outre, s'il a tenu compte ou non de ses incertitudes de mesure pour établir sa déclaration de conformité, conformément à la politique ad hoc présentée dans le document LAB REF 02.

7.11 Recommandations particulières

7.11.1 Cas de la veille normative

Les amendements normatifs font partie intégrante de la norme chapeau. De ce fait, il n'est pas nécessaire d'y faire référence dans les rapports d'essai ou dans les documents de revue de contrat.

7.11.2 Cas des méthodes alternative (validées par tierce partie)

Lorsqu'un laboratoire souhaite être accrédité sur des méthodes certifiées sous marque AFNOR validation ou tout autre organisme équivalent, il demande conjointement l'accréditation pour la

méthode de référence correspondante. De plus, si le protocole fournisseur prévoit la confirmation par une autre méthode certifiée, le laboratoire doit être accrédité pour cette dernière (s'il utilise cette option). Le laboratoire ne peut appliquer cette méthode alternative que dans le domaine d'application validée par tierce partie.

De plus, lorsqu'une méthode alternative complète a été validée avec des produits consommables bien identifiés (ex nom du fabricant du milieu), le laboratoire ne peut utiliser un milieu d'un autre fabricant. En revanche, le laboratoire peut choisir son milieu si, et seulement si, la notice cite un fournisseur à titre d'exemple et permet donc un changement.

7.11.3 Condition d'acheminement des eaux de consommation

Concernant l'ensemencement des échantillons pour la recherche des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes (NF EN ISO 9308-1) et des Entérocoques intestinaux (NF EN ISO 7899-2) et conformément à la décision de la commission AFNOR T90D, la mise en analyse des échantillons est réalisée dans les 18 heures après prélèvement (durée maximale acceptable de conservation y compris le transport, définie dans l'annexe B de la norme NF EN ISO 19458).

Le laboratoire mettra en place une organisation pour satisfaire cette exigence, toutefois dans certaines circonstances exceptionnelles (cas des situations imprévisibles : problème ponctuel d'acheminement, problème ponctuel technique au sein du laboratoire, ...), les échantillons pourront être conservés avant d'être examinés pendant une durée maximale de 24 heures après prélèvement. Il appartiendra par conséquent au laboratoire de justifier du caractère exceptionnel de cet allongement de la durée de conservation avant analyse. Une attention particulière sera portée à ces dépassements et à leur récurrence lors des évaluations.

Dans tous les cas, la température de conservation de ces échantillons sera de 5 °C +/- 3 °C.

7.11.4 Legionella et Legionella pneumophila selon la norme NF T90-431

Dans le cas où le laboratoire ne traite pas l'ensemble des types d'eaux, il précise lors de la revue de contrat les types d'eaux couverts par l'accréditation et définit les dispositions prises quant au traitement des autres types d'eaux (refus d'échantillons, sous-traitance, ...).

7.11.5 Spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs selon la norme NF EN 26461-2

L'utilisation de membranes filtrantes de porosité 0,45 µm est tolérée.

Par ailleurs la norme NF EN 26461-2 impose l'utilisation d'un flacon témoin à chaque analyse pour mesurer la montée en température dans les flacons et donc le temps de chauffage nécessaire pour atteindre la température de 75 °C +/- 5 °C.

Une validation au moins une fois par an de la montée en température avec un tube témoin, dans les conditions d'utilisation, est acceptable, le bain-marie ayant été caractérisé et la température du bain maîtrisée.

Il appartient au laboratoire de démontrer qu'il maîtrise les conditions de l'anaérobiose.

7.11.6 Cas des eaux minérales naturelles, des eaux de sources et des eaux carbo-gazeuses

Les normes AFNOR incluent généralement les eaux minérales naturelles à leur domaine d'application. Certaines difficultés analytiques ou spécificités sont néanmoins à prendre en compte :

- Délais de mise en analyse pour les eaux conditionnées : Lorsque les analyses sont réalisées dans le cadre de l'arrêté du 14 mars 2007 modifié, l'ensemencement se fait dans les 12 heures qui suivent le conditionnement de l'eau pour les germes aérobies revivifiables et l'ensemencement se fait à partir de J + 3 après le prélèvement pour la recherche des *Pseudomonas aeruginosa*.
- Pour la recherche de *Cryptosporidium* / *Giardia*, un colmatage des cartouches ou une fluctuation des débits notamment pour les eaux carbo-gazeuses est souvent observé.
- De même pour les eaux riches en fer, l'étape de filtration peut être allongée en raison d'un colmatage des membranes.

7.11.7 Biologie moléculaire des eaux

Dans le cadre de la recherche de *Legionella* et *L. pneumophila* par PCR en temps réel les demandes d'accréditation pour cette analyse sont soumises à une expertise technique si le laboratoire n'utilise pas des kits validés par AFNOR Validation ou tout autre organisme équivalent.

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

**Annexe n° 1 : Exemple à titre informatif
de schéma décisionnel en microbiologie des eaux**

| Paramètres | Températures et délais d'incubation normatifs | | Limites supérieures de dépassement : Température et/ou durée d'incubation | | Limites inférieures de dépassement : Température et/ou durée d'incubation | |
|--------------------------|---|------------|--|-----------|--|-----------|
| | T (°C) | Délais (h) | T (°C) | Durée (h) | T (°C) | Durée (h) |
| Micro-organisme 1 | xx ± x | xx ± x | xx | x | xx | x |
| Micro-organisme 2 | xx ± x | xx ± x | xx | x | xx | x |
| Micro-organisme X | xx ± x | xx ± x | xx | x | xx | x |

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI