



Analyses microbiologiques des eaux

LAB GTA 23 - Révision 04

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI





SOMMAIRE

1	OBJET DU DOCUMENT	3
2	REFERENCES ET DEFINITIONS	3
2.1	Références.....	3
2.2	Abréviations et définitions	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 LECTURES DES EXIGENCES NORMATIVES ET RECOMMANDATIONS.....	6
7.1	Revue de demande, appels d'offres et contrats	6
7.2	Personnel.....	7
7.3	Installations et conditions ambiantes.....	8
7.4	Méthode d'essai.....	9
7.5	Equiperment et traçabilité du mesurage	11
7.6	Prélèvement et échantillonnage / Manutention des objets d'essai.....	14
7.7	Validité des résultats d'essai	15
7.8	Rapport sur les résultats	17
7.9	Recommandations particulières	18
	ANNEXE N° 1 : EXEMPLE A TITRE INFORMATIF DE SCHEMA DECISIONNEL EN MICROBIOLOGIE DES EAUX.....	19

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



1 OBJET DU DOCUMENT

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

Le présent Guide Technique d'Accréditation (GTA) a pour objet d'expliciter certaines exigences de cette norme, de présenter un état des lieux des bonnes pratiques dans le domaine de la Microbiologie appliquée aux analyses des eaux et d'établir 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 normes applicables au sein du laboratoire. Les recommandations qu'il contient et que le laboratoire est invité à appliquer sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO/IEC 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 aux exigences de la norme précitée.

Les paragraphes de la norme NF EN ISO/IEC 17025 cités dans le document se réfèrent à la version 2017 de cette norme précitée.

2 REFERENCES ET DEFINITIONS

2.1 Références

Les termes utilisés dans ce document font appel à des définitions précisées dans la norme NF EN ISO/IEC 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. Lorsque deux versions d'une même norme coexistent, la norme la plus ancienne est datée

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 :

- Norme NF EN ISO/IEC 17025 :2017 : 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/IEC 17025 :2017
- LAB REF 05 : Règlement d'accréditation
- LAB REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation
- GEN REF 10 : Traçabilité des résultats de mesure – Politique du Cofrac et modalités d'évaluation
- 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
- Norme NF EN ISO 8199 : Qualité de l'eau - Exigences et lignes directrices générales pour les examens microbiologiques sur milieu de culture
- NF EN ISO 11133 : Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture
- FD T 90 461 Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture
- FD T 90 465-1 Qualité de l'eau - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques - Partie 1 : références, définitions et généralités
- FD T 90 465-2 Qualité de l'eau - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques - Partie 2 : les techniques énumératives

2.2 Abréviations et définitions

- **Définition de l'encart :**

Pistes de réflexion

Certains paragraphes du présent document sont accompagnés de questions pratiques ou pistes de réflexion pour aider le laboratoire dans sa démarche de mise en œuvre des exigences d'accréditation, en s'appuyant notamment sur une approche basée sur l'analyse de risques. Ces pistes ne sont pas exhaustives, elles sont données à titre informatif pour guider les laboratoires afin de se mettre en conformité vis-à-vis de l'ensemble des exigences du référentiel.

Les définitions des différentes catégories d'eaux pour lesquelles des analyses (ou recherches) peuvent être délivrées sous accréditation sont les suivantes (liste non exhaustive) :

- **Eaux douces** : eaux destinées à la consommation humaine, eaux de loisirs naturelles ou traitées (piscine), eaux superficielles (rivières, canaux, lacs ; gravières), eaux souterraines, eaux de réseaux sanitaires (froides et chaudes), eaux minérales naturelles, eaux carbonatées, eaux embouteillées, eaux de brumisateurs, eaux thermales, ... ;
- **Eaux des établissements de santé et de qualité pharmaceutique et cosmétique** : eaux bactériologiquement maîtrisées, eaux pour soins standard, eaux du service d'endoscopie, eaux purifiées et hautement purifiées, eaux de dialyse ou d'hémodialyse et autres types d'eau décrits selon la pharmacopée ;
- **Solutions de contrôle des endoscopes** : Endoscopes, duodénoscopes, ...
- **Eaux salines et saumâtres** ;
- **Eaux salines (eau de mer traitée)** ;
- **Eaux résiduaires** : eaux urbaines, eaux industrielles ;
- **Eaux de process** : eau d'alimentation des chaudières, eau de refroidissement pour les échangeurs de chaleur type « tours aéroréfrigérantes » ou pour les moteurs, eau déminéralisée pour les dilutions de produits chimiques (hors produits des industries pharmaceutiques)



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/IEC 17025 pour le domaine cité en objet,
- Evalueurs 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 concernée par le domaine),
- 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 **1^{er} octobre 2021**.

5 SYNTHÈSE DES MODIFICATIONS

Du fait de la refonte du document et par souci de lisibilité, les modifications n'y sont pas repérées.

Les principaux changements concernent :

- La mise à jour des matrices en cohérence avec les matrices définies dans le domaine des prélèvements d'eau (cf. guide technique LAB-GTA-29) ;
- La mise à jour des différents items de ce document pour la prise en compte de la version 2017 de la norme ISO/IEC 17025 et la suppression de la table de références croisées des versions 2017 et 2005 de la norme NF EN ISO/IEC 17025 ;
- L'intégration de « pistes de réflexion ».

6 NOMENCLATURE DES ANALYSES ET EXPRESSION DES PORTÉES

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 ce domaine prend 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, peuvent faire l'objet d'une accréditation.



Pour les laboratoires accrédités en portée FLEX1, lors de la révision d'une méthode normalisée, il convient que le laboratoire mette en application la nouvelle version dans un délai de six mois à défaut de date de mise en application stipulée dans la méthode.

Si la révision de la méthode reconnue implique une nouvelle compétence, le laboratoire doit se rapprocher du Cofrac et se soumettre à une évaluation du Cofrac, le cas échéant, avant de pouvoir revendiquer l'application de cette méthode révisée sous accréditation.

7 GUIDES DE LECTURES DES EXIGENCES NORMATIVES ET RECOMMANDATIONS

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

7.1 Revue de demande, appels d'offres et contrats

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.1

La norme NF EN ISO/IEC 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, ...) pour identifier les objectifs, proposer les méthodes appropriées et établir des règles de décision pour les déclarations de conformité des résultats et/ou les avis et interprétations, le cas échéant.

Par ailleurs, le 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.

Lorsque le laboratoire fait appel à un prestataire externe, le client doit en être informé en amont de la réalisation de la prestation et avoir donné son accord.

Pistes de réflexion

- ✓ Le laboratoire a-t-il défini avec son client le contexte dans lequel s'inscrivent les essais demandés ?
- ✓ Le contrat mentionne-t-il les textes réglementaires et les méthodes en vigueur au moment de la réalisation des analyses ? (Attention aux reconductions automatiques des contrats et aux contrats cadres).
- ✓ Le laboratoire rend-t-il hors accréditation des résultats d'analyses obtenus avec des méthodes pour lesquelles il est accrédité ? Ces cas-là sont-ils justifiés ?
- ✓ Existe-t-il des dispositions encadrant la réception des échantillons (critères définis, conduite à tenir lorsque les caractéristiques des échantillons à réception sont différentes des spécifications ou des critères d'acceptation) ?
- ✓ Les différentes revues, modifications significatives, discussions pertinentes avec le client sont-elles traçables ?



7.2 Personnel

NF EN ISO/IEC 17025 §6.2

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.

7.2.1 Formation et habilitation

L'habilitation des techniciens peut se faire, par exemple :

- Par le biais de formation(s) externe(s) appropriées
- 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 d'aptitude et/ou 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, pour déclaration de conformité, s'il y a lieu, ...),
- 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, calculs et expression des résultats, ...).

En conséquence, les résultats des essais d'aptitudes et des comparaisons inter laboratoires ou l'utilisation d'échantillons dopés ne peuvent à eux seuls servir à habiliter 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, ...).

7.2.2 Maintien d'habilitation

Le maintien d'habilitation ne concerne pas seulement le cas d'une absence prolongée, il doit permettre au laboratoire, à une fréquence et selon des critères objectifs définis, de vérifier le maintien effectif des compétences des personnes habilitées.

Il concerne au moins toutes les fonctions techniques du laboratoire (Personnel technique, signataire des rapports d'essais, opérateur en métrologie, ...).

Le maintien d'habilitation des techniciens peut se baser, par exemple, sur les résultats de participation aux essais d'aptitude ou aux comparaisons inter-laboratoires, les résultats aux contrôles qualité internes, les cartes de contrôles, la réalisation d'analyses avec des résultats positifs et négatifs, ...

Le maintien d'habilitation des signataires peut se baser par exemple, sur les nombres de rapports signés, le nombre de rapports amendés, la connaissance des documents du Cofrac et des textes réglementaires, ...



Il convient que ce maintien soit systématiquement vérifié et tracé de manière claire et précise.

Pistes de réflexion

- ✓ Les dispositions et les critères d'habilitation définis par le laboratoire permettent-ils d'avoir des pratiques homogènes ?
- ✓ Les critères de maintien sont-ils suffisamment étayés pour identifier une dérive des pratiques le cas échéant ?

7.3 Installations et conditions ambiantes

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.3

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'espaces de travail séparés entre les activités de préparation des échantillons (concentration, extraction) et d'amplification.

Pour les tests "Daphnies", le laboratoire doit assurer que l'atmosphère d'essai soit exempte de vapeur ou de poussières pouvant présenter un risque de toxicité vis à vis de *Daphnia magna* (NF EN ISO 6341).

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.

Une attention particulière est apportée aux manipulations des matrices très propres par exemple les *Eaux des établissements de santé et de qualité pharmaceutique et cosmétique*.

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. Les modifications de fréquence sont documentées et tracées et l'analyse des risques complétée, le cas échéant.

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, ...

NB : Les exigences de la norme NF EN ISO/IEC 17025 s'appliquent également aux installations mobiles.



Pistes de réflexion

- ✓ L'organisation du laboratoire lui permet-elle de préserver l'intégrité des échantillons, (propreté, encombrement, description des flux, séparation spatio-temporelle d'activités non compatibles...)?
- ✓ Les moyens de surveillance et de maîtrise des conditions ambiantes mis en œuvre par le laboratoire sont-ils proportionnés aux risques de contamination des échantillons ?

7.4 Méthode d'essai

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.2
LAB REF 02 § 7.2
LAB REF 08

Piste de réflexion

- ✓ La documentation est-elle suffisamment précise, notamment lorsque la méthode sélectionnée laisse le choix entre plusieurs options, pour garantir que les pratiques entre les différentes personnes habilitées, soient harmonisées ?

7.4.1 Sélection de méthodes

La norme NF EN ISO/IEC 17025 indique que le laboratoire doit confirmer qu'il peut correctement appliquer des méthodes reconnues avant de les mettre en œuvre pour des essais ou des étalonnages. La confirmation doit être répétée lorsque ces méthodes sont révisées et que des points critiques sont impactés (changement de principe, de milieux de culture, d'équipement, ...).

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).

Pour ce qui concerne la vérification de l'atteinte des performances d'une méthode quantitative, la norme NF EN ISO 8199 (§11) renvoie, par exemple, vers la norme NF EN ISO 13843 (§7).

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

- Etude d'impact et plan d'action pour la mise en place d'une nouvelle méthode ou d'une méthode révisée.
- 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 aux essais d'aptitudes, ...).
- 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 passage au 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.



7.4.2 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 reconnues (AFNOR, CEN, ISO, Pharmacopée, Certification...). 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 :

- NF EN ISO 13843 : Qualité de l'eau - Exigences pour l'établissement des caractéristiques de performance des méthodes microbiologiques quantitatives,
- NF EN ISO 17994 : Qualité de l'eau - Exigences pour la comparaison du rendement relatif des microorganismes par deux méthodes quantitatives
- XP T 90 500 : Qualité de l'eau – Validation de méthode de confirmation et d'identification

Lorsqu'aucune norme de validation de méthode n'existe dans le domaine, le laboratoire peut s'appuyer sur des normes de validation d'autres domaines techniques. Son choix est justifié.

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 peut 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 pour les méthodes qualitatives - cf. § 7.5.3),
- Données de spécificité : détection de souches cibles et non détection de souches non cibles pour les méthodes de recherche.

7.4.3 Incertitudes de mesure

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.6.
LAB REF 02 § 7.6

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

Pour les méthodes quantitatives, le laboratoire doit estimer ses incertitudes de mesure, pour ce faire, il peut s'appuyer sur les fascicules de documentation disponibles (série des FD T 90-465).



Pistes de réflexion

- ✓ En cas de confirmation de méthode, le laboratoire a-t-il correctement identifié les éléments pertinents dans son plan d'actions (habilitation, contrôles externes, contrôles internes, ...) ?
- ✓ Les sources d'incertitude et les moyens de maîtrises sont-ils identifiés pour chacun des couples paramètre/méthode accrédités ?
- ✓ Le laboratoire a-t-il estimé les incertitudes pour chacun des couples paramètre/méthode quantitative accrédités ?
- ✓ Quelles sources de données le laboratoire a-t-il pris en compte pour estimer ses incertitudes ? Cela est-il suffisamment documenté ?
- ✓ Les données sont-elles documentées et disponibles pour les clients ?

7.5 Equipement et traçabilité du mesurage

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.4 et 6.5
LAB REF 02 § 6.4 et 6.5
GEN REF 10
NF EN ISO 8199

Les équipements, incluant les logiciels, détenus en vue d'effectuer les analyses /essais sont gérés selon les exigences définies dans la norme.

Piste de réflexion

- ✓ Le laboratoire utilise-t-il un équipement qu'il ne maîtrise pas en permanence ? Comment le laboratoire démontre qu'il reste conforme aux exigences ?

7.5.1 Enceintes thermostatées (étuves, chambres chaudes, chambres froides, réfrigérateurs, congélateurs, bains d'eau, ...)

Pour toute incubation dans des enceintes thermostatées, ayant un impact critique sur les essais, la température doit être contrôlée et il est recommandé que ce contrôle soit enregistré 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 une mise en service et à la suite d'une intervention (panne, déménagement, ...) ou d'un changement de consigne, une cartographie est réalisée. De manière générale, il appartient au laboratoire de vérifier à une fréquence définie l'homogénéité de ses 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. Le laboratoire peut par exemple suivre les fascicules de documentation FD X 15-140 : « Mesure de l'humidité de l'air - Enceintes climatiques et thermostatiques - Caractérisation et vérification » pour effectuer leur cartographie ou FD V 08-601 « Microbiologie des aliments Enceintes thermostatiques Caractérisation, vérification et suivi quotidien ». Les volumes acceptables sont matérialisés.

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,

Certaines enceintes thermostatiques ne parviennent pas à respecter la spécification d'incubation de $(44 \pm 0,5)$ °C exigée dans les normes analytiques NF EN ISO 9308-1 (version 2000), NF EN ISO 9308-3, NF EN ISO 7899-1 et NF EN ISO 7899-2.

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 $(44 \pm 0,5)$ °C des normes analytiques citées ci-dessus, mais qu'elle satisfait à une spécification de (44 ± 1) °C, la situation est acceptable. Cette tolérance concerne uniquement les méthodes citées dans la note N° 850 AFNOR.

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

Pour les boîtes dont l'incubation se termine lors de jours chômés (samedi, dimanche, jours fériés), 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 24 heures),
- Soit d'utiliser des étuves programmables, dont la température descend automatiquement à (5 ± 3) °C à l'issue de l'incubation habituelle, et de reporter la lecture, pour une durée inférieure à 24 heures. 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.

La durée acceptable de conservation doit être vérifiée pour chaque méthode et chaque type d'échantillon (NF EN ISO 8199 §9.1.6.1).

Piste de Réflexion

- ✓ Quelle(s) organisation(s) le laboratoire a-t-il mis en place pour les incubations se terminant les jours chômés ?

7.5.2 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.

A noter que cet algorithme ne concerne que les températures basses. En effet, conformément à la norme NF EN ISO 8199, pour garantir une croissance optimale, les limites supérieures de la température d'incubation ne peuvent être dépassées.

Un exemple de schéma décisionnel est donné en annexe 1.

Piste de réflexion

- ✓ Le laboratoire a-t-il pris en compte les températures sélectives et notamment les limites hautes pour ses températures ?
- ✓ Les décisions sont-elles adaptées aux différentes situations/microorganismes ?
- ✓ Le laboratoire a-t-il suffisamment documenté ses choix ?



7.5.3 Pipettes, Micropipettes (et autres IVAP), Entonnoirs

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.6.2

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, conformément aux dispositions du document GEN REF 10. 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).

Piste de réflexion

Concernant les micropipettes (et autres IVAP) en location

- ✓ Le laboratoire est-il en mesure de démontrer que ces équipements sont vérifiés et jugés conformes avant leur mise en service (état de fonctionnement et statut de l'étalonnage) ?
- ✓ Des preuves de conformités aux spécifications de ces équipements au terme de leur période d'utilisation sont-elles disponibles ? (constat de vérification de fin de contrat, par exemple).
- ✓ Ces équipements sont-ils identifiés par le laboratoire pendant leur période d'utilisation (conformément aux dispositions du § 6.4.8 de la norme NF EN ISO/IEC 17025) ?

Concernant les consommables à usage unique (pipettes, entonnoirs)

- ✓ Lorsque leur utilisation a un impact sur le résultat, le laboratoire a-t-il documenté les moyens mis en œuvre pour vérifier que ces consommables lui permettent d'obtenir des résultats cohérents (linéarité) et une faible incertitude au regard de l'incertitude globale ? Ces choix sont-ils justifiés ?

7.5.4 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 Système International 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. Le laboratoire justifie et documente ses choix.

7.5.5 Centrifugeuse

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement des dispositions de contrôle de ce type d'appareils. Ce contrôle peut être métrologique et/ou biologique (rendement, comparaison inter-laboratoire, Contrôle Qualité Interne, ...). Le laboratoire justifie et documente ses choix.

7.5.6 Spectromètre de masse (MALDI TOF)

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement des dispositions de contrôle de ce type d'appareils utilisé pour l'identification des microorganismes. Ce contrôle peut être biologique, par exemple par le passage de souches appropriées de manière régulière (Contrôle Qualité Interne) et au moins après intervention du fabricant. Le laboratoire justifie et documente ses choix.



7.5.7 Spectrophotomètre

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement des dispositions de contrôle de ce type d'appareil. Il est attendu la vérification de la température, de la longueur d'onde et de l'intensité lumineuse. Ce contrôle peut être réalisé directement par le fournisseur ou en interne par des moyens appropriés. Le laboratoire justifie et documente ses choix.

7.6 Prélèvement et échantillonnage / Manutention des objets d'essai

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.3 - § 7.4 - §7.8
LAB REF 02 § 7.3- 7.8

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

Concernant l'ensemencement des échantillons, les délais de mise analyses doivent respecter les textes réglementaires et/ou normatifs de référence.

A noter que pour la recherche des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes selon la norme NF EN ISO 9308-1 (versions 2000 et 2014) et des Entérocoques intestinaux selon la norme NF EN ISO 7899-2 et conformément à la décision (note d'information n°849) de la commission AFNOR de microbiologie des eaux (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).

Pistes de réflexion

Dans le cas où le laboratoire n'est pas accrédité pour le prélèvement ou que celui-ci est réalisé par le client :

- ✓ Le laboratoire s'assure-t-il que les conditions de prélèvement et de transport permettent de préserver l'intégrité de l'échantillon ? (Par exemple, information préalable au client des règles et méthodologies de prélèvement, existence de procédure au sein du laboratoire décrivant notamment les conditions de transport, température et durée de conservation avant mise en analyse) ?
- ✓ Les prestations de prélèvement émises hors accréditation sont-elles rapportées dans le respect des exigences du référentiel d'accréditation (notamment celles de la norme ISO/IEC 17025 et du document GEN REF 11) ?

Concernant le transport et la réception des échantillons :

- ✓ Les enregistrements de suivi de la température sont-ils disponibles lorsque la durée de transport est supérieure à 8 heures (NF EN ISO 19458) ?
- ✓ Lorsque la durée de transport est inférieure à 8h, le laboratoire a-t-il vérifié que les enceintes de transport permettaient de maintenir une température de (5+/-3)°C pour les échantillons (hors légionelles) (FD T 90-520) ?
- ✓ Des réserves sont-elles prévues sur les rapports lorsque les critères d'acceptation des échantillons à réception, susceptibles d'influencer l'interprétation des résultats ne sont pas respectés ?
- ✓ L'organisation mise en place, permet-elle de respecter les délais de mise en analyse ?
- ✓ Lorsque le laboratoire, en lien avec des situations exceptionnelles imprévisibles, (problème ponctuel d'acheminement, problème ponctuel technique au sein du laboratoire, ...) ne peut respecter le délai prévu, la justification du dépassement est-elle documentée ?
- ✓ Le non-respect du délai de mise en analyse est-il récurrent ?



Concernant les flaconnages utilisés

- ✓ Le laboratoire vérifie-t-il la conformité des flacons de prélèvements en fonction des analyses à réaliser (stérilité, concentration en neutralisant, apyrogénicité et absence d'adsorption d'Endotoxines, ...) ?
- ✓ Le laboratoire est-il en mesure de démontrer que les contrôles qu'il réalise et les certificats des fournisseurs apportent des garanties équivalentes ?

7.7 Validité des résultats d'essai

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.7
LAB REF 02 § 7.7
NF EN ISO 8199

Le laboratoire peut réaliser une analyse de risque pour justifier les moyens décidés pour assurer la validité des résultats.

7.7.1 Consommables

Verrerie et consommables stériles

Piste de réflexion

- ✓ Les matériels et verreries stériles sont-ils facilement identifiables ?
- ✓ La vérification de la stérilité de la verrerie et des consommables est-elle prévue ?

Consommables de filtration (Membranes, cartouches, ...)

Conformément aux normes NF EN ISO 8199 et/ou NF EN ISO 11133, il convient d'utiliser la norme NF EN ISO 7704 pour contrôler le taux de récupération des membranes dans le cadre des analyses microbiologiques.

Si les indications du fournisseur permettent de vérifier que le niveau de dépression du système de filtration est d'environ -70Kpa, il n'est pas nécessaire de le vérifier, toutefois le laboratoire s'assure du bon fonctionnement de son système.

Pour vérifier la conformité des cartouches utilisées pour la concentration des eaux en vue du dénombrement des oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* selon la norme NF T 90-455, l'exploitation des résultats des rendements est admise.

D'autres systèmes de filtration peuvent être utilisés dans le domaine, notamment en virologie (entérovirus, bactériophages, ...). Il appartient au laboratoire de justifier et de documenter ses choix, lorsque les modalités de vérification ne sont pas décrites dans les méthodes.

Milieux de culture et réactifs

Lorsque rien n'est précisé dans les méthodes concernant le contrôle des milieux de culture ou des réactifs, ce sont la norme NF EN ISO 11133 et/ou le fascicule FD T 90 461 qui s'appliquent, conformément à la norme NF EN ISO 8199.

Cas des milieux de culture achetés prêts à l'emploi

Dans le cadre de la mise en œuvre de la norme NF T 90-431, le milieu GVPC (Glycine Vancomycine Polymyxine Cycloheximide) étant utilisé à la fois pour le dénombrement en direct et pour le dénombrement après concentration par filtration, il devrait être contrôlé selon les §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 (§ 7.2 de la norme NF EN ISO 11133) peut être réalisé.

Pistes de réflexion

- ✓ Les dates d'ouverture, de préparation et de péremption des milieux et réactifs sont-elles traçables ?
- ✓ Le laboratoire a-t-il défini un temps maximal pour le maintien en surfusion des milieux thermosensibles ?
- ✓ Le processus de confirmation des colonies est-il intégré dans le plan de contrôle ? (Vérification de l'aspect des colonies ou des réactions colorées avec des souches de collection cibles et non cibles, par exemple)

Concernant les milieux et réactifs préparés par le laboratoire

- ✓ Le laboratoire contrôle-t-il la qualité de l'eau conformément à la norme NF EN ISO 11133 ?
- ✓ Tous les lots (eau, milieux, réactifs) produits par le laboratoire sont-ils contrôlés ?

Concernant les milieux de culture achetés prêts à l'emploi

- ✓ La fréquence des contrôles est-elle adaptée à l'activité du laboratoire ? Le laboratoire a-t-il justifié et documenté ses choix ?
- ✓ Les normes mentionnées sur les certificats fournisseurs sont-elles en adéquation avec les besoins du laboratoire ?

7.7.2 Surveillance de la validité des résultats

L'analyse de risques et/ou l'identification des sources d'incertitudes permettent de définir les contrôles qualités à mettre en œuvre et leur fréquence, conformément à la norme au §12.2.2 de la norme NF EN ISO 8199.

Contrôles qualité internes

Il existe différents types de contrôles qualité internes : les témoins positifs, les témoins négatifs (non cibles), les témoins négatifs (inhibition) et les essais à blancs, dont les caractéristiques de chacun sont précisées dans le §12.2.2.1 de la norme NF EN ISO 8199.

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

Ils ne se substituent pas aux déterminations de rendements réalisées dans le cadre des contrôles de performances quand elles sont imposées par des méthodes.

Pistes de réflexion

- ✓ Les moyens de contrôle sont-ils adaptés à l'activité du laboratoire (pertinence de la fréquence par rapport au volume d'échantillon, nature des contrôles mis en œuvre, ...) ?
- ✓ En cas de résultat non satisfaisant, une analyse des causes et de l'impact sur les essais est-elle prévue ?

Note : 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 ».



7.7.3 Surveillance de la performance des laboratoires

Conformément à la norme NF EN ISO/IEC 17025, sauf exigences réglementaires particulières, le laboratoire doit, lorsqu'ils existent et sont appropriées, participer à des essais d'aptitudes pour démontrer ses compétences et assurer la qualité de ses résultats.

Lorsqu'aucun programme d'essais d'aptitude n'existe, ou qu'il n'est pas possible de participer à une comparaison interlaboratoires, il appartient au laboratoire, pour assurer la cohérence de ses résultats et la performance de sa méthode, de corréliser ses résultats avec ceux d'autres laboratoires, de réitérer ses analyses à l'aide de méthodes équivalentes ou de recourir à l'utilisation régulière de matériaux de référence.

Pistes de réflexion

- ✓ Le plan de participation aux essais d'aptitudes couvre-t-il l'ensemble de la portée du laboratoire (paramètres, matrices, principes lorsque plusieurs sont possibles pour une même norme, ...)?
- ✓ Les moyens mis en œuvre par le laboratoire pour assurer la cohérence de ses résultats et la performance de sa méthode, lorsqu'il n'existe pas d'essais d'aptitude, sont-ils pertinents?
- ✓ La revue du plan de participation aux essais d'aptitude comprend-elle les paramètres pour lesquels il n'y avait pas de programme existant?

7.8 Rapport sur les résultats

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.8
LAB REF 02 § 7.8

7.8.1 Rapport d'essais

Il convient, *a minima*, que la date de mise en analyse soit précisée dans le rapport. Il n'est pas acceptable de n'avoir aucune date d'analyse sur le rapport.

Par ailleurs, la date et l'heure de prélèvement, étant nécessaires à l'interprétation des résultats, elles figurent sur les rapports d'essais.

Expression des résultats pour les faibles numérations :

L'expression des résultats définie dans les normes analytiques est applicable, sauf si elle ne permet pas de conclure par rapport aux seuils définis dans les textes réglementaires et/ou des référentiels demandés par le client (dans le cadre du contrôle sanitaire, par exemple).

Pistes de réflexion

- ✓ Les informations présentes dans le rapport sont-elles conformes aux exigences normatives et réglementaires, le cas échéant?
- ✓ Les informations fournies par les clients sont-elles bien identifiées?
- ✓ Les informations relatives au traitement de l'échantillon (congélation pour les *Daphnia magna*, filtration sur site ou en laboratoire pour les oocystes de *Cryptosporidium* et kystes de *Giardia*,...) sont-elles indiquées dans le rapport?

7.8.2 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.



Dans le cadre réglementaire, le laboratoire utilise les méthodes référencées dans la réglementation pour déclarer la conformité.

Pistes de réflexion

- ✓ Lorsque des déclarations de conformité sont émises, la règle de décision (comprenant l'origine des critères) est-elle indiquée dans le rapport ?

7.9 Recommandations particulières

7.9.1 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.

7.9.2 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.

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

Pistes de réflexion

- ✓ Les contrats font-ils mention des restrictions liées à sa portée, lorsque le laboratoire n'est pas accrédité pour tous les types de matrices ou tous les principes de la norme ?
- ✓ Le laboratoire a-t-il documenté la gestion des échantillons qu'il ne peut pas analyser (refus d'échantillons, sous-traitance, ...) ?

7.9.4 Spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs selon la norme NF EN 26461-2

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

Pistes de réflexion

- ✓ Le laboratoire a-t-il un moyen de maîtriser la durée du traitement thermique des échantillons (flacon témoin à chaque analyse, validation périodique de la durée de montée en température, par exemple) ?
- ✓ Si le laboratoire a opté pour une vérification périodique, le bain d'eau a-t-il été caractérisé et la température est-elle maîtrisée ?

La maîtrise des conditions d'anaérobiose est-elle démontrée ?



ANNEXE N° 1 : EXEMPLE A TITRE INFORMATIF DE SCHEMA DECISIONNEL EN MICROBIOLOGIE DES EAUX

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

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI