

「認定の基準」についての指針
— 微生物試験 —

JAB RL359 : 201~~3~~4

第3版：2014年~~5~~月~~1~~日

第2版：2013年9月1日

第1版：2004年2月1日

公益財団法人 日本適合性認定協会

目次

はじめに	3
序文	4
1. 適用範囲	4
2. 引用文書	4
3. 用語及び定義	4
4. 管理上の要求事項	4
5. 技術的要求事項	4
5.1 一般	4
5.2 要員	4
5.3 施設及び環境条件	5
5.4 試験の方法及び方法の妥当性確認	8
5.5 設備	10
5.6 測定のトレーサビリティ	14
5.7 サンプルング	15
5.8 試験品目の取扱い	15
5.9 試験結果の品質の保証	16
5.10 結果の報告	17
附属書 A1 校正及び校正のチェックに関する指針 (EA-4/10の附属書 Dに対応する)	19
附属書 B2 「設備の妥当性確認及び性能の検証に関する指針」 (EA-4/10の附属書 Eに対応する)	20
附属書 C3 「設備の保全に関する指針」 (EA-4/10の附属書 Fに対応する)	22
附属書 4 「微生物試験所が妥当性確認／検証時に用いる対象品目(食品・飼料)分類表 23	
JAB「認定の基準」についての指針 - 微生物試験 - 附属書 I	2324
JAB「認定の基準」についての指針 - 微生物試験 - 附属書 II	4546

「認定の基準」についての指針(案)

－ 微生物試験 －

はじめに

本文書は、公益財団法人日本適合性認定協会（以下 JAB）が JIS Q 17025 (ISO/IEC 17025)「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」を微生物試験分野の試験所認定に適用するに際しての指針を示すものである。

この文書は、JIS Q 17025 (ISO/IEC 17025)の要求事項を、微生物試験分野に合わせて詳細化し、微生物試験を実施する試験所及び審査員が審査の際に考慮すべき内容を示したものである。従って、ここに示す指針は、JIS Q 17025 (ISO/IEC 17025)の要求事項を超えるものではない。

従来、JAB では、微生物試験を行う試験所に対しては、技術指針として JAB RL358-2001（注 1）に加えて、JAB RL355-1998（注 2）を適用してきたが、最近の試験所認定分野の拡大と多様化に伴い、JAB RL 358-2001 に替わる独立した微生物試験についての指針の必要性が生じてきた。そうした要請に応じて、本文書は微生物分野に対し適用する指針として作成された。現在文書番号 RL358 を分子生物学的試験の認定指針で使用している。区別するため、本文書では JAB RL358-2001 を「旧 358」と記載する。

本文書は、欧州各国の認定機関の協力機構である欧州認定協力機構（European co-operation for Accreditation : EA ）(1998 年設立)が微生物試験を行う試験所に対して作成した指針「EA-4/10 Accreditation for Microbiological Laboratories, Edition 2, April 2002」が根幹である。更に、JAB RL355 の改定（1998 年版から 2003 版への移行）、並びに JAB RL358-2001 を廃止する機会に、これら 2 種類の指針の中から JAB RL359 の指針とするものを付け加えている。

本文書において、序文以下 5.10.9 までの項番号は JIS Q 17025 の項番号にそのまま対応する。

本文書は、JAB が JIS Q 17025 (ISO/IEC 17025)に基づき認定する微生物試験を行う試験所に対して適用する指針であり、食品衛生法で規定された総合衛生管理製造過程（HACCP システム）及び業務の管理（GLP システム）に基づく試験所の登録に影響を及ぼすものではない。

本文書は本文（指針）及び附属書で構成されている。本文は微生物試験を行う試験所及び認定審査をする審査員が、JIS Q 17025 (ISO/IEC 17025)を解釈する上で必要であり、JIS Q 17025 (ISO/IEC 17025)の要求事項を超えることがなく、また JIS Q 17025 (ISO/IEC 17025)と直接重複していないものを微生物試験分野の指針として定めたものである。附属書 I は、「EA-4/10 Accreditation for Microbiological Laboratories, Edition 2, April 2002」を翻訳したものであり、附属書 II は「EA-4/10 Accreditation for Microbiological Laboratories, Edition 2, April 2002」の原文（英語）である。

本文書は、JAB 食品・医薬品・微生物試験所認定プログラム分科会－細菌検査試験所認定プログラム小委員会(現食品分科会)の監修を経て、JAB 試験所技術委員会において承認されたものである。また、日本語版の出版については、欧州認定協力機構（EA）から許可を得ているものであるが、翻訳時より変更が必要と判断した箇所については、本

文書改訂時に食品分科会が確認し、修正している。該当箇所については記号「*」を付けている。翻訳について疑義が生じた場合は、原文に戻って、その解消を図るものとする。

本文書の指針は、「shall」及び「should」を含む欧州認定協力機構（EA）の認定指針を翻訳し、それに準じているが、「shall」及び「should」については、「…する。」及び「…することが望ましい。」と読み替えて適用するものとする。

- ・注 1) 「認定の基準」についての指針 -食品及び医薬品における化学試験並びに食品微生物試験- は現在廃版である。当時の文書から引用しているが、その後変更が必要と判断した箇所については本文書改訂時に修正している。該当箇所については記号「*」を付けている。文書番号「RL358」は 2013 年現在、分子生物学的試験の認定指針として使用している。
- ・注 2) 「認定の基準」についての指針 -化学試験-

【その他引用文書について】

- ・ ISO/TS 19036 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determination
内容については原文を参照されたい。
- ・ CAC/GL 54-2004 GUIDELINES ON MEASUREMENT UNCERTAINTY
内容については原文を参照されたい。
- ・ CITAC/EURACHEM GUIDE Edition 2002
日本語訳は、JAB化学分野技術委員会が監修したものである。日本語版の出版については、岡本研作氏（当時 CITAC Chairman）及びその作業部会の幹事から岡本氏を通じて許可されている。なお、原文（英文）及び日本語版は、JAB RL355（化学試験）の附属書を参照されたい。

序文

1. 適用範囲

2. 引用規格

3. 用語及び定義

4. 管理上の要求事項

5. 技術的要求事項

5.1 一般

5.2 要員

5.2.1

- ・ EA-4/10 2.1

微生物試験は、微生物学に関連する学科を修了し、かつ知識、技能を持つ者、或い

はその者の監督下で実施することが望ましい。別の資格として、試験所の認定範囲に関係する広範囲の妥当な経験を持つ職員であれば、要求を満たしているであろう。要員は、監督なしで認定範囲を扱う業務を実施することを許可される前に、或いは認定範囲の監督の経験があると見なされる前に、広範囲な実践経験を持つことが望ましい。特定の国家法令は、この文書で与えられる指針に優先させることができる。

• EA-4/10 2.3

ある試験方法や操作技術が通常実施されていない場合は、着手する前に要員の技能の検証が必要である。

• 旧 RL358 5.2.1

教育・訓練記録、現在の分析能力（即ち、管理図等）及び教育・訓練の要求内容のレビューは定期的に行う。その時、再検討の必要性を審査すること。必要ならば、再検討を実行し文書化する。

備考：再検証の必要性は、長期間特定の分析を行っていない個々の要員に必要である。

備考：プロセスに従事する各要員は、教育・訓練及び経験があること。即ち、与えられた業務に適切であること。試験業務及び品質手順の監視は、品質システムに矛盾のない操作を実施するために必要な適切なレベルの経営資源を供給するように開発すること。監督者及び経営者に報告する要員の数は、組織内の仕事の流れの変化に基づいて確立すること。

• 旧 RL358 4.2.2

この指針の下で活動しているすべての要員は、毎年品質システムの教育・訓練を受け、品質システムを維持する上での役割及び責任を持たなければならない。

5.2.2

• EA-4/10 2.3

試験所の管理主体は、すべての要員が試験に適切な技能と設備の操作のための相応の訓練を受けることを確実にする。これには、例えば、無菌操作、平板培地への注入、コロニーの計数等、客観的条件を用いて決定された受け入れ可能な程度の基礎技術の訓練を含めるべきである。試験の能力を確認する間隔の条件は、確立され文書化されることが望ましい。微生物の同定や確認のための試験結果の解釈は、実施試験者の経験が強く関係しており、定期的に試験者ごとに監視されることが望ましい。

5.2.5

• EA-4/10 2.4

要員の能力評価は、試験方法よりもむしろ特定の技術や装置毎の能力と関係づけることの方がより適切な場合もある。

5.3 施設及び環境条件

5.3.1

• EA-4/10 3.1.1

一般に試験施設に対して特定の環境要求事項がある。実施する試験のタイプによって微生物学的試験所への立入は、権限が付与された要員に制限するのが望ましい。このような制限が実施される場所では、要員は次のことを承知していることが望ましい。

(a) 特定区域の使用目的

- (b) 特定区域内での業務上の制限
- (c) このような制限を課す理由
- (d) 適切な封じ込めのレベル

• EA-4/10 3.1.2

試験所は実施する試験のタイプによって重大となる交差汚染のリスクを最小限にするように整備されることが望ましい。これらの目的を達成する方法は、例えば、以下に示される。

- (a) 試験所を「人、空気、物の流れを逆行させない (no way back)」の原則で建設する。
- (b) 試験及び試料の完全さを確実なものとするために適切な予防措置を講じて（例えば、密閉コンテナの使用）順序だった方法で手順を実施する。
- (c) 時間や空間によって活動を分離する。

• EA-4/10 3.1.3

一般的に以下に示す分離した場所、或いは明確に指定された区域の設計を持つことで、良好な実施とみなされる。

- 試料の受領と保管区域
- 試料調製区域（例えば、高濃度汚染しやすい粉末製品の調製のためには隔離された区域が使用されることが望ましい。）
- 培養を含む試料の試験区域
- 標準微生物の調製区域
- 滅菌を含む培地と設備の準備区域
- 無菌的操作区域
- 汚染除去区域

洗浄のための区域（汚染除去後）は、もし微生物の成育に悪い影響をもたらす微量の物質の移動を防ぐ必要な予防措置がとられるならば、試験所の他の部署と共有しても良い。物理的な分離の必要性は、試験所の活動の特殊性（例えば、試験実施の数量や種類）を基礎にして判断することが望ましい。試験所の設備は、不慮の交差汚染を避けるために区域間を日常的に移動しないことが望ましい。分子生物学的手法を用いる試験所においては、専用ピペット、チップ、遠心分離器、チューブ、PCR（核酸増幅装置）等は、業務区域（低—中—高濃度 DNA 作業環境）毎に設置されることが望ましい。

• EA-4/10 3.1.4

区域の広さは、清潔さと整理が維持される業務区域として、許容される十分な広さがあることが望ましい。要求される区域の広さは、試験所が扱う分析の量や内部組織全体につり合っていることが望ましい。

• EA-4/10 3.1.5

試験室は、適切に換気がされ、また適温であることが望ましい。これは、自然換気でも強制換気、或いはエアコンディショナーの使用によってであっても良い。エアコンディショナーが使用される場合には、フィルターは適切であると共に検査され、保全が持続的であり、さらに実施される業務の種類によっては交換されることが望ましい。

• EA-4/10 3.1.6

汚染防止は、以下の事項等を実践することによって達成できる。
- 壁、天井、床及び作業台における滑らかな表面（表面の滑らかさは、いかに容易に清

掃できるかにより判断される)とする。タイルは、作業台の被覆材料として推奨されない。

- 床、壁、天井の間の接続をなめらかな凹状とする。
- 試験が実施される間の窓、扉の開きを最小限にする。
- 日よけは室外に設置する。
- 日よけの室外設置が無理な場合、室内の日よけの清掃は容易にできるようにする。
- 流体用の配管類を作業場所の上を通さないようにし、通す場合には被覆収納し、むきだしのままにしないようにする。
- 換気設備の吸気口には防塵フィルターを設置する。
- 手洗い設備の分離、なるべく自動とする。
- 戸棚は天井に至るまでの高さとする。
- 未加工でむき出しの木製品の設備にしない。
- 設備や備品の木製表面は相応の被覆をする。
- 保管された物や設備は、容易に清掃できるように整理、整頓する。
- 試験業務に直接必要のない什器や文書又はその他の物を置かない。

このリストは、完全なものではなく、そして全ての例があらゆる場合に適用されるわけではない。天井は、理想的には平面照明で滑らかな表面にすることが望ましい。これが無理な場合（つり天井やつり下げ照明のように）には、試験所は、結果への衛生学的リスクを管理する文書化した証拠を持ち、その衛生学的リスクを克服する効果的手段（例えば、表面の清掃や検査の計画）を持つことが望ましい。

• EA-4/10 3.1.7

試験所が工場構内にある場合には、要員は生産区域からの汚染の可能性を承知していなければならない。また、このような事態を避けるために適切な処置がとられていることを証明することが望ましい。

• 旧 RL358 5.3

化学薬品、試薬及び設備の保管、使用並びに処分の手順は、適用される法的規制に従わなければならない。試験所で使用される*安全データシート(Safety Data Sheets; SDS)は、試験所要員すべてが利用できるようにするのが望ましい。

5.3.2

• EA-4/10 3.2.1

適正な環境監視計画は、例えば、落下微生物検査用プレートの使用や表面拭き取り等を含んだ計画が工夫されることが望ましい。その際には、許容できるバックグラウンド値を明らかにし、さらに限度を超えた場合を扱うための文書化された手順を持つことが望ましい。データの解析は、汚染レベルにおける傾向を明確にできることが望ましい。

• EA-4/10 3.3.1

試験所の備品、設備及び作業面のための文書化された清浄計画があることが望ましい。それには、環境監視の結果や交差汚染の可能性を考慮することが望ましい。また、漏出の際の対処方法があることが望ましい。

• EA-4/10 3.3.2

十分な保管場所を準備し、試験所において文書業務を最小限とすることや試験所業務区域から植物や個人の所有物を禁止することによって、塵の蓄積を避ける対策が取られることが望ましい。

- EA-4/10 3.3.3

実施される試験の種類に応じた着衣（必要な場合は、髪の毛、あごひげ、手、靴等の覆いを含める）は、微生物試験所内で身につけ、そして区域を去る前に脱ぐことが望ましい。これは、分子生物学試験所にとって、例えば気づかない交差汚染を引き起こすかもしれない高濃度 DNA の区域から低濃度 DNA 区域に移動するような場合は、特に重要である。多くの試験所では、実験用着衣で十分であろう。

- 旧 RL358 5.3.3

備考「他の作業からの汚染を受け易いか、又は特定の問題若しくは危険を惹起するある種の作業は、日常的に隔離する必要がある。例えば、高レベルの発生源から物理的に分離する必要がある菌株培地の調製、微量分析など、及び発がん性物質の分析である。特別な作業に指定する区域の選択に当たっては、その区域が以前何に使用されていたかを考慮しなければならない。使用の前に、その区域が汚染されていないことを確実にするためにチェックすることが望ましい。作業を開始した時は、その区域へのアクセスは規制されることが望ましい。そこで引き受ける作業の種類は注意深く管理されることが望ましい。」

5.4 試験の方法及び方法の妥当性確認

5.4.1 一般

- 旧 RL358 5.4.1

多くの場合、“公定法（Official Methods）”及び“法的に定められた標準法（Legal Reference Methods）”は法律で公布され、条文のとおりそのまま採用されるのが望ましい。

- 旧 RL358 5.4.2

備考：食品及び医薬品の方法の大部分は、AOAC インターナショナル（AOAC）、米国農務省（USDA）、米国食品医薬品局（FDA）、米国環境保護局（EPA）、米国油化学会（AOCS）、米国穀物化学会（AACC）、国際標準化機構（ISO）、国際純正応用化学連合（IUPAC）、米国薬局方（USP）、米国食品添加物規格（FCC）、食品規格委員会（FAO/ WHO CAC）及び Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater の方法マニュアルにある。

多くの業界団体、例えば国際酪農連盟（IDF）は、団体自身の方法を開発し、有用な出版物を提供している。

5.4.5 方法の妥当性確認

- EA-4/10 4.1

微生物学的試験方法の妥当性確認は、実際の試験状態を反映することが望ましい。これは、自然に汚染された製品や前もって汚染微生物数が確定されたものをスパイクした製品を用いることによって達成されると言って差し支えない。マトリックスに対する汚染微生物の添加は、自然に生息している汚染微生物の存在を単に見かけ上模倣しているにすぎないことを分析者は、承知していることが望ましい。しかしながら、この方法は、しばしば最良の方法であり唯一有効な解決法である。妥当性確認の必要性の程度は、試験方法とその適用法による。試験所は、標準試験法が標準の手順に明示されていないマトリックスに適用される場合には妥当性確認をする。

[マトリックスの影響を評価する場合、付属書 4「微生物試験所が妥当性確認／検証](#)

時に用いる対象品目(食品・飼料)分類表」を利用できる。

• EA-4/10 4.2

結果が検出／不検出や確認及び同定の手順によって表現されるような定性的な微生物学的試験方法は、もし適切であるならば、特異性、相対真度、正の偏差、負の偏差、検出限界、マトリックス効果、繰返し性及び再現性を決定することによって妥当性確認されることが望ましい（定義は EA-4/10 の付属書 A を参照）。ISO16140（食品）、ISO13843（水）、ISO4831 を参考にする。

5.4.5.3

• EA-4/10 4.3

定量的な微生物学的試験方法の場合、特異性、感度、相対真度、正の偏差、負の偏差、繰返し性、再現性及び決められた変動の範囲で定量限界が考慮され、また必要な場合には、分析結果において定量的に決定されることが望ましい。マトリックスに起因する相違は、別の種類の試料を試験する時には考慮しなければならない。結果は、適切な統計学的方法で評価されることが望ましい。

• EA-4/10 4.4

試験所は、試験所において使用した市販の微生物検出キットにおける妥当性確認データを保持する。これらの妥当性確認データは、共同試験を通して、また製造業者によって提出され、第三者機関（例えば、AOAC）の評価を受けた妥当性確認データとして入手できる。もし、妥当性確認データが入手できないか、或いは全面的には適用できないならば、その試験所は、試験の妥当性確認を完全に仕上げる責任がある。

• EA-4/10 4.5

もし、試験方法の変更版が、原法と同様の仕様であることを論証する必要があるならば、その際の比較は、論証の証拠事例であることを確実にするために繰返し試験用の試料を用いて実施されることが望ましい。試験計画や結果の解析は、統計学的に妥当でなければならない。

• EA-4/10 4.6

たとえ妥当性確認が完全であっても、その利用者は日常業務の中でさらに、文書化した性能が通常の業務下でも満たされていることを、例えば、スパイクされた試料或いは関連するマトリックスに混ぜ込んだ標準物質を用いることによって検証することが望ましい。

5.4.6

- ISO/TS 19036
- CAC/GL 54-2004

5.4.6.2

• EA-4/10 5.1

測定の不確かさのための国際定義は、*TS Z 0032:2012「国際計量計測用語 – 基本及び一般概念並びに関連用語(VIM)」に規定されている。欧州認定機関によって推奨されている試験における不確かさの評価及び表現の一般的な取り組みは* TS Z 0033:2012「測定における不確かさの表現のガイド」によって作成された提唱に基づいている。

• EA-4/10 5.2

微生物学的試験は、一般的に、厳密で計量学的及び統計学的に意味のある測定の不確かさの計算ができない試験の部類に入る。一般的に不確かさの見積りには、繰返し性や再現性のデータだけでなく、理論的にはかたより（例えば、技能試験結果から）を含めたデータを基づかせるのが適切である。不確かさの個々の構成成分は、識別されていること並びに評価結果の変動に対する寄与が確認され、かつ証明されることが望ましい。

いくつかの構成成分（例えば、ピペット操作、秤量操作及び希釈の影響）は、直ぐに測定でき、不確かさ全体に対する寄与が無視できることを容易に証明することができる。他の構成要素（例えば、試料の安定性や試料調製）は、直接には測定できないし、それらの寄与は統計学的方法においても評価できないが、結果の変動性に対する重要性は、同様に、考慮に入れることが望ましい。

5.4.6.3

• EA-4/10 5.3

微生物学的試験を認定された試験所は、試験するマトリックス中の微生物の分布についての知識を持ち、サブサンプリングにおいてこれを考慮に入れることが望まれる。JABは不確かさにおけるサブサンプリングの要因を検討することを要求するが、顧客からの特別な要求指示がなければ、不確かさの見積りに含めることは勧められない。その主な理由は、製品マトリックス中の微生物分布に起因する不確かさが、試験所能力の作用ではなく、試験した個々の試料に特有なものであるかもしれないからであり、試験方法は、不均一性を考慮して、用いられる試料量を指定することが望ましい。

• EA-4/10 5.4

不確かさの概念は、例えば検出試験或いは同定試験のための属性決定などの定性的な試験結果には、直接には適用できない。とはいっても、変動の個々の原因、例えば、試薬の性能の整合性や分析者の解釈が管理されていることが確認され、かつ証明されることが望ましい。さらに試験にとって検出限界が適合の重要な指標となっている場合には、限界を決定するために用いられた接種菌と関連した不確かさが見積られ、その有意性が評価されることが望ましい。試験所は、用いる定性試験に関連した結果の偽陽性及び偽陰性結果の発生率もまた承知していることが望ましい。

• 旧 RL358 5.4.6.3

できれば、標準物質又は*管理試料は、分析方法で日常的に試験されているものと同じマトリックスか又はよく似たマトリックスのものでなければならない。そのため、あるクラスのマトリックスに対する方法の不確かさを見積もることができ、変動は検出される分析対象成分の平均的な値で特定のマトリックスでの試験で、不確かさとして記述される。標準物質又は管理サンプルは、日常的に試験されているものと同じマトリックスか又はよく似たマトリックスを用い、マトリックス毎に不確かさを見積もり、記載する。

5.5 設備

5.5.1

• EA-4/10 6

品質システムの一部として、試験所は、保全、校正及び設備の性能検証の文書化された計画を運用することが要求される。

• EA-4/10 6.1.1

主要設備の保全は、使用頻度のような要素によって決定され、定期的な間隔で実施する。その際の詳細な記録は保存する。設備の保全やその間隔の事例は、付属書 F に示す。

• EA-4/10 6.1.2

器具に起因する交差汚染を避けるために、例えば以下の注意が払われることが望ましい。

- 使い捨て器具は、適宜消毒し滅菌する。
- 繰り返し使用するガラス器具は、適宜適切に消毒・洗浄し、滅菌する。
- 理想的には、試験所は、汚染除去のために別々のオートクレーブを持つことが望ましい。

しかしながら、汚染除去及び滅菌した物を分離するためにとられる適切な予防措置やオートクレーブの内外周囲での処理する場所を定める文書化された清潔操作プログラム等が準備されるならば、1台のオートクレーブが容認される。

• EA-4/10 6.1.3

代表的な、以下の設備は消毒・洗浄、取扱い、損傷の検査、一般的な確認、そして適切な滅菌によって保全される。

- 一般使用器具：ろ過装置、ガラス又はプラスチック容器（ビン、試験管）、ガラス又はプラスチックペトリ皿、試料採取装置、白金線又は白金耳、ステンレス製又は使い捨てプラスチック製器具等
- *水浴、インキュベータ、微生物用キャビネット、オートクレーブ、ホモジナイザー、冷蔵庫、冷凍庫等
- 容量器具：ピペット、自動分注機、スパイラルプレーター等
- 測定装置：温度計、タイマー、*はかり、pHメーター、コロニーカウンター等

5.5.2

• EA-4/10 6.2.1

試験所は、試験結果に直接影響を及ぼす設備の校正及び性能の検証のための計画を規定する。このような校正及び性能の検証の頻度は、記録された経験や必要性及び設備の種類と以前の性能に基づいて決定する。校正及び性能の検証の間隔は、設備の性能が許容限度を外れるのが発見されるより短い期間とする。校正の間隔と種々の試験所装置の代表的な性能確認の例は、付属書 D 及び付属書 E に示す。

• EA-4/10 6.2.2

温度測定器

- (a) 温度が試験結果に直接影響する場合、或いは設備の性能校正のために重要である場合には、温度測定器、例えばインキュベータやオートクレーブに使用されるガラス液体温度計、熱電対及び白金抵抗温度計(PRTs)は、要求された*真度を達成するために適切な品質にする。
- (b) 温度測定器の校正は、温度のための国家又は国際標準に対してトレーサブルでなければならない。その*真度が許容される場合、装置は適切であり、用いられる国家又は国際的に認められた製造規格（例えば、ガラス液体温度計のための ISO 1770）に適合していることを証明できる。このような装置は目的温度近くで許容誤差が容認される場合には、例えば、保管用冷蔵庫や冷凍庫そしてインキュベータや*水浴にもまた監視する目的で使用することができる。こうした温度測定器は性能の検証が必要である。

• EA-4/10 6.2.3

インキュベータ、*水浴、オーブン

温度の安定性、温度分布の均一性及びインキュベータ、*水浴、オーブンそして温度管理された試験室が平衡状態に達するまでに必要な時間は、特に代表的な使用（例えば、位置、空き間隔、ペトリ皿の積重ね高さ）に配慮して最初に規定し文書化する。装置の初期妥当性確認における特性記録の恒久性は、重要な修理や改善の後は確認し、記録する。試験所は、この種の装置の作動温度を監視し、記録を保持する。

• EA-4/10 6.2.4

オートクレーブ（培地調製装置を含む）

オートクレーブ処理された原料や物の定量的試験が、バッチ内及びバッチ間で一定の変動内にあることが適切に説明できれば、それも同等の品質保証を与えることになるということは認められている。

- (a) オートクレーブは、指定した時間と温度についての許容範囲を満足する性能を有しているべきである。操作過程を制御し監視するために使用されるセンサーは、校正及びタイマーの性能が検証されていることが要求される。
- (b) 初期妥当性確認は、操作の際に用いられるそれぞれの操作過程や滅菌品の装填の仕方に即した性能調査（空間温度分布測定）を含むのが望ましい。

この工程は、重要な修理又は改善（例えば、温度調節端子の交換、プログラム、装填装置、操作周期）後、又は培地の品質管理チェックの結果により必要とされた場合には、繰り返さなければならない。

初期妥当性確認に際しては、十分な数の温度センサーを可能な限り異なった位置の滅菌品中に（例えば、液体又は培地で満たされた容器に）置くことが望ましい。

均一な加熱が他の方法によって証明することができない培地調製装置の場合には、一つは制御端子の付近に、もう一つは、それから離れた位置に配置した二つのセンサーの使用が一般的に適切であると考えられる。

妥当性確認及び再妥当性確認は、滅菌温度での時間と同様に温度の上昇及び降下時間の適切さを考慮することが望ましい。

- (c) 妥当性確認／再妥当性確認の際には、代表的な使用に対して決定された加熱方法に基づいた明確な操作手順が規定されるのが望ましい。

受け入れる／受け入れない培地の基準が、立証されると共に、操作毎の温度や時間及び保全を含むオートクレーブ操作の記録をすることが望ましい。

- (d) 監視は、以下のうち的一方により達成することができる。

(i) 熱電対及びチャート作成やプリントアウト用レコーダーを使用

(ii) 直接観測し、到達した最高温度とその温度に到達するまでの時間を記録

オートクレーブの温度を直接監視することに加えて、各サイクルの操作の有効性は、滅菌／汚染除去確認用の化学的、生物学的インジケータを用いて確認することができる。オートクレーブテープ又は試験紙は、単に負荷をかけられていることを見るために使用されるべきであり、受け入れ可能の完全さを証明するために使用されることは望ましくない。

• EA-4/10 6.2.5

分銅及び*はかり

分銅及び*はかりは定期的に（使用の状況に応じて）トレーサブルな校正をする。

• EA-4/10 6.2.6

容量器具

- (a)自動分注器、希釈型分注器、自動ハンドピペット及び使い捨てピペットのような容量器具は、おそらく全て微生物試験所で使用されるであろう。試験所は、器具が要求される規格内に収まっていることを保証するために、最初に容量器具の検証を実施し、そして定期的な確認をすることが望ましい。検証は、許容誤差を保証されたガラス器具には必要とされない。但し、マイクロバイオアッセイ（含有抗生物質等）の場合は、検証したガラス器具を使用する。器具は、設定容量（可変容量の器具では、いくつかの異なる設定において）に対する供給容量の*真度を確認することが望ましい。そして、繰返しの供給容量の精度についても測定することが望ましい。
- (b)「一回使用」の使い捨て容量器具の場合、試験所は承認された適切な品質システムを持つ会社からの供給を得ることが望ましい。器具の適合性の初期確認後は、*真度の無作為チェックを実施することが推奨される。供給者が承認された品質システムを持っていないのならば、試験所は適正さを器具のバッチ毎に確認することが望ましい。

• EA-4/10 6.2.7

その他の設備

導電率計、酸素メーター、pHメーター及びその他の同様な装置は定期的に或いは各々の使用前に検証されるべきである。検証の目的に使用される緩衝液は、適切な条件下で保存され、期限日が記入されることが望ましい。湿度は、試験結果にとって重要である場合、湿度計は校正され、その校正値は、国家又は国際標準に対してトレーサブルであることが望ましい。遠心分離機が試験手順の中で使用される場合、遠心力の重要性が評価されることが望ましい。それが重要であれば、遠心分離機は校正が要求される。

• EA-4/10 7.1

試薬

試験所は、用いる試薬の品質が試験に対して適切である事を確実にすることが望ましい。試験結果を左右する試薬は、バッチごとに使用開始時と使用期限内において、承認された国或いは国際的微生物株保存機関の保存株にトレーサブルな陽性及び陰性対照微生物を用いて、その妥当性を確認することが望ましい。

• EA-4/10 7.2.1 7.2

試験所内調製培地

試験所内で調製した培地、希釈液及びその他の懸濁液の妥当性を、以下の事項に関して確認することが望ましい。

- 対象とする微生物の回収率又は生育性
- 非対象微生物の生育抑制性又は生育阻害性
- 生化学的特性（選択性及び特徴）
- 物理的特性（pH、量、無菌性など）

回収率又は生育性の評価のための定量方法については、ISO 11133 パート 1 及び 2 が優先される。

• EA-4/10 7.2.2

原料（市販の乾燥製品及び個々の構成成分）は、冷蔵、乾燥及び遮光等の適切な条件下で保存されることが望ましい。全ての容器、特に乾燥培地の容器はしっかりと密閉されることが望ましい。固まったり、ひび割れたり、又は変色した乾燥培地は、使用されることは望ましくない。また、試験方法に指定がない限り、殺菌剤や生育阻害・抑制物質の入っていない蒸留水、*イオン交換或いは逆浸透（RO）水を調製用を使用することが望ましい。

- EA-4/10 7.2.3

調製済培地の使用期限は、保存条件を規定し、妥当性を確認した上で設定する。

- EA-4/10 7.3.1

既成培地

調達した全ての市販の既成又は半既成培地(希釈液及び他の懸濁液についても)は、使用前に妥当性確認が要求される。回収率における性能の評価又は対象微生物の生育性及び非対象微生物の成育抑制性又は生育阻害性は、十分に定量的である必要がある。また、属性(例えば、物理的及び生化学的特性)は、客観的な基準により評価することが望ましい。

- EA-4/10 7.3.2

妥当性確認の一部として、ユーザーである試験所は、最低限、以下の情報を含んだ製造者の製品規格書を入手しておく必要がある。

- 培地の名称と添加成分を含む構成成分一覧

- 使用期限と適用した承認基準

- 保管条件

- 培地の規格／純度

- 滅菌性の確認

- 陽性及び陰性対照の生育試験に使用した微生物(培地メーカーの使用している標準微生物)及び容認基準

- 物理的性状確認と適用した容認基準

- 製品規格書の発行日

- EA-4/10 7.3.3

培地のバッチは、識別可能とする。受領された各々の培地は、検査成績書が添付されていることが望ましい。試験所のユーザーは、製品規格書に変更があった場合には、製造者によって確実に通知されるように手段を講じておくことが望ましい。

- EA-4/10 7.4

ラベル貼付

試験所は、すべての試薬(保存溶液を含む)、培地、希釈液及びその他の懸濁液について、妥当性、識別、濃度、保存条件、調製日、妥当性確認された有効期限及び／又は推奨される保管期限等の表示のため、適切なラベルを貼付することを確実にする。調製責任者が、記録から識別できることが望ましい。

5.6 測定の特レーサビリテイ

5.6.3 参照標準及び標準物質

- EA-4/10 8.1

標準物質

標準物質及び認証標準物質(付属書 A における定義を参照)は、以下のような目的で使用する場合、測定において基本的に特レーサビリテイを与える。

- 結果の*真度を実証するため、

- 装置の校正のため、

- 試験所の能力を監視するため、

- 試験方法の妥当性を確認するため、そして

- 試験方法の比較を行うため。

可能ならば、標準物質は、妥当なマトリックスで使用することが望ましい。

- EA-4/10 8.2 標準菌株 8.2.1

標準培養株は、培地（試験キットを含む）の受け入れ可能な性能を立証するためや方法の妥当性を確認するため、そして進行中の試験技能を査定／評価するために必要とされる。トレーサビリティは、例えば、試験キット及び方法の妥当性確認のため培地性能を立証する場合に必要である。トレーサビリティを証明するためには、試験所は、現存する国家又は国際的に承認された所蔵品から直接得られる微生物の標準系統株を用いなければならない。代替法として、使用間際にすべての関連特性が同等であることを試験所によって示される場合には、市販のものを使用してもよい。

- EA-4/10 8.2.2

ISO 11133-1における指針に従って、標準系統株は、標準保存株を準備するために、二次培養される。純度及び生化学的確認は、適切に並行して実施されることが望ましい。冷凍か真空凍結乾燥のどちらかで標準保存株を保存することが推奨される。

ルーチン使用される試験用培養株は標準保存株からの最初の二次培養株であるべきである（試験用保存株の調製については EA-4/10 の付属書 C を参照）。もし、標準保存株が解凍された場合は、再凍結や再使用をしてはならない。

- EA-4/10 8.2.3

試験用保存株は、それが必要とされており、そして標準試験法によって或いは関連特性に変化がないという証明書を提出できる試験所によって確認されるのでなければ、二次培養されるのは望ましくない。標準保存株の代わりに二次培養した試験用保存株を使用してはならない。標準系統株の市販のものは試験用培養株としてのみ使用することができる。

5.7 サンプルング

5.7.1

- EA-4/10 9.1

多くの場合、試験所は試験品を得るための一次サンプルングに対処できない。対処できる試験所では、このサンプルングは品質保証及び理想的には認定によってカバーされることが強く推奨される。

- EA-4/10 9.2

輸送と保管は、試料の保全性を維持する条件下（例えば、適切なチルド或いは冷凍）で行われるべきである。条件は、監視され、記録が維持されることが望ましい。サンプルングと試験所に到着するまでの間の輸送や保管のための適切な責任の所在について、明確に文書化する。試料の試験は、サンプルングの後できるだけ速やかに実施され、そして関連指針及び／又は、国家又は国際法規に従うことが望ましい。

- EA-4/10 9.3

サンプルングは、訓練された要員によってのみ実施されることが望ましい。滅菌した器具を使用し、無菌的に実施されることが望ましい。

- 旧 RL358 5.7.1

サンプルング及び分析法は、ともに分析評価の重要な構成要素であるので、試験を行う試験所は、この手順の一部分を実施する一方の当事者（サンプルング者、試験者）が、この指針に基づいて行っているかどうか注意しなければならない。

- CITAC/EUROCHEM GUIDE 11.14

封入は、容器から試料の漏れがないこと及び試料が汚染されないことを確実なもの

とるように適切であることが望ましい。例えば、試料が法的な目的のために採取された場合には、試料へのアクセスが封印シールを破ることによってのみ可能であるように、試料を封印することがある。通常、封印シールが十分な状態であることを確認し、分析報告書に記載する。

5.8 試験品目の取扱い

5.8.1

• EA-4/10 10.1

微生物叢は、温度や保管及び輸送の継続時間のようなファクターに感受性があるかもしれない。そこで、試験所による受領時での試料の状態を確認し、記録することは重要である。

• EA-4/10 10.2

どんな場合においても、試料の状態は、試験報告書に表示されることが望ましい。

• EA-4/10 10.3

試験所は、すべての関係ある情報及び特に次の情報を記録することが望ましい。

(a) 受領の日付、適切な場合、時間

(b) 受領時の試料の状態及び必要に応じて温度

(c) サンプルング操作の特記事項（サンプルング日、サンプルング条件等）

5.8.2

• EA-4/10 10.4

試験待機にある試料は、存在する微生物数の変化を最小限とするために適切な条件下で保存する。保存条件は、規定され記録されることが望ましい。

• EA-4/10 10.5

一度使用したパッケージとラベルは、高度に汚染されているかもしれないので、汚染の拡大を避けるために、相応の注意で取扱い、保管がされることが望ましい。

• EA-4/10 10.6

試験直前の試験所による二次サンプルングは、試験方法の一部と考えられる。実在するならば、国家又は国際的な指針によって、或いは妥当性確認された試験所内手順によって実施されることが望ましい。二次サンプルングの手順は、微生物の様な分布を考慮して設計されることが望ましい。(ISO 6887 及び ISO 7218 で与えられる一般的指針) 5.8.4

5.8.4

• EA-4/10 10.7

試料の保存及び廃棄の手順は、文書化する。試料は、試験結果が得られるまで、或いはもし必要とされたならば、より長期間保管されることが望ましい。試験所の試料の一部が高度に汚染されていることが判っている場合には、廃棄する前に汚染除去されることが望ましい (11.1 を参照)。

• EA-4/10 11.1

汚染した廃棄物の廃棄

汚染した物質の正しい廃棄は、試料分析の精度に直接の悪影響もたらすことはないであろうが、手順は試験環境や物質の汚染の可能性を最小限にするための設計を行うことが望ましい。しかしながら、それは GLP に関する問題であり、環境又は衛生及び安全のための国家又は国際法規 (ISO 7218 参照) に従うことが望ましい。

5.9 試験結果の品質の保証

• EA-4/10 12.1 内部品質管理 12.1.1

内部品質管理は、試験所業務の継続的な評価をするために、試験所が責任を負っているすべての手順より成り立っている。主要な目的は、日々の結果の堅実さや規定された基準に適合していることを保証することである。

• EA-4/10 12.2. 外部評価（技能試験） 12.2.1

試験所は、認定範囲に関連した技能試験へ定期的に参加し、技能試験計画のマトリックスから適切なものを選択することが望ましい。特別な場合には、参加が必須になることがある。

• EA-4/10 12.2.2

試験所は、単に試験所のかたよりを評価するだけでなく、品質システム全体の有効性を確認するために外部評価を利用することが望ましい。

• 旧 RL358 5.9

食品化学及び食品微生物試験所は、*真度及び各試料のバッチに関連する精度を決定するために品質管理手順をもつ。試験所は、各試料のバッチと同時に品質管理試料（QCS）を*適切な頻度（通常は 20 試料毎、又はそれ以下）で実施する。また、試験所は各試料のバッチと同時に管理試料又は*試料の繰返し試験を*適切な頻度（通常は 20 試料毎、又はそれ以下）で実施する。統計的プロセス管理図は品質管理試料（QCS）分析及び繰返し分析に対して作成する。*真度及び/又は精度の合否判定基準外である全ての管理試料に対して是正処置を取る。関係する試料バッチを公表することで合否判定基準に対して、試験所は上限管理限界及び下限管理限界（±標準偏差）を使用する。培地、及び毎日の工程管理チェックを含む日常ベースでの成績を評価するために、CRM (Certified Reference Material)、RM (Reference Material)、及び RC (Reference Culture) を使用する。試験前に入手できる文書化された手順に従って試験結果の妥当性を評価するために、これらのデータを使用する。適用できる場合、統計的工程管理（SPC）の手順を使用できる。すべての試験所は、毎日の試験と同時に、利用できる場合 CRC（+菌株）を、もしそうでなければ RC（+菌株）を使用した管理を行わなければならない。試験の有効性に関連がある場合、これらの結果を解釈するために手順及び方針がなければならない。適切な管理及び文書がある場合、この手順は、培地の許容性（試験と同時に）を検証するのに使用できる。適当な RM がある場合、反復試験を使用しなければならない。これらの物質及び技能試験用物質は、繰返し性（保存品目の再試験又は再校正）を改善するために使用する。品質管理の試料は、長期間にわたって分析に利用できるように、十分に安定でしかも十分な量が確保できる典型的な試料である。この期間での分析方法の能力変動は、QC 用試料の分析結果値を追跡することによって、通常は管理図にプロットすることによって監視できる。内部品質管理の試料分析の頻度は、結果の妥当性を確実にするのに、十分であることが望ましい。

• 旧 RL358 技能試験 3

特定のマトリクスによる認定が、関与する産業及び/又は政府機関次第で要求されることがある。依頼者及び/又は政府機関に受け入れられれば、単一のマトリクスで、方法に対するこの要求事項を達成するのに十分である。

- ・旧 RL358 技能試験 4

- 試験所技能の評価

- 外部のスキームが、その物質若しくは試験/方法にとって利用できないか、又は現存のスキームが、適切/実際的でない場合、試験所は適切な所内のスキームを開発し、方法を実施する力量及び許容できる結果を得る能力を実証しなければならない。

- ・旧 RL358 指針備考

- 所内技能サンプルを準備するのに使われる手順、頻度、結果を分析する方法、及びそれらの許容差を評価するのに使われる所内基準を明確に定義しなければならない。

5.10 結果の報告

- ・ EA-4/10 13.1

- もし、微生物数の測定の結果が陰性であった場合、「表示単位に対して、検出せず」或いは「表示単位に対して、検出限界以下」として報告されることが望ましい。結果は、一定の条件を付けずに、「表示単位に対して、0」として報告することは望ましくない。定性試験の結果は、「表示数量或いは容量に対して、検出又は不検出」として報告することが望ましい。また、規定微生物数が測定方法の検出限界より高く検出された場合には、顧客の同意のもとに「表示単位に対して、規定された微生物数以下」として表現することがある。

- ・ EA-4/10 13.2

- 試験結果の不確かさの推定を、試験報告書に記載する場合には、制限（推定の中に試料中の微生物の分布が関与した要因を含まない場合は特に）を、顧客に対して明確に示さなければならない。

付属書 ~~A1~~ 校正及び校正のチェックに関する指針 ~~(EA-4/10 の付属書 D に対応する)~~

校正及び校正のチェックに関する指針

この情報は、指針の目的のために準備され、そして校正及びチェックの頻度は、その設備の要求や種類及び以前の性能に基づいている。(EA-4/10 の付属書 D に対応する)

設備の種類	要求事項	示唆される頻度
参照温度計 (ガラス液体温度計)	トレーサブルの条件を満たした再校正	5 年毎
	一点 (例、氷点での確認)	1 年毎
参照用熱電対	トレーサブルの条件を満たした再校正	3 年毎
	参照温度計に対するチェック	1 年毎
実用温度計及び 実用熱電対	氷点温度及び／又は試験実施温度範囲 における参照温度計を用いたチェック	1 年毎
*はかり	トレーサブルの条件を満たした校正	1 年毎
校正された分銅	トレーサブルの条件を満たした校正	5 年毎
確認用分銅	校正された分銅を用いたチェック又は トレーサブルな校正をされた後の秤量 材を用いたチェック	1 年毎
容量ガラス器具	要求される許容限度に対する重量測定 による校正	1 年毎
顕微鏡	ステージマイクロメーターのトレーサ ブルな校正 (適切な場合)	据付時
湿度計	トレーサブルな校正	1 年毎
遠心分離機	トレーサブルな校正又は適切な場合、 独立した回転計を用いたチェック	1 年毎

付属書 B-2-設備の妥当性確認及び性能の検証に関する指針(EA-4/10の付属書 Eに対応する)

— 設備の妥当性確認及び性能の検証に関する指針 —

この情報は、指針の目的のために準備され、そして設備の妥当性確認及び性能の検証の頻度は、その設備の要求や種類及び以前の性能に基づいている。(EA-4/10の付属書 Eに対応する)

設備の種類	要求事項	示唆される頻度
温度制御された装置 (インキュベータ、 *水浴、 冷蔵庫、冷凍庫)	(a) 温度の安定性及び均一性の立証	(a) 据付時、2年毎及び 修理又は改善後
	(b) 温度の監視	(b) 日毎又は使用毎
滅菌器	(a) 温度の安定性及び均一性の立証	(a) 据付時、2年毎及び 修理又は改善後
	(b) 温度の監視	(b) 使用毎
オートクレーブ	(a) 稼働/周期の特性を立証	(a) 据付時、2年毎及び 修理又は改善後
	(b) 温度及び時間の監視	(b) 使用毎
安全キャビネット	(a) 性能の立証	(a) 据付時、1年毎及び 修理又は改善後
	(b) 微生物学的監視	(b) 週毎
	(c) 空気流の監視	(c) 使用毎
ラミナーエアフロー キャビネット	(a) 性能の立証	(a) 据付時、及び修理 又は改善後
	(b) 滅菌プレートでチェック	(b) 週毎
タイマー	国家標準時報に対してチェック	1年毎
顕微鏡	光軸調整のチェック	日毎又は使用毎
pHメーター	適切な品質の少なくとも2種の緩衝液を用いて調整	日毎又は使用毎
*はかり	ゼロ点確認及び確認用分銅による読みの チェック	日毎又は使用毎
*イオン交換装置及び 逆浸透装置	(a) 導電率のチェック	(a) 週毎
	(b) 微生物汚染のチェック	(b) 月毎
重量測定式希釈装置	(a) 分注量の重量チェック	(a) 日毎
	(b) 希釈率のチェック	(b) 日毎
培地分注器	分注量のチェック	調整又は交換時
ピペッター又は	分注量の*真度と精度チェック	定期的 (通常使用される 頻度及び使われ方を考慮

ピペット		して規定される)
スパイラルプレーター	(a) 通常の方法に対する性能の立証	(a) 据付時及び1年毎
	(b) 開始時、終了時の注入針のチェック	(b) 日毎又は使用毎
	(c) 分注量のチェック	(c) 月毎
コロニーカウンター	人手で計数した数に対するチェック	1年毎
遠心分離機	校正された独立した回転計による回転速度のチェック	1年毎
嫌気培養器又はインキュベータ	嫌気インジケータによるチェック	使用毎
試験所環境	例えば、エアーサンプラー、固定培地、接触培地又は拭き取り綿を用いて空気及び表面の微生物汚染の監視	週毎

付属書 C-3 設備の保全に関する指針 (EA-4/10 の付属書 F に対応する)

— 設備の保全に関する指針 —

この情報は、指針の目的のために準備され、そして設備の保全の頻度は、その設備の要求や種類及び以前の性能に基づいている。(EA-4/10 の付属書 F に対応する)

設備の種類	要求事項	示唆される頻度
(a) インキュベータ	清潔及び内部表面の消毒	(a) 月毎
(b) 冷蔵庫		(b) 必要に応じて (例：3ヶ月毎)
(c) 冷凍庫、乾燥器		(c) 必要に応じて (例：1年毎)
*水浴	空、清潔、消毒及び再補充	毎月、又は殺菌剤が使用された場合6ヶ月毎
遠心分離機	(a) 専門業者による保全	(a) 1年毎
	(b) 清潔及び消毒	(b) 使用毎
オートクレーブ	(a) ガasketの目視チェック、チャンバーの清潔/排水のチェック	(a) 製造者推奨の定期
	(b) 専門業者による全面的保全	(b) 1年毎又は 製造者の推奨に従う
	(c) 圧力容器の安全チェック	(c) 1年毎
安全キャビネット ラミナーフローキャビネット	専門業者による全面的保全及び機械的な部分のチェック	1年毎又は 製造者推奨に従う
顕微鏡	専門業者による全面的保全	1年毎
pHメーター	電極の掃除	使用毎
*はかり、 重量測定式希釈装置	(a) 清潔	(a) 使用毎
	(b) 専門業者による保全	(b) 1年毎
蒸留装置	清潔及びスケール除去	必要に応じて (例、3ヶ月毎)
*イオン交換装置、 逆浸透装置	カートリッジ又は膜の交換	製造者の推奨に従う
嫌気培養器	清潔又は消毒	使用后
培地分注器、 容量器具、ピペット、 一般試験器具	適宜の汚染除去、清潔及び滅菌	使用毎
スパイラルプレーター	(a) 専門業者による保全	(a) 1年毎
	(b) 汚染除去、清潔及び滅菌	(b) 使用毎
試験所	(a) 作業面の清潔及び消毒	(a) 日毎及び使用中
	(b) 床の清潔、流し台及び洗い桶の消毒	(b) 週毎
	(c) 清潔及びその他表面の消毒	(c) 3ヶ月毎

付属書 4 「試験の種類」で申請する微生物試験所が妥当性確認/検証時に用いる対象品目
(食品・飼料) 分類表

対象品目(食品・飼料)分類表－妥当性確認/検証用 (2009.2.10)

大分類	中分類	小分類	例	ISO 16140:2003 Annex B		
1 穀類、いも及び豆類	1-A 水分20%未満	1-A-1	穀粉、プレミックス等	小麦粉、コーンスターチ、ケーキミックス、シリアル、マッシュポテト、きな粉、炒り豆、フライビーンズ	Other products	Cereals/Rice
		1-A-2	乾麺、パスタ	そうめん、干しうどん、干しそば、スパゲッティ		Pasta
	1-B 水分20%以上	1-B-1	米飯、麺類、豆腐類	白飯、おにぎり、ゆでそば、ゆでうどん、ゆでスパゲッティ、豆腐、生揚げ、豆乳など	Chocolate/Bakery products	Other
		1-B-2	発酵品	冷凍パン生地、納豆		
2 野菜・果実・種実類	2-A 水分30%未満	2-A-1	糖度30%以下	乾燥野菜、ナッツ類、ピーナツバター	Fruits and Vegetable based products	Dry
		2-A-2	糖度30%以上	ドライフルーツ		Dry
	2-B 水分30%以上	2-B-1	糖度30%以下	カット野菜、カットフルーツ、冷凍野菜、冷凍果実果汁、ピューレ、シロップ漬け果実、加熱加工品		Raw, Heat processed, Frozen, Juices/Concentration IMF(Intermediate moisture foods)
		2-B-2	糖度30%以上	ジャム、砂糖漬け		Fermented, Cured/Salted
		2-B-3	発酵品	漬け物		Raw, Heat processed, Frozen, Juices/Concentration
		2-B-4	pH5.0以下	柑橘類(カットフルーツ/果汁/ピューレ等)		
3 きのご類	3-A 水分20%未満				Dry	
	3-B 水分20%以上	3-B-1	生鮮品	しいたけ、しめじ、マッシュルーム等	Raw	
		3-B-2	加熱加工品	水煮缶詰類等	Heat processed	
4 魚介類	4-A 水分30%未満		乾燥品	煮干し、かつお節、干し貝柱、するめ、干しえび等	Fish and Seafood products	Others
	4-B 水分30%以上	4-B-1	生鮮品(冷凍品含む)	切り身魚、刺身、むき身貝類、むきえび		Raw, Frozen
		4-B-2	非加熱加工品	すり身、塩蔵魚卵(いくら、たらこ等)、開き干し魚、もずく、生わかめ、塩蔵わかめ、めかぶ等		Others
		4-B-3	加熱加工品(くん製含む)	スモークサーモン、蒲焼き、缶詰、水産練り製品等		Heat processed, Smoked
		4-B-4	発酵品	塩辛、くさや等		Others
5 肉類	5-A 水分30%未満		乾燥品	ビーフジャーキー、サラミソーセージ	Meat products & Poultry	Cured, Fermented
	5-B 水分30%以上	5-B-1	生鮮品	牛肉、豚肉、鶏肉、ミンチ		Raw, Frozen
		5-B-2	加熱加工品	ハム・ソーセージ一般、焼き豚、コーンビーフ等		Heat processed, Other
6 卵類	6-A 卵類	6-A-1	生鮮品	全卵、卵黄、卵白	Other	Egg and derivatives
		6-A-2	加熱加工品	ゆで卵、たまご焼、うずら卵水煮		
7 乳類	7-A 水分20%未満	7-A-1	脂肪分 70% 未満	全粉乳、脱脂粉乳、調整粉乳等	Dairy products	Dry
		7-A-2	脂肪分 70% 以上	バター		Other
	7-B 水分20%以上	7-B-1	生鮮品(非加熱)	生乳	Raw	
		7-B-2	加熱加工品	牛乳、アイスクリーム、プロセスチーズ、クリーム類	Heat processed, Frozen	
		7-B-3	発酵品	乳酸菌飲料、ヨーグルト、ナチュラルチーズ	Fermented	
8 菓子類、糖類、油脂類	8-A 水分20%未満	8-A-1	脂肪分10%未満	せんべい(米菓、小麦粉)、和干菓子	Chocolate/Bakery products	Dry
		8-A-2	脂肪分10%以上	揚げせんべい等、ドーナツ、ビスケット、スナック類、チョコレート、ファーストスプレッド		
	8-B 水分20%以上	8-B-1	脂肪分10%未満	団子、饅頭、もち、ようかん、プリン、ゼリー、あんぱん、はちみつ	Chocolate/Bakery products	Low moisture/IMF, Other
		8-B-2	脂肪分10%以上	ケーキ、デニッシュペストリー		
9 嗜好飲料	9-A タンニン0.05g/mL未満			緑茶(番茶、ほうじ茶)、ウーロン茶、麦茶等 清涼飲料水、粉末清涼飲料	Other products	Beer
	9-B タンニン0.05g/mL以上			緑茶(抹茶、煎茶)、紅茶、コーヒー、ココア インスタントコーヒー、粉末清涼飲料		
10 調味料及び香辛料	10-A 調味料	10-A-1	ドレッシング類	マヨネーズ、ドレッシング等	Other products	Dressing, Mayonnaise
		10-A-2	発酵品	味噌等		
	10-B 香辛料			スパイス類	Other products	Spices

【参考文献】

- 1) AOAC INTERNATIONAL Presidential Task Force on Best Practices for Microbiological Methodology Appendix B - Matrix Extension WG Report, 2006
- 2) ISO 16140:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods
- 3) AOAC INTERNATIONAL OMA Program Manual Annex A, Classification of categories for validation studies
- 4) 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会報告 五訂増補日本食品標準成分表

JAB「認定の基準」についての指針—微生物試験—附属書 I [EA-4/10\(和訳\) 微生物試験所における認定](#)

EA-4/10

微生物試験所における認定

公益財団法人 日本適合性認定協会

JAB「認定の基準」についての指針 — 微生物試験 — 附属書

目次

1	序文及び文書の適用範囲	25 <u>26</u>
2	要員	25 <u>26</u>
3	環境	26 <u>27</u>
3.1	敷地・建物	26 <u>27</u>
3.2	環境監視	28 <u>29</u>
3.3	衛生	28 <u>29</u>
4	試験方法の妥当性確認	28 <u>29</u>
5.	測定の不確かさ	29 <u>30</u>
6.	設備-保全、校正及び性能の検証	30 <u>31</u>
6.1	保全	30 <u>31</u>
6.2	構成及び性能の検証	30 <u>31</u>
7.	試薬及び培地	32 <u>33</u>
7.1	試薬	32 <u>33</u>
7.2	試験所内調製培地	32 <u>33</u>
7.3	既成培地	33 <u>34</u>
7.4	ラベル貼付	33 <u>34</u>
8.	標準物質及び標準培養株	33 <u>34</u>
8.1	標準物質	33 <u>34</u>
8.2	標準培養株	34 <u>35</u>
9.	サンプリング	34 <u>35</u>
10.	試料の取り扱い及び識別	34 <u>35</u>
11.	汚染した廃棄物の廃棄	35 <u>36</u>
12.	結果の品質保証／性能の品質管理	35 <u>36</u>
13.	試験報告書	36 <u>37</u>
	附属書 A 用語の定義	37 <u>38</u>
	附属書 B 参照文書	39 <u>40</u>
	附属書 C 標準培養株の一般的な使用	40 <u>41</u>
	附属書 D 校正及び校正のチェックに関する指針	41 <u>42</u>
	附属書 E 設備の妥当性確認及び性能の検証に関する指針	42 <u>43</u>
	附属書 F 設備の保全に関する指針	44 <u>45</u>

JAB「認定の基準」についての指針 — 微生物試験 — 附属書

(公財)日本適合性認定協会 (以下 JAB と略す) 注: 下線部は試験所がこの表現通りに実施することを本協会として必ずしも要求するものではないが、試験所がこの表現の意図する機能を何らかの方法によって満たしていることを必要とする JAB 指針に相当している。

1 序文及び文書の適用範囲

- 1.1 認定のための一般要求事項は、JIS Q 17025(ISO/IEC 17025)に規定されている。これらすべての要求事項は、認定を得ようとする試験所によって満たされなければならない。
- 1.2 この文書は、審査員と微生物試験を実施しようとする試験所の両者のために特定の指針を提供することによって、JIS Q 17025(ISO/IEC 17025)を補足している。この文書は、原料、製品、物質の試験を請け負う場合に JIS Q 17025(ISO/IEC 17025)を解釈する上で詳細な指針となるものである。指針は、ルーチンでも、ノンルーチンであっても、或いは研究及び開発の一部であっても、すべての目的とする測定の実施に適用できる。たとえ、主に食品及び環境微生物試験のために記述されていたとしても、一般的原則は他の分野でもたぶん適用できるであろう。
JIS Q 17025(ISO/IEC 17025)は、権威ある規格のままであり、異議を唱えられた場合に、認定機関は、この規格により未解決案件を裁定する。この文書で与えられる指針は、また GLP、GMP、GCP のような他の品質標準に基づく登録に対する業務においても使用できるであろう。
- 1.3 この文書は、JIS Q 17025(ISO/IEC 17025)の附属書 B に規定されている微生物試験のための”適用文書”とみなすことができる。この文書は、とりわけ EA 相互承認に参画する EA メンバー間での試験所認定に対して整合した取り組みを促進させる手段として、EURACHEM 及び EA の協同で作成された。
- 1.4 微生物試験には、異なる原料や製品中の微生物（ウイルス、細菌、真菌類及び原生動物）及びその代謝産物の無菌試験、検出、分離、計数及び同定が含まれており、或いは生態学的試験のための微生物の利用というばかりでなく、検出手段の一部として微生物を利用する各種試験も含まれる。従って、この文書のいくつかの指針、例えば、試験所の環境においては、それ相応の解釈が必要となる。
この文書は、また生化学、分子生物学及び細胞培養のような微生物学に関連する分野の技術を用いる試験所に対して、追加要求事項がたぶんあるだろうが、指針の提供が可能である。
- 1.5 この文書は、試験結果の質には配慮しているが、衛生や安全事項には特段には配慮をしていない。しかしながら、試験所の業務実施にあたっては、国家の衛生や安全法令に従うことが望ましい。この衛生、安全上の問題が試験の質に影響を及ぼすかもしれない場合には、注意することが重要であり、試験所はこれを考慮することが要求される。
- 1.6 用語の定義は、附属書 A に提示されている。

2 要員 (JIS Q 17025 5.2)

- 2.1 微生物試験は、微生物学に関連する学科を修了し、かつ知識、技能を持つ者、或

いはその者の監督下で実施することが望ましい。別の資格として、試験所の認定範囲に関係する広範囲の妥当な経験を持つ職員であれば、要求を満たしているであろう。要員は、監督なしで認定範囲を扱う業務を実施することを許可される前に、或いは認定範囲の監督の経験があると見なされる前に、広範囲な実践経験を持つことが望ましい。

特定の国家法令は、この文書で与えられる指針に優先させることができる。

(→ 5.2.1 項)

2.2 試験所が報告書に試験結果の意見や解釈を含めたい場合は、適切な経験と特定の適用文書、例えば、法律及び技術的要求事項、そして許容条件に対応する知識を有する権限を与えられた要員によって実施する。

2.3 試験所の管理主体は、すべての要員が試験に適切な技能と設備の操作のための相応の訓練を受けることを確実にする。これには、例えば、無菌操作、平板培地への注入、コロニーの計数等、客観的条件を用いて決定された受け入れ可能な程度の基礎技術の訓練を含めるべきである。(→ 5.2.2 項) 要員は、試験の実施に対し相応に認められた場合か、或いは相応の監督下で実施する場合のどちらかでのみサンプルの試験を実施できる。

修得中の技能は、必要な場合、再訓練のための計画とともに客観的に監視されることが望ましい。ある試験方法や操作技術が通常実施されていない場合は、着手する前に要員の技能の検証が必要である。(→ 5.2.1 項) 試験の能力を確認する間隔の条件は、確立され文書化されることが望ましい。微生物の同定や確認のための試験結果の解釈は、実施試験者の経験が強く関係しており、定期的に試験者ごとに監視されることが望ましい。(→ 5.2.2 項)

2.4 要員の能力評価は、試験方法よりもむしろ特定の技術や装置毎の能力と関係づけることの方がより適切な場合もある。(→ 5.2.5 項)

3 環境 (JIS Q 17025 5.3)

3.1 敷地・建物

3.1.1 典型的な試験所は、試験施設（そこで特定の微生物学的試験及び関連活動が実施される）や付属施設（玄関、廊下、管理区域、更衣室、トイレ、保管室、資料室等）より構成されている。一般に試験施設に対して特定の環境要求事項がある。

実施する試験のタイプによって微生物学的試験所への立入は、権限が付与された要員に制限するのが望ましい。このような制限が実施される場所では、要員は次のことを承知していることが望ましい。(→ 5.3.1 項)

(a) 特定区域の使用目的

(b) 特定区域内での業務上の制限

(c) このような制限を課す理由

(d) 適切な封じ込めのレベル

3.1.2 試験所は実施する試験のタイプによって重大となる交差汚染のリスクを最小限にするように整備されることが望ましい。これらの目的を達成する方法は、例えば、以下に示される。(→ 5.3.1 項)

(a) 試験所を「人、空気、物の流れを逆行させない (no way back)」の原則で建設する。

(b) 試験及び試料の完全さを確実なものとするために適切な予防措置を講じて (例えば、密閉コンテナの使用) 順序だった方法で手順を実施する。

(c) 時間や空間によって活動を分離する。

3.1.3 一般的に以下に示す分離した場所、或いは明確に指定された区域の設計を持つことで、良好な実施とみなされる。(→ 5.3.1 項)

- ・ 試料の受領と保管区域
- ・ 試料調製区域（例えば、高濃度汚染しやすい粉末製品の調製のためには隔離された区域が使用されることが望ましい。）
- ・ 培養を含む資料の試験区域
- ・ 標準微生物の調整区域
- ・ 滅菌を含む培地と設備の準備区域
- ・ 無菌的操作区域
- ・ 汚染除去区域

洗浄のための区域（汚染除去後）は、もし微生物の成育に悪い影響をもたらす微量の物質の移動を防ぐ必要な予防措置がとられるならば、試験所の他の部署と共有しても良い。物理的な分離の必要性は、試験所の活動の特殊性（例えば、試験実施の数量や種類）を基礎にして判断することが望ましい。

試験所の設備は、不慮の交差汚染を避けるために区域間を日常的に移動しないことが望ましい。分子生物学的手法を用いる試験所においては、専用ピペット、チップ、遠心分離器、チューブ、PCR（核酸増幅装置）等は、業務区域（低－中－高濃度DNA作業環境）毎に設置されることが望ましい。（→ 5.3.1 項）

3.1.4 区域の広さは、清潔さと整理が維持される業務区域として、許容される十分な広さがあることが望ましい。要求される区域の広さは、試験所が扱う分析の量や内部組織全体に fitting していることが望ましい。（→ 5.3.1 項） 区域の広さは、利用可能ならば国家規制に従って要求に沿うことが望ましい。

3.1.5 試験室は、適切に換気がされ、また適温であることが望ましい。これは、自然換気でも強制換気、或いはエアコンディショナーの使用によってであっても良い。エアコンディショナーが使用される場合には、フィルターは適切であると共に検査され、保全が持続的であり、さらに実施される業務の種類によっては交換されることが望ましい。（→ 5.3.1 項）

3.1.6 汚染防止は、以下の事項等を実践することによって達成できる。（→ 5.3.1 項）

- ・ 壁、天井、床及び作業台における滑らかな表面（表面の滑らかさは、いかに容易に清掃できるかにより判断される）とする。タイルは、作業台の被覆材料として推奨されない。
- ・ 床、壁、天井の間の接続をなめらかな凹状とする。
- ・ 試験が実施される間の窓、扉の開きを最小限にする。
- ・ 日よけは室外に設置する。
- ・ 日よけの室外設置が無理な場合、室内の日よけの清掃は容易にできるようにする。
- ・ 流体用の配管類を作業場所の上を通さないようにし、通す場合には被覆収納し、むきだしのままにしないようにする。
- ・ 換気設備の吸気口には防塵フィルターを設置する。
- ・ 手洗い設備の分離、なるべく自動とする。
- ・ 戸棚は天井に至るまでの高さとする。
- ・ 未加工でむき出しの木製品の設備にしない。
- ・ 設備や備品の木製表面は相応の被覆をする。
- ・ 保管された物や設備は、容易に清掃できるように整理、整頓する。
- ・ 試験業務に直接必要のない什器や文書又はその他の物を置かない。

このリストは、完全なものではなく、そして全ての例があらゆる場合に適用されるわけではない。

天井は、理想的には平面照明で滑らかな表面にすることが望ましい。これが無理な場合（つり天井やつり下げ照明のように）には、試験所は、結果への衛生学的リスクを管理する文書化した証拠を持ち、その衛生学的リスクを克服する効果的手段（例えば、表面の清掃や検査の計画）を持つことが望ましい。

- 3.1.7 試験所が工場構内にある場合には、要員は生産区域からの汚染の可能性を承知していなければならない。また、このような事態を避けるために適切な処置がとられていることを証明することが望ましい。(→ 5.3.1 項)
- 3.2 環境監視
- 3.2.1 適正な環境監視計画は、例えば、落下微生物検査用プレートの使用や表面拭き取り等を含んだ計画が工夫されることが望ましい。その際には、許容できるバックグラウンド値を明らかにし、さらに限度を超えた場合を扱うための文書化された手順を持つことが望ましい。データの解析は、汚染レベルにおける傾向を明確にできることが望ましい。(→ 5.3.2 項)
- 3.3 衛生
- 3.3.1 試験所の備品、設備及び作業面のための文書化された清浄計画があることが望ましい。それには、環境監視の結果や交差汚染の可能性を考慮することが望ましい。また、漏出の際の対処方法があることが望ましい。(→ 5.3.2 項)
- 3.3.2 十分な保管場所を準備し、試験所において文書業務を最小限とすることや試験所業務区域から植物や個人の所有物を禁止することによって、塵の蓄積を避ける対策が取られることが望ましい。(→ 5.3.2 項)
- 3.3.3 実施される試験の種類に応じた着衣（必要な場合は、髪の毛、あごひげ、手、靴等の覆いを含める）は、微生物試験所内で身につけ、そして区域を去る前に脱ぐことが望ましい。これは、分子生物学試験所にとって、例えば気づかない交差汚染を引き起こすかもしれない高濃度 DNA の区域から低濃度 DNA 区域に移動するような場合は、特に重要である。多くの試験所では、実験用着衣で十分であろう。(→ 5.3.2 項)
- 3.3.4 適切な手洗い設備が利用できることが望ましい。
- 4 試験方法の妥当性確認 (JIS Q 17025 5.4.5)
- 4.1 微生物学的試験方法の妥当性確認は、実際の試験状態を反映することが望ましい。これは、自然に汚染された製品や前もって汚染微生物数が確定されたものをスパイクした製品を用いることによって達成されると言って差し支えない。マトリックスに対する汚染微生物の添加は、自然に生息している汚染微生物の存在を単に見かけ上模倣しているにすぎないことを分析者は、承知していることが望ましい。しかしながら、この方法は、しばしば最良の方法であり唯一有効な解決法である。妥当性確認の必要性の程度は、試験方法とその適用法による。試験所は、標準試験法が標準の手順に明示されていないマトリックスに適用される場合には妥当性確認をする。(→ 5.4.5 項)
- 4.2 結果が検出／不検出や確認及び同定の手順によって表現されるような定性的な微生物学的試験方法は、もし適切であるならば、特異性、相対真度、正の偏差、負の偏差、検出限界、マトリックス効果、繰返し性及び再現性を決定することによって妥当性確認されることが望ましい(定義のための付属書 A を参照)。(→ 5.4.5 項)
- 4.3 定量的な微生物学的試験方法の場合、特異性、感度、相対真度、正の偏差、負の偏差、繰返し性、再現性及び決められた変動の範囲で定量限界が考慮され、また必要な場合には、分析結果において定量的に決定されることが望ましい。マトリックスに起因する相違は、別の種類の試料を試験する時には考慮しなければならない。結果は、適切な統計学的方法で評価されることが望ましい。(→ 5.4.5.3 項)

- 4.4 試験所は、試験所において使用した市販の微生物検出キットにおける妥当性確認データを保持する。これらの妥当性確認データは、共同試験を通して、また製造業者によって提出され、第三者機関（例えば、AOAC）の評価を受けた妥当性確認データとして入手できる。もし、妥当性確認データが入手できないか、或いは全面的には適用できないならば、その試験所は、試験の妥当性確認を完全に仕上げる責任がある。（→ 5.4.5.3 項）
- 4.5 もし、試験方法の変更版が、原法と同様の仕様であることを論証する必要があるならば、その際の比較は、論証の証拠事例であることを確実にするために繰り返し試験用の試料を用いて実施されることが望ましい。試験計画や結果の解析は、統計学的に妥当でなければならない。（→ 5.4.5.3 項）
- 4.6 たとえ妥当性確認が完全であっても、その利用者は日常業務の中でさらに、文書化した性能が通常の業務下でも満たされていることを、例えば、スパイクされた試料或いは関連するマトリックスに混ぜ込んだ標準物質を用いることによって検証することが望ましい。（→ 5.4.5.3 項）
5. 測定の不確かさ (JIS Q 17025 5.4.6)
- 5.1 測定の不確かさのための国際定義は、ISO 国際計量基本用語集 1993（付属書 B 参照）に規定されている。欧州認定機関によって推奨されている試験における不確かさの評価及び表現の一般的な取り組みは Guide to the Expression of uncertainty in Measurement, 1995, ISO Geneva に記述されているように国際度量衡委員会（International Committee for Weights and Measures ; CIPM）によって作成された提唱に基づいている。（→ 5.4.6.2 項）
- 5.2 微生物学的試験は、一般的に、厳密で計量学的及び統計学的に意味のある測定の不確かさの計算ができない試験の部類に入る。一般的に不確かさの見積りには、繰り返し性や再現性のデータだけでなく、理論的にはかたより（例えば、技能試験結果から）を含めたデータを基づかせるのが適切である。不確かさの個々の構成成分は、識別されていること並びに評価結果の変動に対する寄与が確認され、かつ証明されることが望ましい。（→ 5.4.6.2 項）
いくつかの構成成分（例えば、ピペット操作、秤量操作及び希釈の影響）は、直ぐに測定でき、不確かさ全体に対しての寄与が無視できることを容易に証明することができる。他の構成要素（例えば、試料の安定性や試料調製）は、直接には測定できないし、それらの寄与は統計学的方法においても評価できないが、結果の変動性に対する重要性は、同様に、考慮に入れることが望ましい。（→ 5.4.6.2 項）
- 5.3 微生物学的試験を認定された試験所は、試験するマトリックス中の微生物の分布についての知識を持ち、サブサンプリングにおいてこれを考慮に入れることが望まれる。
JAB は不確かさにおけるサブサンプリングの要因を検討することを要求するが、顧客からの特別な要求指示がなければ、不確かさの見積りに含めることは勧められない。
その主な理由は、製品マトリックス中の微生物分布に起因する不確かさが、試験所能力の作用ではなく、試験した個々の試料に特有なものであるかもしれないからであり、試験方法は、不均一性を考慮して、用いられる試料量を指定することが望ましい。（→ 5.4.6.3 項）
- 5.4 不確かさの概念は、例えば検出試験或いは同定試験のための属性決定などの定性的な試験結果には、直接には適用できない。とはいっても、変動の個々の原因、例えば、試薬の性能の整合性や分析者の解釈が管理されていることが確認され、かつ証明されることが望ましい。さらに試験にとって検出限界が適合の重要な指

標となっている場合には、限界を決定するために用いられた接種菌と関連した不確かさが見積られ、その有意性が評価されることが望ましい。試験所は、用いる定性試験に関連した結果の偽陽性及び偽陰性結果の発生率もまた承知していることが望ましい。(→ 5.4.6.3 項)

6. 設備-保全、校正及び性能の検証 (JIS Q 17025 5.5)

品質システムの一部として、試験所は、保全、校正及び設備の性能検証の文書化された計画を運用することが要求される。(→ 5.5.1 項)

6.1 保全

(設備の保全の指針は、ISO 7218 に見ることができる。)

6.1.1 主要設備の保全は、使用頻度のような要素によって決定され、定期的な間隔で実施する。その際の詳細な記録は保存する。設備の保全やその間隔の事例は、付属書 F に示す。(→ 5.5.1 項)

6.1.2 器具に起因する交差汚染を避けるために、例えば以下の注意が払われることが望ましい。(→ 5.5.1 項)

- 使い捨て器具は、適宜消毒し滅菌する。
- 繰り返し使用するガラス器具は、適宜適切に消毒・洗浄し、滅菌する。
- 理想的には、試験所は、汚染除去のために別々のオートクレーブを持つことが望ましい。

しかしながら、汚染除去及び滅菌した物を分離するためにとられる適切な予防措置やオートクレーブの内外周囲での処理する場所を定める文書化された清潔操作プログラム等が準備されるならば、1台のオートクレーブが容認される。

6.1.3 代表的な、以下の設備は消毒・洗浄、取扱い、損傷の検査、一般的な確認、そして適切な滅菌によって保全される。(→ 5.5.1 項)

- 一般使用器具：ろ過装置、ガラス又はプラスチック容器（ビン、試験管）、ガラス又はプラスチックペトリ皿、試料採取装置、白金線又は白金耳、ステンレス製又は使い捨てプラスチック製器具等
- *水浴、インキュベータ、微生物用キャビネット、オートクレーブ、ホモジナイザー、冷蔵庫、冷凍庫等
- 容量器具：ピペット、自動分注機、スパイラルプレーター等
- 測定装置：温度計、タイマー、*はかり、pHメーター、コロニーカウンター等

6.2 校正及び性能の検証

6.2.1 試験所は、試験結果に直接影響を及ぼす設備の校正及び性能の検証のための計画を規定する。このような校正及び性能の検証の頻度は、記録された経験や必要性及び設備の種類と以前の性能に基づいて決定する。校正及び性能の検証の間隔は、設備の性能が許容限度を外れるのが発見されるより短い期間とする。校正の間隔と種々の試験所装置の代表的な性能確認の例は、付属書 D 及び付属書 E に示す。(→ 5.5.2 項)

6.2.2 温度測定器

(a) 温度が試験結果に直接影響する場合、或いは設備の性能校正のために重要である場合には、温度測定器、例えばインキュベータやオートクレーブに使用されるガラス液体温度計、熱電対及び白金抵抗温度計(PRTs)は、要求された*真度を達成するために適切な品質にする。(→ 5.5.2 項)

(b) 温度測定器の校正は、温度のための国家又は国際標準に対してトレーサブルで

なければならない。その*真度が許容される場合、装置は適切であり、用いられる国家又は国際的に認められた製造規格（例えば、ガラス液体温度計のためのISO 1770）に適合していることを証明できる。このような装置は、目的温度近くで許容誤差が容認される場合には、例えば、保管用冷蔵庫や冷凍庫そしてインキュベータや*水浴にもまた監視する目的で使用することができる。こうした温度測定器は性能の検証が必要である。（→ 5.5.2 項）

6.2.3 インキュベータ、*水浴、オープン

温度の安定性、温度分布の均一性及びインキュベータ、ウォーターバス、オープンそして温度管理された試験室が平衡状態に達するまでに必要な時間は、特に代表的な使用（例えば、位置、空き間隔、ペトリ皿の積重ね高さ）に配慮して最初に規定し文書化する。装置の初期妥当性確認における特性記録の恒久性は、重要な修理や改善の後には確認し、記録する。試験所は、この種の装置の作動温度を監視し、記録を保持する。（→ 5.5.2 項）

6.2.4 オートクレーブ（培地調製装置を含む）

以下の概略は、校正及び性能の検証や監視に対して一般的に期待される事項である。しかしながら、オートクレーブ処理された原料や物の定量的試験が、バッチ内及びバッチ間で一定の変動内にあることが適切に説明できれば、それも同等の品質保証を与えることになるということでは認められている。（→ 5.5.2 項）

- (a) オートクレーブは、指定した時間と温度についての許容範囲を満足する性能を有しているべきである。圧力ゲージのみ備えた圧力釜は、認められない。操作過程を制御し監視するために使用されるセンサーは、校正及びタイマーの性能が検証されていることが要求される。（→ 5.5.2 項）
- (b) 初期妥当性確認は、操作の際に用いられるそれぞれの操作過程や滅菌品の装填の仕方に即した性能調査（空間温度分布測定）を含むのが望ましい。この工程は、重要な修理又は改善（例えば、温度調節端子の交換、プログラム、装填装置、操作周期）後、又は培地の品質管理チェックの結果により必要とされた場合には、繰り返さなければならない。初期妥当性確認に際しては、十分な数の温度センサーを可能な限り異なった位置の滅菌品中に（例えば、液体又は培地で満たされた容器に）置くことが望ましい。（→ 5.5.2 項）
均一な加熱が他の方法によって証明することができない培地調製装置の場合には、一つは制御端子の付近に、もう一つは、それから離れた位置に配置した二つのセンサーの使用が一般的に適切であると考えられる。妥当性確認及び再妥当性確認は、滅菌温度での時間と同様に温度の上昇及び降下時間の適切さを考慮することが望ましい。（→ 5.5.2 項）
- (c) 妥当性確認／再妥当性確認の際には、代表的な使用に対して決定された加熱方法に基づいた明確な操作手順が規定されるのが望ましい。受け入れる／受け入れない培地の基準が、立証されると共に、操作毎の温度や時間及び保全を含むオートクレーブ操作の記録をすることが望ましい。（→ 5.5.2 項）
- (d) 監視は、以下のうちの一方により達成することができる。（→ 5.5.2 項）
 - (i) 熱電対及びチャート作成やプリントアウト用レコーダーを使用
 - (ii) 直接観測し、到達した最高温度とその温度に到達するまでの時間を記録

オートクレーブの温度を直接監視することに加えて、各サイクルの操作の有効性は、滅菌／汚染除去確認用の化学的、生物学的インジケーターを用いて確認することができる。オートクレーブテープ又は試験紙は、単に負荷をかけられていることを見るために使用されるべきであり、受け入れ可能の完全さを証

明するために使用されることは望ましくない。(→ 5.5.2 項)

6.2.5 分銅及び*はかり (→ 5.5.2 項)

分銅及び*はかりは定期的に(使用目的に応じて)トレーサブルな校正をする。

6.2.6 容量器具 (→ 5.5.2 項)

- (a) 自動分注器、希釈型分注器、自動ハンドピペット及び使い捨てピペットのような容量器具は、おそらく全て微生物試験所で使用されるであろう。試験所は、器具が要求される規格内に収まっていることを保証するために、最初に容量器具の検証を実施し、そして定期的な確認をすることが望ましい。検証は、許容誤差を保証されたガラス器具には必要とされない。但し、マイクロバイオアッセイ(含有抗生物質等)の場合は、検証したガラス器具を使用する。器具は、設定容量(可変容量の器具では、いくつかの異なる設定において)に対する供給容量の*真度を確認することが望ましい。そして、繰返しの供給容量の精度についても測定することが望ましい。(→ 5.5.2 項)
- (b) 「一回使用」の使い捨て容量器具の場合、試験所は承認された適切な品質システムを持つ会社からの供給を得ることが望ましい。器具の適合性の初期確認後は、*真度の無作為チェックを実施することが推奨される。供給者が承認された品質システムを持っていないのならば、試験所は適正さを器具のバッチ毎に確認することが望ましい。(→ 5.5.2 項)

6.2.7 その他の設備 (→ 5.5.2 項)

導電率計、酸素メーター、pHメーター及びその他の同様な装置は定期的に或いは各々の使用前に検証されるべきである。検証の目的に使用される緩衝液は、適切な条件下で保存され、期限日が記入されることが望ましい。(→ 5.5.2 項)

湿度は、試験結果にとって重要である場合、湿度計は校正され、その校正值は、国家又は国際標準に対してトレーサブルであることが望ましい。(→ 5.5.2 項)

オートクレーブタイマーを含むタイマーは、校正済みタイマー或いは国家標準時報によって妥当性確認されることが望ましい。

遠心分離機が試験手順の中で使用される場合、遠心力の重要性が評価されることが望ましい。それが重要であれば、遠心分離機は、校正が要求される。

7. 試薬及び培地 (JIS Q 17025 4.6 及び 5.5)

7.1 試薬 (→ 5.5.2 項)

試験所は、用いる試薬の品質が試験に対して適切である事を確実にすることが望ましい。試験結果を左右する試薬は、バッチごとに使用開始時と使用期限内において、承認された国或いは国際的微生物株保存機関の保存株にトレーサブルな陽性及び陰性対照微生物を用いて、その妥当性を確認することが望ましい。

7.2 試験所内調製培地

7.2.1 試験所内で調製した培地、希釈液及びその他の懸濁液の妥当性を、以下の事項に関して確認することが望ましい。(→ 5.5.2 項)

- ・ 対象とする微生物の回収率又は生育性
- ・ 非対象微生物の生育抑制性又は生育阻害性
- ・ 生化学的特性(選択性及び特徴)
- ・ 物理学的特性(pH、量、無菌性など)

回収率又は生育性の評価のための定量方法については、ISO 11133 パート 1 及び 2 が優先される。(→ 5.5.2 項)

7.2.2 原料（市販の乾燥製品及び個々の構成成分）は、冷蔵、乾燥及び遮光等の適切な条件下で保存されることが望ましい。全ての容器、特に乾燥培地の容器はしっかりと密閉されることが望ましい。固まった、ひび割れた、又は変色した乾燥培地は、使用されることは望ましくない。また、試験方法に指定がない限り、殺菌剤や生育阻害・抑制物質の入っていない蒸留水、*イオン交換或いは逆浸透（RO）水を調製用を使用することが望ましい。(→ 5.5.2 項)

7.2.3 調製済培地の使用期限は、保存条件を規定し、妥当性を確認した上で設定する。(→ 5.5.2 項)

7.3 既成培地

7.3.1 調達した全ての市販の既成又は半既成培地（希釈液及び他の懸濁液についても）は、使用前に妥当性確認が要求される。回収率における性能の評価又は対象微生物の生育性及び非対象微生物の成育抑制性又は生育阻害性は、十分に定量的である必要がある。また、属性（例えば、物理的及び生化学的特性）は、客観的な基準により評価することが望ましい。(→ 5.5.2 項)

7.3.2 妥当性確認の一部として、ユーザーである試験所は、最低限、以下の情報を含んだ製造者の製品規格書を入手しておく必要がある。(→ 5.5.2 項)

- ・ 培地の名称と添加成分を含む構成成分一覧
- ・ 使用期限と適用した承認基準
- ・ 保管条件
- ・ 培地の規格／純度
- ・ 滅菌性の確認
- ・ 陽性及び陰性対照の生育試験に使用した微生物（培地メーカーの使用している標準微生物）及び容認基準
- ・ 物理的性状確認と適用した容認基準
- ・ 製品規格書の発行日

7.3.3 培地のバッチは、識別可能とする。受領された各々の培地は、検査成績書が添付されていることが望ましい。試験所のユーザーは、製品規格書に変更があった場合には、製造者によって確実に通知されるように手段を講じておくことが望ましい。(→ 5.5.2 項)

7.3.4 市販の既成品又は半既成培地を調達した培地の製造者が、ISO 9000 シリーズなどの品質システムにより保証されている場合には、供給された培地が製品規格に適合していることを試験所ユーザーが確認する際に、導入時の妥当性確認をそのまま有効であるとして適用しても良い。それ以外の場合では、受領した全てのバッチで適切な確認が必要となる。

7.4 ラベル貼付

試験所は、すべての試薬（保存溶液を含む）、培地、希釈液及びその他の懸濁液について、妥当性、識別、濃度、保存条件、調製日、妥当性確認された有効期限及び／又は推奨される保管期限等の表示のため、適切なラベルを貼付することを確実にする。調製責任者が、記録から識別できることが望ましい。

8. 標準物質及び標準培養株 (JIS Q 17025 5.3)

8.1 標準物質 (→ 5.6.3 項)

標準物質及び認証標準物質 (付属書 A における定義を参照) は、以下のような目的で使用する場合、測定において基本的にトレーサビリティを与える。

- ・ 結果の*真度を実証するため、
- ・ 装置の校正のため、
- ・ 試験所の能力を監視するため、
- ・ 試験方法の妥当性を確認するため、そして
- ・ 試験方法の比較を行うため。

可能ならば、標準物質は、妥当なマトリックスで使用する事が望ましい。

8.2 標準培養株 (→ 5.6.3 項)

8.2.1 標準培養株は、培地 (試験キットを含む) の受け入れ可能な性能を立証するためや方法の妥当性を確認するため、そして進行中の試験技能を査定/評価するために必要とされる。トレーサビリティは、例えば、試験キット及び方法の妥当性確認のため培地性能を立証する場合に必要である。トレーサビリティを証明するためには、試験所は、現存する国家又は国際的に承認された所蔵品から直接得られる微生物の標準系統株を用いなければならない。代替法として、使用間際にすべての関連特性が同等であることを試験所によって示される場合には、市販のものを使用してもよい。(→ 5.6.3 項)

8.2.2 ISO 11133-1 における指針に従って、標準系統株は、標準保存株を準備するために、二次培養される。純度及び生化学的確認は、適切に並行して実施されることが望ましい。冷凍か真空凍結乾燥のどちらかで標準保存株を保存することが推奨される。ルーチン使用される試験用培養株は標準保存株からの最初の二次培養株であるべきである (試験用保存株の調製については付属書 C を参照)。もし、標準保存株が解凍された場合は、再凍結や再使用をしてはならない。(→ 5.6.3 項)

8.2.3 試験用保存株は、それが必要とされており、そして標準試験法によって或いは関連特性に変化がないという証明書を提供できる試験所によって確認されるのでなければ、二次培養されるのは望ましくない。(→ 5.6.3 項)

標準保存株の代わりに二次培養した試験用保存株を使用してはならない。標準系統株の市販のものは試験用培養株としてのみ使用することができる。(→ 5.6.3 項)

9. サンプルング (JIS Q 17025 5.7)

9.1 多くの場合、試験所は試験品を得るための一次サンプルングに対処できない。対処できる試験所では、このサンプルングは品質保証及び理想的には認定によってカバーされることが強く推奨される。(→ 5.7.1 項)

9.2 輸送と保管は、試料の保全性を維持する条件下 (例えば、適切なチルド或いは冷凍) で行われるべきである。条件は、監視され、記録が維持されることが望ましい。サンプルングと試験所に到着するまでの間の輸送や保管のための適切な責任の所在について、明確に文書化する。試料の試験は、サンプルングの後できるだけ速やかに実施され、そして関連指針及び/又は、国家又は国際法規に従うことが望ましい。(→ 5.7.1 項)

9.3 サンプルングは、訓練された要員によってのみ実施されることが望ましい。滅菌した器具を使用し、無菌的に実施されることが望ましい。(→ 5.7.1 項) 環境条件、例えば空気汚染や温度は、サンプルング場所において、監視され記録されることが

望ましい。

10. 試料の取り扱い及び識別 (JIS Q 17025 5.7 及び 5.8)

10.1 微生物叢は、温度や保管及び輸送の継続時間のようなファクターに感受性があるかもしれない。そこで、試験所による受領時での試料の状態を確認し、記録することは重要である。

(→ 5.8.1 項)

10.2 試料の由来が判り容易に識別できる手順を持つことが望ましい。もし、不十分な試料、又は物理的劣化、不適切な温度、破れたパッケージ或いは不完全なラベリングによる不完全な条件にある試料が存在したならば、試験所は、試料を試験するか断るかを決定する前に、顧客と協議することが望ましい。どんな場合においても、試料の状態は、試験報告書に表示されることが望ましい。(→ 5.8.1 項)

10.3 試験所は、すべての関係ある情報及び特に次の情報を記録することが望ましい。(→ 5.8.1 項)

- a) 受領の日付、適切な場合、時間
- b) 受領時の試料の状態及び必要に応じて温度
- c) サンプリング操作の特記事項 (サンプリング日、サンプリング条件等)

10.4 試験待機にある試料は、存在する微生物数の変化を最小限とするために適切な条件下で保存する。保存条件は、規定され記録されることが望ましい。(→ 5.8.2 項)

10.5 一度使ったパッケージとラベルは、高度に汚染されるかもしれないので、汚染の拡大を避けるために、相応の注意で取扱い、保管がされることが望ましい。(→ 5.8.2 項)

10.6 試験直前の試験所による二次サンプリングは、試験方法の一部と考えられる。実在するならば、国家又は国際的な指針によって、或いは妥当性確認された試験所内手順によって実施されることが望ましい。二次サンプリングの手順は、微生物の一樣でない分布を考慮して設計されることが望ましい。(ISO 6887 及び ISO 7218 で与えられる一般的指針) (→ 5.8.2 項)

10.7 試料の保存及び廃棄の手順は、文書化する。試料は、試験結果が得られるまで、或いはもし必要とされたならば、より長期間保管されることが望ましい。試験所の試料の一部が高度に汚染されていることが判っている場合には、廃棄する前に汚染除去されることが望ましい (11.1 項を参照)。(→ 5.8.4 項)

11. 汚染した廃棄物の廃棄

11.1 汚染した物質の正しい廃棄は、試料分析の精度に直接の悪影響もたらすことはないであろうが、手順は試験環境や物質の汚染の可能性を最小限にするための設計を行うことが望ましい。しかしながら、それは GLP に関する問題であり、環境又は衛生及び安全のための国家又は国際法規 (ISO 7218 参照) に従うことが望ましい。(→ 5.8.4 項)

12. 結果の品質保証／性能の品質管理(JIS Q 17025 5.9 項)

12.1 内部品質管理

12.1.1 内部品質管理は、試験所業務の継続的な評価をするために、試験所が責任を負っているすべての手順より成り立っている。主要な目的は、日々の結果の堅実さや規定された基準に適合していることを保証することである。(→ 5.9 項)

12.1.2 定期的な確認の計画は、変動性（分析者間、装置間、物質間等）が正常な管理下にあることを証明するために必要である。試験所の認定範囲に含まれるすべての試験は、証明される必要がある。計画には以下のことを含める。

- ・ 添加試料の使用
- ・ 標準物質の使用（技能試験計画物質を含む）
- ・ 反復試験
- ・ 試験結果の反復評価

これらの確認の間隔は、計画の構成及び実施試験の回数によって左右される。可能な場合、試験は、実施能力を監視するための管理を組み入れることが推奨される。

12.1.3 特殊な事例では、試験所は、まれにしか実施を求められない試験について認定されるかもしれない。このような場合には、進めている定期的な内部品質管理計画は不適切であろうし、試験に並行して実施される方が、十分な能力を立証するための計画としてより適切であろうと認識される。

12.2 外部評価（技能試験）

12.2.1 試験所は、認定範囲に関連した技能試験へ定期的に参加し、技能試験計画のマトリックスから適切なものを選択することが望ましい。特別な場合には、参加が必須になることがある。

12.2.2 試験所は、単に試験所のかたよりを評価するだけでなく、品質システム全体の有効性を確認するために外部評価を利用することが望ましい。

13. 試験報告書（JIS Q 17025 5.10）

13.1 もし、微生物数の測定の結果が陰性であった場合、「表示単位に対して、検出せず」或いは「表示単位に対して、検出限界以下」として報告されることが望ましい。結果は、一定の条件を付けずに、「表示単位に対して、0」として報告することは望ましくない。定性試験の結果は、「表示数量或いは容量に対して、検出又は不検出」として報告することが望ましい。また、指定微生物数が測定方法の検出限界より高く検出された場合には、顧客の同意のもとに「表示単位に対して、規定された微生物数以下」として表現することがある。

13.2 試験結果の不確かさの推定を、試験報告書に記載する場合には、制限（推定の中に試料中の微生物の分布が関与した要因を含まない場合は特に）を、顧客に対して明確に示さなければならない。

付属書 A 用語の定義

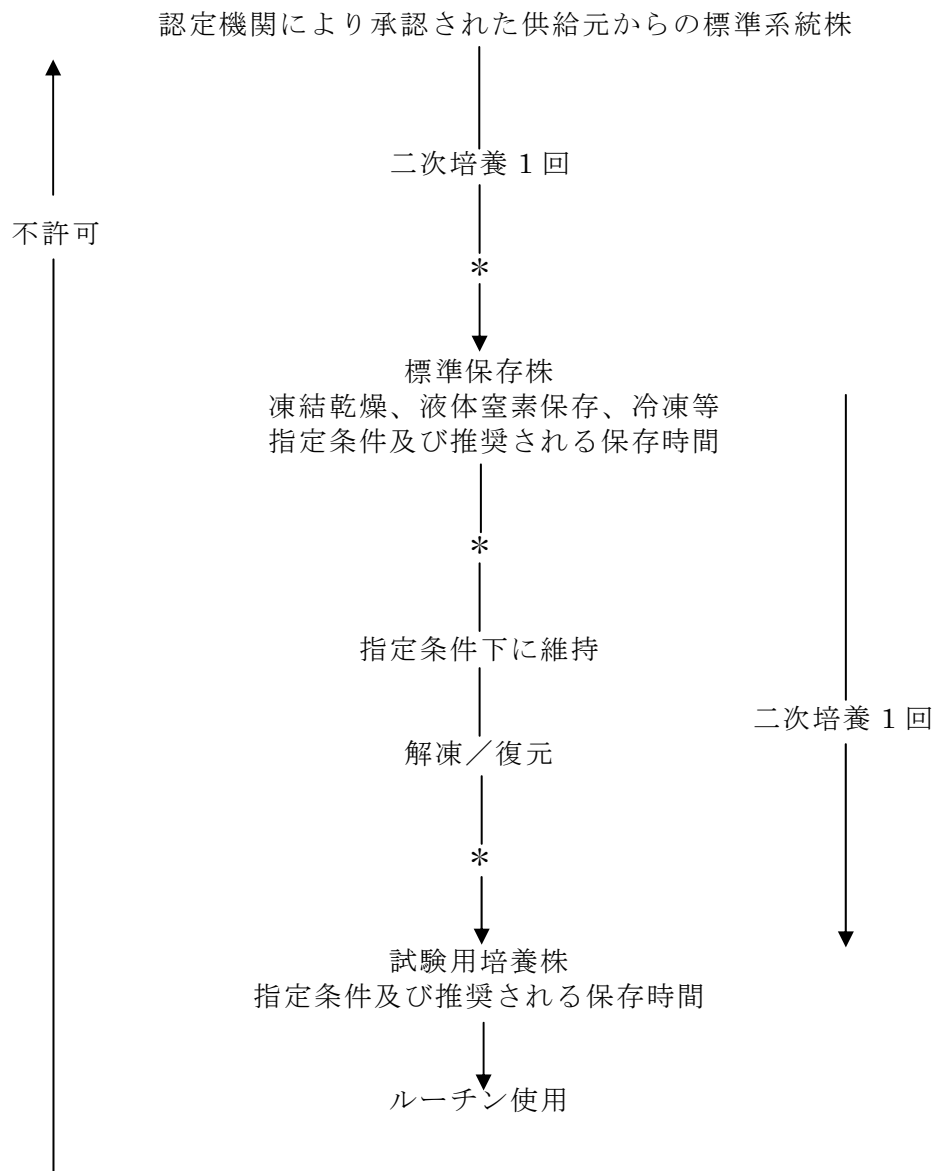
Calibration 校正	計器又は測定システムによって指示される量の値、若しくは、実量器又は標準物質によって表される値と、標準によって実現される対応する値との間の関係を特定の条件下で確定する一連の作業。 注1. 校正の結果は、指示に対する測定量の値の指定、又は、指示に関する補正の決定を可能にする。 注2. 校正はまた影響量の効果のような他の計量特性を決定できる。 注3. 校正の結果は、校正証明書 (calibration certificate) 又は、校正成績書 (calibration report) と呼ばれる文書に記録することがある。 [VIM: 1993 ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology] ; ISO 国際計量基本用語集 1993
Certified reference material 認証標準物質	特性値の表現に用いられている単位の正確な現示へのトレーサビリティが確立され、かつ表記された信頼の水準での不確かさが各認証値に付されるという手続きによって、その一つ又は複数の特性値が認証された認証書付きの標準物質。 [ISO Guide 30 : 1992]
Limit of Determination 定量限界	定量的微生物試験に適用される、評価済み方法の試験条件の下で、規定された変動の範囲内で決定できる微生物の最小数のこと。
Limit of Detection 検出限界	定量的微生物試験に適用される、検出できる微生物の最小数のことであるが、その数は*正確[MSOffice1]には算定できない。
Negative deviation 負の偏差	標準試験法では陽性結果を与えるのに、別の方法で確証はないが陰性結果を与える時に生じる。この偏差は、真の結果が陽性になることを証明できる時は、偽陰性の結果となる。
Positive deviation 正の偏差	標準試験法では陰性結果を与えるのに、別の方法で確証はないが陽性結果を与える時に生じる。この偏差は、真の結果が陰性になることが証明できる時は、偽陽性の結果となる。
Reference cultures 標準培養株	標準系統株、標準保存株及び試験用培養株に対する総称。
Reference strains 標準系統株	特性に従ってカタログに載せられ記述された、少なくとも属、種まで明らかにされた、なるべく起源が記述された微生物。 [ISO 11133-1:2000] 一般的には、国家或いは国際的に認められた所蔵品から得られる。
Reference material 標準物質	機器の校正、測定法の評価、又は物質の値付けに用いるために、単一又は複数の特性値が十分に均一で良く確定された物質又は材料。 [ISO Guide 30:1992]
Reference method	使用目的に相応した*真度と精度を持つことが示される一つ又は

参照試験法	複数の特性値を測定するために、明確かつ正確に必要な条件と手順を記述した、完全に研究された試験方法のこと。通常は、国家又は国際規格の試験法を指す。その結果、特に標準物質の値付けを可能とする。それゆえに、同じ測定に対する他の試験法の*真度を評価するために用いることができる。
Reference stocks 標準保存株	標準系統株から一回の二次培養により得られた分離同一性培養株。[ISO 11133-1:2000]
Relative trueness 相対真度	認められた標準試験法を用いて得られた結果と評価をする方法による結果との一致の度合い。
Repeatability 繰返し性	同一測定条件の下で、同一の測定を繰返し測定したとき、ほとんど同様の指示を与える計器の能力。 [VIM:1993 ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology]
Reproducibility 再現性	測定の条件を変えて同一の測定を繰返し測定したとき、ほとんど同様の指示を与える計器の能力。 [VIM:1993 ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology]
Sensitivity 感度	推定検査において正しく値付けされた陽性である培養株又はコロニーの全数に対する比。[ISO 13843:2000]
Specificity 特異性	推定検査において正しく値付けされた陰性である培養株又はコロニーの全数に対する比。[ISO 13843:2000]
Working culture 試験用培養株	標準保存株からの最初の二次培養株のこと。[ISO 11133-1:2000]
Validation 妥当性確認	客観的証拠を提示することによって、特定の意図された用途又は適用に関する要求事項が満たされていることを確認すること。 [ISO 9000:2000]
Verification 検証	指定された要求を満たす客観的証拠を用意して確認すること。 [ISO 9000:2000]

付属書 B 参照文書

1. ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
2. ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
3. ISO 6887-1, Preparation of dilution.
4. ISO Guide 30, Terms and definition used in connection with reference materials.
5. ISO 9000, Quality management systems - fundamentals and vocabulary.
6. VIM: 1993, ISO international vocabulary of basic and general terms in metrology.
7. ISO(CIPM): 1995, Guide to the expression of uncertainty in measurements.
8. Draft ISO/DIS 16140, Food microbiology. Protocol for the validation of alternative methods.
9. ISO 13843, Water quality - Guidance on validation of microbiological methods.
10. ISO 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1-General guidelines on quality assurance for the preparation of media in laboratory.
11. Draft ISO/FDIS 11133-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2-Practical guidelines on performance testing on culture media.
12. EN 12741, Biotechnology- Laboratories for research, development and analysis -Guidance for biotechnology laboratory operations.

付属書 C 標準培養株の一般的な使用



* 適切な場合、並行純度確認及び固有の生化学的試験

工程のすべての部分が文書化され、すべての段階の記録が維持されなければならない。

付属書 D 校正及び校正のチェックに関する指針

この情報は、指針の目的のために準備され、そして校正及びチェックの頻度は、その設備の要求や種類及び以前の性能に基づいている。

設備の種類	要求事項	示唆される頻度
参照温度計 (ガラス液体温度計)	トレーサブルの条件を満たした再校正	5年毎
	一点(例、氷点での確認)	1年毎
参照用熱電対	トレーサブルの条件を満たした再校正	3年毎
	参照温度計に対するチェック	1年毎
実用温度計及び 実用熱電対	氷点温度及び/又は試験実施温度範囲 における参照温度計を用いたチェック	1年毎
*はかり	トレーサブルの条件を満たした校正	1年毎
校正された分銅	トレーサブルの条件を満たした校正	5年毎
確認用分銅	校正された分銅を用いたチェック又は トレーサブルな校正をされた後の秤量 材を用いたチェック	1年毎
容量ガラス器具	要求される許容限度に対する重量測定 による校正	1年毎
顕微鏡	ステージマイクロメーターのトレーサ ブルな校正(適切な場合)	据付時
湿度計	トレーサブルな校正	1年毎
遠心分離機	トレーサブルな校正又は適切な場合、 独立した回転計を用いたチェック	1年毎

付属書 E 設備の妥当性確認及び性能の検証に関する指針

この情報は、指針の目的のために準備され、そして設備の妥当性確認及び性能の検証の頻度は、その設備の要求や種類及び以前の性能に基づいている。

設備の種類	要求事項	示唆される頻度
温度制御された装置 (インキュベータ、 ウォーターバス、 冷蔵庫、冷凍庫)	(a) 温度の安定性及び均一性の立証	(a) 据付時、2年毎及び 修理又は改善後
	(b) 温度の監視	(b) 日毎又は使用毎
滅菌器	(a) 温度の安定性及び均一性の立証	(a) 据付時、2年毎及び 修理又は改善後
	(b) 温度の監視	(b) 使用毎
オートクレーブ	(a) 稼働/周期の特性を立証	(a) 据付時、2年毎及び 修理又は改善後
	(b) 温度及び時間の監視	(b) 使用毎
安全キャビネット	(a) 性能の立証	(a) 据付時、1年毎及び 修理又は改善後
	(b) 微生物学的監視	(b) 週毎
	(c) 空気流の監視	(c) 使用毎
ラミナーエアフロー キャビネット	(a) 性能の立証	(a) 据付時、及び修理 又は改善後
	(b) 滅菌プレートでチェック	(b) 週毎
タイマー	国家標準時報に対してチェック	1年毎
顕微鏡	光軸調整のチェック	日毎又は使用毎
pHメーター	適切な品質の少なくとも2種の緩衝液 を用いて調整	日毎又は使用毎
*はかり	ゼロ点確認及び確認用分銅による読み の チェック	日毎又は使用毎
*イオン交換装置及び 逆浸透装置	(a) 導電率のチェック	(a) 週毎
	(b) 微生物汚染のチェック	(b) 月毎
重量測定式希釈装置	(a) 分注量の重量チェック	(a) 日毎
	(b) 希釈率のチェック	(b) 日毎
培地分注器	分注量のチェック	調整又は交換時
ピペッター又は ピペット	分注量の*真度と精度チェック	定期的（通常使用され る頻度及び使われ方を 考慮して規定される）
スパイラルプレーター	(a) 通常の方法に対する性能の立証	(a) 据付時及び1年毎
	(b) 開始時、終了時の注入針のチェック	(b) 日毎又は使用毎

	(c) 分注量のチェック	(c) 月毎
コロニーカウンター	人手で計数した数に対するチェック	1年毎
遠心分離機	校正された独立した回転計による回転速度のチェック	1年毎
嫌気培養器又は インキュベータ	嫌気インジケータによるチェック	使用毎
試験所環境	例えば、エアーサンプラー、固定培地、 接触培地又は拭き取り綿を用いて空気 及び表面の微生物汚染の監視	週毎

付属書 F 設備の保全に関する指針

この情報は、指針の目的のために準備され、そして設備の保全の頻度は、その設備の要求や種類及び以前の性能に基づいている。

設備の種類	要求事項	示唆される頻度
(a) インキュベータ	清潔及び内部表面の消毒	(a) 月毎
(b) 冷蔵庫		(b) 必要に応じて (例：3ヶ月毎)
(c) 冷凍庫、乾燥器		(c) 必要に応じて (例：1年毎)
*水浴	空、清潔、消毒及び再補充	毎月、又は殺菌剤が使用された場合6ヶ月毎
遠心分離機	(a) 専門業者による保全	(a) 1年毎
	(b) 清潔及び消毒	(b) 使用毎
オートクレーブ	(a) ガasketの目視チェック、チャンバーの清潔/排水のチェック	(a) 製造者推奨の定期
	(b) 専門業者による全面的保全	(b) 1年毎又は 製造者の推奨に従う
	(c) 圧力容器の安全チェック	(c) 1年毎
安全キャビネット ラミナーフローキャビネット	専門業者による全面的保全及び機械的な部分のチェック	1年毎又は製造者推奨に従う
顕微鏡	専門業者による全面的保全	1年毎
pHメーター	電極の掃除	使用毎
*はかり、重量測定式希釈装置	(a) 清潔	(a) 使用毎
	(b) 専門業者による保全	(b) 1年毎
蒸留装置	清潔及びスケール除去	必要に応じて (例、3ヶ月毎)
*イオン交換装置、逆浸透装置	カートリッジ又は膜の交換	製造者の推奨に従う
嫌気培養器	清潔又は消毒	使用後
培地分注器、容量器具、ピペット、一般試験器具	適宜の汚染除去、清潔及び滅菌	使用毎
スパイラルプレーター	(a) 専門業者による保全	(a) 1年毎
	(b) 汚染除去、清潔及び滅菌	(b) 使用毎
試験所	(a) 作業面の清潔及び消毒	(a) 日毎及び使用中
	(b) 床の清潔、流し台及び洗い桶の消毒	(b) 週毎
	(c) 清潔及びその他表面の消毒	(c) 3ヶ月毎

JAB「認定の基準」についての指針—微生物試験—附属書II [EA-4/10 Accreditation for Microbiological Laboratories](#)

[EA - 4/10 - Accreditation in Microbiological Laboratories](#)

Publication

Reference

EA-4/10

Accreditation for Microbiological Laboratories

PURPOSE

This document has been produced by a joint EA/EURACHEM Working Group. It supplements ISO/IEC 17025 and provides specific guidance on the accreditation of laboratories performing microbiological testing, for both assessors and laboratories preparing for accreditation. ISO/IEC 17025 remains the authoritative documents and, in case of dispute, the individual accreditation bodies will adjudicate on unresolved matters. The guidance given in this document may be also of use to those working

towards certification to the ISO 9000 series of standards.

EA - 4/10 . Accreditation in Microbiological Laboratories

Authorship

The publication has been prepared by the working group food of the EA Laboratory Committee in collaboration with Eurachem.

Official language

The text may be translated into other languages as required. The English language version remains the definitive version.

Copyright

The copyright of this text is held by EA. The text may not be copied for resale.

Further information

For further information about this publication, contact your national member of EA or the Chairman of the EA Laboratory Committee, M. Hans Peter Ischi:
hanspeter.ischi@metas.ch or the convenor of the EA working group food, Mrs Elisa Gredilla egredilla@enac.es.

Please check our website for up-to-date information
<http://www.europeanaccreditation.org/>

Date of endorsement : June 2002

Date of implementation : June 2002

Transitional period : -----

EA - 4/10 . Accreditation in Microbiological Laboratories

(目次)

1 Introduction and scope of document	<u>4849</u>
2 Personnel	<u>4849</u>
3 Environment	<u>4950</u>
3.1 Premises	<u>4950</u>
3.2 Environmental monitoring	<u>5152</u>
3.3 Hygiene.....	<u>5152</u>
4 Validation of test methods	<u>5253</u>
5 Uncertainty of measurement	<u>5253</u>
6 Equipment - maintenance, calibration and performance verification.....	<u>5354</u>
6.1 Maintenance	<u>5354</u>
6.2 Calibration and performance verification.....	<u>5455</u>
7 Reagents and culture media	<u>5657</u>
7.1 Reagents	<u>5657</u>
7.2 In – house prepared media	<u>5657</u>
7.3 Ready – to – use – media	<u>5758</u>
7.4 Labelling.....	<u>5758</u>
8 Reference materials and reference cultures.....	<u>5859</u>
8.1 Reference materials	<u>5859</u>
8.2 Reference cultures	<u>5859</u>
9 Sampling	<u>5859</u>
10 Sample handling and identification	<u>5860</u>
11 Disposal of contaminated waste	<u>5960</u>
12 Quality assurance of results/quality control of performance	<u>6061</u>
12.1 Internal quality control	<u>6061</u>
12.2 External quality assessment (proficiency testing)	<u>6061</u>
13 Test reports	<u>6061</u>
Appendix A Glossary of Terms	<u>6263</u>
Appendix B References	<u>6265</u>
Appendix C General use of reference cultures	<u>6566</u>
Appendix D Guidance of calibration and calibration checks	<u>6667</u>
Appendix E Guidance on equipment validation and verification of Performance	<u>6768</u>
Appendix F Guidance on maintenance of equipment	<u>6970</u>

EA - 4/10 . Accreditation in Microbiological Laboratories

1 Introduction and scope of document

- 1.1 The general requirements for accreditation are laid down in the International Standard *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories* (ISO/IEC 17025 1st Ed., 1999), hereafter referred to as ISO 17025. All of these requirements must be met by laboratories seeking accreditation.
- 1.2 This document supplements ISO 17025 by providing specific guidance for both assessors and for laboratories carrying out microbiological testing. It gives detailed guidance on the interpretation of ISO 17025 for those undertaking the examination of materials, products and substances. The guidance is applicable to the performance of all objective measurements, whether routine, non-routine, or as part of research and development. Although it is written primarily for food and environmental microbiological testing, the general principles may be applied to other areas. ISO 17025 remains the authoritative document and, in cases of dispute, accreditation bodies will adjudicate on unresolved matters. The guidance given in this document may also be of use to those working towards registration under other quality standards such as GLP, GMP, GCP.
- 1.3 This document can be considered as the “Application Document” for microbiological testing as set out in Annex B of ISO 17025. This document has been produced jointly by EURACHEM and EA as a means of promoting a consistent approach to laboratory accreditation amongst EA member bodies, particularly those participating in the EA Multilateral Agreement.
- 1.4 Microbiological testing is taken to include sterility testing, detection, isolation, enumeration and identification of micro-organisms (viruses, bacteria, fungi and protozoa) and their metabolites in different materials and products, or any kind of assay using micro-organisms as part of a detection system as well as the use of micro-organisms for ecological testing. It follows that some of the guidance in this document, e.g. on laboratory environment, will need to be interpreted accordingly. This document can also provide guidance to laboratories using techniques in areas related to microbiology, such as biochemistry, molecular biology and cell culture, although there may be additional requirements for such laboratories.
- 1.5 This document is concerned with the quality of test results and is not specifically concerned with health and safety matters. However, laboratory practices should conform to national health and safety regulations. It is important to note that in some cases health and safety issues may have an effect on quality of testing and the laboratory will be required to take this into account.
- 1.6 Definitions of the terms used are given in Appendix A.

2 Personnel

ISO 17025, paragraph 5.2

- 2.1** Microbiological testing should be either performed or supervised by an experienced person, qualified to degree level in microbiology or equivalent. Alternative qualifications may meet requirements where staff have extensive relevant experience relating to the laboratory's scope of accreditation. Staff should have relevant practical work experience before being allowed to perform work covered by the scope of accreditation without supervision or before being considered as experienced for supervision of accredited work. Specific national regulations may override the guidance given in this document.
- 2.2** If the laboratory includes opinions and interpretations of test results in reports, this shall be done by authorised personnel with suitable experience and relevant knowledge of the specific application, including, for example, legislative and technological requirements and acceptability criteria.
- 2.3** The laboratory management shall ensure that all personnel have received adequate training for the competent performance of tests and operation of equipment. This should include training in basic techniques, e.g. plate pouring, counting of colonies, aseptic technique, etc., with acceptability determined using objective criteria. Personnel may only perform tests on samples if they are either recognised as competent to do so, or if they do so under adequate supervision. On-going competence should be monitored objectively with provision for retraining where necessary. Where a method or technique is not in regular use, verification of personnel performance before testing is undertaken may be necessary. The critical interval between performance of tests should be established and documented. The interpretation of test results for identification and verification of micro-organisms is strongly connected to the experience of the performing analyst and should be monitored for each analyst on a regular basis.
- 2.4** In some cases, it may be more appropriate to relate competence to a particular technique or instrument rather than to methods.

3 Environment

ISO 17025, paragraph 5.2

3.1 Premises

3.1.1 The typical laboratory is comprised of the testing facilities (where specific microbiological testing and associated activities are carried out) and ancillary facilities (entrances, corridors, administration blocks, cloak rooms and toilets, storage rooms, archives, etc). In general there are specific environmental requirements for the testing facilities. Depending on the type of testing being carried out, access to the microbiological laboratory should be restricted to authorised personnel. Where such restrictions are in force, personnel should be made aware of:

- (a) the intended use of a particular area;
- (b) the restrictions imposed on working within such areas;
- (c) the reasons for imposing such restrictions;
- (d) the appropriate containment levels.

3.1.2 The laboratory should be arranged so as to minimise risks of crosscontamination,

where these are significant to the type of test being performed. The ways to achieve these objective are, for example:

- (a) to construct the laboratory to the 'no way back' layout principle;
- (b) to carry out procedures in a sequential manner using appropriate precautions to ensure test and sample integrity (e.g. use of sealed containers);
- (c) to segregate activities by time or space.

3.1.3 It is generally considered as good practice to have separate locations, or clearly designated areas, for the following:

- sample receipt and storage areas;
- sample preparation (e.g. a segregated location should be used for the preparation of powdery products likely to be highly contaminated);
- examination of samples, including incubation;
- maintenance of reference organisms;
- media and equipment preparation, including sterilisation;
- sterility assessment;
- decontamination.

The area for washing (after decontamination) may be shared with other parts of the laboratory providing that the necessary precautions are taken to prevent transfer of traces of substances which could adversely affect microbial growth. The need for physical separation should be judged on the basis of the activities specific to the laboratory (eg number and type of tests carried out).

Laboratory equipment should not routinely be moved between areas to avoid accidental cross-contamination. In the molecular biology laboratory, dedicated pipettes, tips, centrifuges, tubes, etc. should be located in each work area (low-medium-high DNA working environments).

3.1.4 Space should be sufficient to allow work areas to be kept clean and tidy.

The space required should be commensurate with the volume of analyses handled and the overall internal organisation of the laboratory. The space should be as required according to the national regulations when available.

3.1.5 Workrooms should be appropriately ventilated and at a suitable temperature.

This may be done by natural or forced ventilation, or by the use of an air conditioner. Where air conditioners are used, filters should be appropriate, inspected, maintained and replaced according to the type of work being carried out.

3.1.6 Reduction of contamination may be achieved by having:

- smooth surfaces on walls, ceilings, floors and benches (the smoothness of a surface is judged on how easily it may be cleaned).
- Tiles are not recommended as bench covering material;
- concave joints between the floor, walls and ceiling;
- minimal opening of windows and doors while tests are being carried out;
- sun shades placed on the outside;
- easy access for cleaning of internal sun shades if it is impossible to fit them outside;

- fluid conveying pipes not passing above work surfaces unless placed in hermetically sealed casings;
- a dust-filtered air inlet for the ventilation system;
- separate hand-washing arrangements, preferably non-manually controlled;
- cupboards up to the ceiling;
- no rough and bare wood;
- wooden surfaces of fixtures and fittings adequately sealed;
- stored items and equipment arranged to facilitate easy cleaning;
- no furniture, documents or other items other than those strictly necessary for testing activities.

This list is not exhaustive, and not all examples will apply in every situation. Ceilings, ideally, should have a smooth surface with flush lighting. When this is not possible (as with suspended ceilings and hanging lights), the laboratory should have documented evidence that they control any resulting risks to hygiene and have effective means of overcoming them, e.g. a surface-cleaning and inspection programme.

3.1.7 Where laboratories are on manufacturing premises, personnel must be aware of the potential for contamination of production areas, and should demonstrate that they have taken appropriate measures to avoid any such occurrence.

3.2 Environmental monitoring

3.2.1 An appropriate environmental monitoring programme should be devised, including, for example, use of air settlement plates and surface swabbing. Acceptable background counts should be assigned and there should be a documented procedure for dealing with situations in which these limits are exceeded. Analysis of data should enable trends in levels of contamination to be determined.

3.3 Hygiene

3.3.1 There should be a documented cleaning programme for laboratory fixtures, equipment and surfaces. It should take into account the results of environmental monitoring and the possibility of cross-contamination. There should be a procedure for dealing with spillages.

3.3.2 Measures should be taken to avoid accumulation of dust, by the provision of sufficient storage space, by having minimal paperwork in the laboratory and by prohibiting plants and personal possessions from the laboratory work area.

3.3.3 Clothing appropriate to the type of testing being performed (including, if necessary, protection for hair, beard, hands, shoes, etc) should be worn in the microbiological laboratory and removed before leaving the area. This is particularly important in the molecular biology laboratory, where for example, movement from an area of high DNA load to one of low DNA load may unwittingly introduce cross-contamination. In many laboratories a laboratory coat may suffice.

3.3.4 Adequate hand washing facilities should be available.

4 Validation of test methods

4.1 The validation of microbiological test methods should reflect actual test conditions.

This may be achieved by using naturally contaminated products or products spiked with a predetermined level of contaminating organisms. The analyst should be aware that the addition of contaminating organisms to a matrix only mimics in a superficial way the presence of the naturally occurring contaminants. However, it is often the best and only solution available. The extent of validation necessary will depend on the method and the application. The laboratory shall validate standard methods applied to matrices not specified in the standard procedure.

4.2 Qualitative microbiological test methods, such as where the result is expressed in terms of detected / not detected and confirmation and identification procedures, should be validated by determining, if appropriate, the specificity, relative trueness, positive deviation, negative deviation, limit of detection, matrix effect, repeatability and reproducibility (see Appendix A for definitions).

4.3 For quantitative microbiological test methods, the specificity, sensitivity, relative trueness, positive deviation, negative deviation, repeatability, reproducibility and the limit of determination within a defined variability should be considered and, if necessary, quantitatively determined in assays. The differences due to the matrices must be taken into account when testing different types of samples. The results should be evaluated with appropriate statistical methods.

4.4 Laboratories shall retain validation data on commercial test systems (kits) used in the laboratory. These validation data may be obtained through collaborative testing and from validation data submitted by the manufacturers and subjected to third party evaluation (e.g. AOAC). If the validation data are not available or not wholly applicable, the laboratory shall be responsible for completing the validation of the method.

4.5 If a modified version of a method is required to meet the same specification as the original method, then comparisons should be carried out using replicates to ensure that this is the case. Experimental design and analysis of results must be statistically valid.

4.6 Even when validation is complete, the user will still need to verify on a regular basis that the documented performance can be met, e.g. by the use of spiked samples or reference materials incorporating relevant matrices.

5 Uncertainty of measurement

5.1 The international definition for uncertainty of measurement is given in ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology: 1993 (see Appendix B). The general approach to evaluating and expressing uncertainty in testing expected by European accreditation bodies is one based on the recommendations produced by the International Committee for Weights and Measures (CIPM), as described in the *Guide to the Expression of uncertainty in Measurement*, 1995, ISO Geneva.

- 5.2** Microbiological tests generally come into the category of those that preclude the rigorous, metrologically and statistically valid calculation of uncertainty of measurement. It is generally appropriate to base the estimate of uncertainty on repeatability and reproducibility data alone, but ideally including bias (e.g. from proficiency testing scheme results). The individual components of uncertainty should be identified and demonstrated to be under control and their contribution to the variability of results evaluated. Some components (e.g. pipetting, weighing and dilution effects) may be readily measured and easily evaluated to demonstrate a negligible contribution to overall uncertainty. Other components (e.g. sample stability and sample preparation) cannot be measured directly and their contribution cannot be evaluated in a statistical manner but their importance to the variability of results should be considered also.
- 5.3** It is expected that accredited microbiological testing laboratories will have an understanding of the distributions of organisms within the matrices they test and take this into account when sub-sampling. However, it is not recommended that this component of uncertainty is included in estimates unless the client's needs dictate otherwise. The principal reasons for this are that uncertainty due to distribution of organisms within the product matrix is not a function of the laboratory's performance and may be unique to individual samples tested and because test methods should specify the sample size to be used taking into account poor homogeneity.
- 5.4** The concept of uncertainty cannot be applied directly to qualitative test results such as those from detection tests or the determination of attributes for identification. Nevertheless, individual sources of variability, e.g. consistency of reagent performance and analyst interpretation, should be identified and demonstrated to be under control. Additionally, for tests where the limit of detection is an important indication of suitability, the uncertainty associated with the inocula used to determine the limit should be estimated and its significance evaluated. Laboratories should also be aware of the incidence of false positive and false negative results associated with the qualitative tests they use.

6 Equipment - maintenance, calibration and performance verification

ISO 17025, paragraph 5.5

As part of its quality system, a laboratory is required to operate a documented programme for the maintenance, calibration and performance verification of its equipment.

6.1 Maintenance

(Guidance on maintenance of equipment can be found in ISO 7218.)

6.1.1 Maintenance of essential equipment shall be carried out at specified intervals as determined by factors such as the rate of use. Detailed records shall be kept.

Examples of maintenance of equipment and intervals are given in Appendix F.

6.1.2 Attention should be paid to the avoidance of cross-contamination arising from equipment, e.g.:

- disposable equipment should be clean and sterile when appropriate;

- re-used glassware should be properly cleaned and sterilised when appropriate;
- ideally, laboratories should have a separate autoclave for decontamination.

However, one autoclave is acceptable provided that adequate precautions are taken to separate decontamination and sterilisation loads, and a documented cleaning programme is in place to address both the internal and external environment of the autoclave.

6.1.3 Typically, the following items of equipment will be maintained by cleaning and servicing, inspecting for damage, general verification and, where relevant, sterilising:

- general service equipment - filtration apparatus, glass or plastic containers (bottles, test tubes), glass or plastic Petri dishes, sampling instruments, wires or loops of platinum, nickel/chromium or disposable plastic;
- water baths, incubators, microbiological cabinets, autoclaves, homogenisers, fridges, freezers;
- volumetric equipment - pipettes, automatic dispensers, spiral platers;
- measuring instruments - thermometers, timers, balances, pH meters, colony counters.

6.2 Calibration and performance verification

6.2.1 The laboratory must establish a programme for the calibration and performance verification of equipment which has a direct influence on the test results. The frequency of such calibration and performance verification will be determined by documented experience and will be based on need, type and previous performance of the equipment. Intervals between calibration and verification shall be shorter than the time the equipment has been found to take to drift outside acceptable limits. Examples of calibration intervals and typical performance checks for various laboratory instruments are given in Appendix D and Appendix E.

6.2.2 Temperature measurement devices

(a) Where temperature has a direct effect on the result of an analysis or is critical for the correct performance of equipment, temperature measuring devices, e.g. liquid-in-glass thermometers, thermocouples and platinum resistance thermometers (PRTs) used in incubators and autoclaves, shall be of an appropriate quality to achieve the accuracy required.

(b) Calibration of devices shall be traceable to national or international standards for temperature. Where the accuracy permits, devices that can be demonstrated to conform to an appropriate and nationally or internationally accepted manufacturing specification may be used (e.g. ISO 1770 for liquid-in-glass thermometers). Such devices may, for example, be used for monitoring storage fridges and freezers and also incubators and water baths where acceptable tolerance around the target temperature permits.

Verification of the performance of such devices is necessary.

6.2.3 Incubators, water baths, ovens

The stability of temperature, uniformity of temperature distribution and time required to achieve equilibrium conditions in incubators, water baths, ovens and temperature-controlled rooms shall be established initially and documented, in particular with respect to typical uses (for example position, space between, and height of, stacks of Petri dishes). The constancy of the characteristics recorded during initial validation of the equipment shall be checked and recorded after each significant repair or modification. Laboratories shall monitor the operating temperature of this type of equipment and retain records.

6.2.4 Autoclaves, including media preparators

The following outlines the generally expected approach to calibration and the establishment and monitoring of performance. However, it is recognised that quantitative testing of materials and items processed by autoclaving, able to comment suitably on variation within and between batches may also provide equivalent assurance of quality.

- (a) Autoclaves should be capable of meeting specified time and temperature tolerances. Pressure cookers fitted only with a pressure gauge are not acceptable. Sensors used for controlling or monitoring operating cycles require calibration and the performance of timers verified.
- (b) Initial validation should include performance studies (spatial temperature distribution surveys) for each operating cycle and each load configuration used in practice. This process must be repeated after significant repair or modification (e.g. replacement of thermo-regulator probe or programmer, loading arrangements, operating cycle) or where indicated by the results of quality control checks on media. Sufficient temperature sensors should be positioned within the load (e.g. in containers filled with liquid/medium) to enable location differences to be demonstrated. In the case of media preparators, where uniform heating cannot be demonstrated by other means, the use of two sensors, one adjacent to the control probe and one remote from it, would generally be considered appropriate. Validation and re-validation should consider the suitability of come-up and come-down times as well as time at sterilisation temperature.
- (c) Clear operating instructions should be provided based on the heating profiles determined for typical uses during validation/re-validation. Acceptance/rejection criteria should be established and records of autoclave operations, including temperature and time, maintained for every cycle.
- (d) Monitoring may be achieved by one of the following:
 - (i) using a thermocouple and recorder to produce a chart or printout;
 - (ii) direct observation and recording of maximum temperature achieved and time at that temperature.

In addition to directly monitoring the temperature of an autoclave, the effectiveness of its operation during each cycle may be checked by the use of chemical or biological indicators for sterilisation/decontamination purposes. Autoclave tape or indicator strips should be used only to show that a load has

been processed, not to demonstrate completion of an acceptable cycle.

6.2.5 Weights and balances

Weights and balances shall be calibrated traceably at regular intervals (according to their intended use).

6.2.6 Volumetric equipment

- (a) Volumetric equipment such as automatic dispensers, dispenser/diluters, mechanical hand pipettes and disposable pipettes may all be used in the microbiology laboratory. Laboratories should carry out initial verification of volumetric equipment and then make regular checks to ensure that the equipment is performing within the required specification. Verification should not be necessary for glassware which has been certified to a specific tolerance. Equipment should be checked for the accuracy of the delivered volume against the set volume (for several different settings in the case of variable volume instruments) and the precision of the repeat deliveries should be measured.
- (b) For 'single-use' disposable volumetric equipment, laboratories should obtain supplies from companies with a recognised and relevant quality system. After initial validation of the suitability of the equipment, it is recommended that random checks on accuracy are carried out. If the supplier has not a recognised quality system, laboratories should check each batch of equipment for suitability.

6.2.7 Other equipment

Conductivity meters, oxygen meters, pH meters and other similar instruments should be verified regularly or before each use. The buffers used for verifications purposes should be stored in appropriate conditions and should be marked with an expiry date. Where humidity is important to the outcome of the test, hygrometers should be calibrated, the calibration being traceable to national or international standards. Timers, including the autoclave timer, should be verified using a calibrated timer or national time signal. Where centrifuges are used in test procedures, an assessment should be made of the criticality of the centrifugal force. Where it is critical, the centrifuge will require calibration.

7 Reagents and culture media

ISO 17025, paragraph 4.6 and 5.5

7.1 Reagents

Laboratories should ensure that the quality of reagents used is appropriate for the test concerned. They should verify the suitability of each batch of reagents critical for the test, initially and during its shelf life, using positive and negative control organisms which are traceable to recognised national or international culture collections.

7.2 In – house prepared media

7.2.1 The suitable performance of culture media, diluents and other suspension fluids prepared in-house should be checked, where relevant, with regard to:

- recovery or survival maintenance of target organisms,
- inhibition or suppression of non-target organisms,
- biochemical (differential and diagnostic) properties,
- physical properties (e.g. pH, volume and sterility).

Quantitative procedures for evaluation of recovery or survival are to be preferred (see also ISO 11133 Part 1 and 2).

7.2.2 Raw materials (both commercial dehydrated formulations and individual constituents) should be stored under appropriate conditions, e.g. cool, dry and dark. All containers, especially those for dehydrated media, should be sealed tightly. Dehydrated media that are caked or cracked or show a colour change should not be used. Distilled deionised, or reverse osmosis produced water, free from bactericidal, inhibitory or interfering substances, should be used for preparation unless the test method specifies otherwise.

7.2.3 Shelf life of prepared media under defined storage conditions shall be determined and verified.

7.3 Ready – to – use – media

7.3.1 All media (and diluents and other suspension fluids) procured ready to use or partially complete require validating before use. Evaluation of performance in recovery or survival of target organisms and the inhibition or suppression of non-target organisms needs to be fully quantitative; attributes (e.g. physical and biochemical properties) should be evaluated using objective criteria.

7.3.2 As part of the validation, the user laboratory needs to have adequate knowledge of the manufacturer's quality specifications, which include at least the following:

- Name of the media and list of components, including any supplements
- Shelf life and the acceptability criteria applied
- Storage conditions
- Sample regime / rate
- Sterility check
- Check of growth of target and non-target control organisms used (with their culture collection references) and acceptability criteria
- Physical checks and the acceptability criteria applied
- Date of issue of specification

7.3.3 Batches of media should be identifiable. Each one received should be accompanied by evidence that it meets the quality specification. The user laboratory should ensure that it will be notified by the manufacturer of any changes to the quality specification.

7.3.4 Where the manufacturer of media procured ready to use or partially complete is covered by a recognised quality system (e.g. ISO 9000-series registered), checks by the user laboratory of conformance of supplies with the specification defined through initial validation may be applied in accordance with the expectation of consistency. In other circumstances, adequate checks would be necessary on every batch received.

7.4 Labelling

Laboratories shall ensure that all reagents (including stock solutions), media, diluents, and other suspending fluids are adequately labelled to indicate, as appropriate, identity, concentration, storage conditions, preparation date, validated expiry date and /or recommended storage periods. The person responsible for preparation should be identifiable from records.

8 Reference materials and reference cultures

ISO 17025, paragraph 5.6.3

8.1 Reference materials

Reference materials and certified reference materials (see definition in Appendix A) provide essential traceability in measurements and are used, for example;

- to demonstrate the accuracy of results,
- to calibrate equipment,
- to monitor laboratory performance,
- to validate methods, and
- to enable comparison of methods.

If possible, reference materials should be used in appropriate matrices.

8.2 Reference cultures

8.2.1 Reference cultures are required for establishing acceptable performance of media (including test kits), for validating methods and for assessing/evaluating on-going performance. Traceability is necessary, for example, when establishing media performance for test kit and method validations. To demonstrate traceability, laboratories must use reference strains of microorganisms obtained directly from a recognised national or international collection, where these exist. Alternatively, commercial derivatives for which all relevant properties have been shown by the laboratory to be equivalent at the point of use may be used.

8.2.2 Following the guidance in ISO 11133-1, reference strains may be sub-cultured once to provide reference stocks. Purity and biochemical checks should be made in parallel as appropriate. It is recommended to store reference stocks in aliquots either deep-frozen or lyophilised. Working cultures for routine use should be primary subcultures from the reference stock (see Appendix C on preparation of working stocks). If reference stocks have been thawed, they must not be re-frozen and re-used.

8.2.3 Working stocks should not be sub-cultured unless it is required and defined by a standard method or laboratories can provide documentary evidence that there has been no change in any relevant property. Working stocks shall not be sub-cultured to replace reference stocks. Commercial derivatives of reference strains may only be used as working cultures.

9 Sampling

ISO 17025, paragraph 5.7

- 9.1 In many cases, testing laboratories are not responsible for primary sampling to obtain test items. Where they are responsible, it is strongly recommended that this sampling be covered by quality assurance and ideally by accreditation.
- 9.2 Transport and storage should be under conditions that maintain the integrity of the sample (e.g. chilled or frozen where appropriate). The conditions should be monitored and records kept. Where appropriate, responsibility for transport, storage between sampling and arrival at the testing laboratory shall be clearly documented. Testing of the samples should be performed as soon as possible after sampling and should conform to relevant standards and/or national/international regulations.
- 9.3 Sampling should only be performed by trained personnel. It should be carried out aseptically using sterile equipment. Environmental conditions for instance air contamination and temperature should be monitored and recorded at the sampling site. Time of sampling should be recorded.

10 Sample handling and identification

ISO 17025, paragraphs 5.7 and 5.8

- 10.1 Microbial flora may be sensitive to factors such as temperature or duration of storage and transport, so it is important to check and record the condition of the sample on receipt by the laboratory.
- 10.2 The laboratory should have procedures that cover the delivery of samples and sample identification. If there is insufficient sample or the sample is in poor condition due to physical deterioration, incorrect temperature, torn packaging or deficient labelling, the laboratory should consult with the client before deciding whether to test or refuse the sample. In any case, the condition of the sample should be indicated on the test report.
- 10.3 The laboratory should record all relevant information and particularly the following information:
- (a) date and, where relevant, the time of receipt;
 - (b) condition of the sample on receipt and, when necessary, temperature;
 - (c) characteristics of the sampling operation (sampling date, sampling conditions, etc).
- 10.4 Samples awaiting test shall be stored under suitable conditions to minimize changes to any microbial population present. Storage conditions should be defined and recorded.
- 10.5 The packaging and labels from samples may be highly contaminated and should be handled and stored with care so as to avoid any spread of contamination.
- 10.6 Sub-sampling by the laboratory immediately prior to testing is considered as part of the test method. It should be performed according to national or international standards, where they exist, or by validated in-house methods. Sub-sampling procedures should be designed to take account uneven distribution of micro-organisms (general guidance given in ISO 6887 and ISO 7218).

10.7 A procedure for the retention and disposal of samples shall be written. Samples should be stored until the test results are obtained, or longer if required. Laboratory sample portions that are known to be highly contaminated should be decontaminated prior to being discarded (see 11.1).

11 Disposal of contaminated waste

11.1 The correct disposal of contaminated materials may not directly affect the quality of sample analysis, although procedures should be designed to minimise the possibility of contaminating the test environment or materials. However, it is a matter of good laboratory management and should conform to national/international environmental or health and safety regulations (see also ISO 7218).

12 Quality assurance of results/quality control of performance

ISO 17025, paragraph 5.9

12.1 Internal quality control

12.1.1 Internal quality control consists of all the procedures undertaken by a laboratory for the continuous evaluation of its work. The main objective is to ensure the consistency of results day-to-day and their conformity with defined criteria.

12.1.2 A programme of periodic checks is necessary to demonstrate that variability (i.e. between analysts and between equipment or materials etc.) is under control. All tests included in the laboratory's scope of accreditation need to be covered. The programme may involve:

- the use of spiked samples
- the use of reference materials (including proficiency testing scheme

materials)

- replicate testing
- replicate evaluation of test results

The interval between these checks will be influenced by the construction of the programme and by the number of actual tests. It is recommended that, where possible, tests should incorporate controls to monitor performance.

12.1.3 In special instances, a laboratory may be accredited for a test that it is rarely called on to do. It is recognised that in such cases an ongoing internal quality control programme may be inappropriate and that a scheme for demonstrating satisfactory performance which is carried out in parallel with the testing, may be more suitable.

12.2 External quality assessment (proficiency testing)

12.2.1 Laboratories should regularly participate in proficiency testing which are relevant to their scope of accreditation, preference should be given to proficiency testing schemes which use appropriate matrices. In specific instances, participation may be mandatory.

12.2.2 Laboratories should use external quality assessment not only to assess

laboratory bias but also to check the validity of the whole quality system.

13 Test reports

ISO 17025, paragraph 5.10

13.1 If the result of the enumeration is negative, it should be reported as “not detected for a defined unit” or “less than the detection limit for a defined unit”. The result should not be given as “zero for a defined unit” unless it is a regulatory requirement.

Qualitative test results should be reported as “detected/not detected in a defined quantity or volume”. They may also be expressed as “less than a specified number of organisms for a defined unit” where the specified number of organisms exceeds the detection limit of the method and this has been agreed with the client.

13.2 Where an estimate of the uncertainty of the test result is expressed on the test report, any limitations (particularly if the estimate does not include the component contributed by the distribution of micro-organisms within the sample) have to be made clear to the client.

Appendix A Glossary of Terms

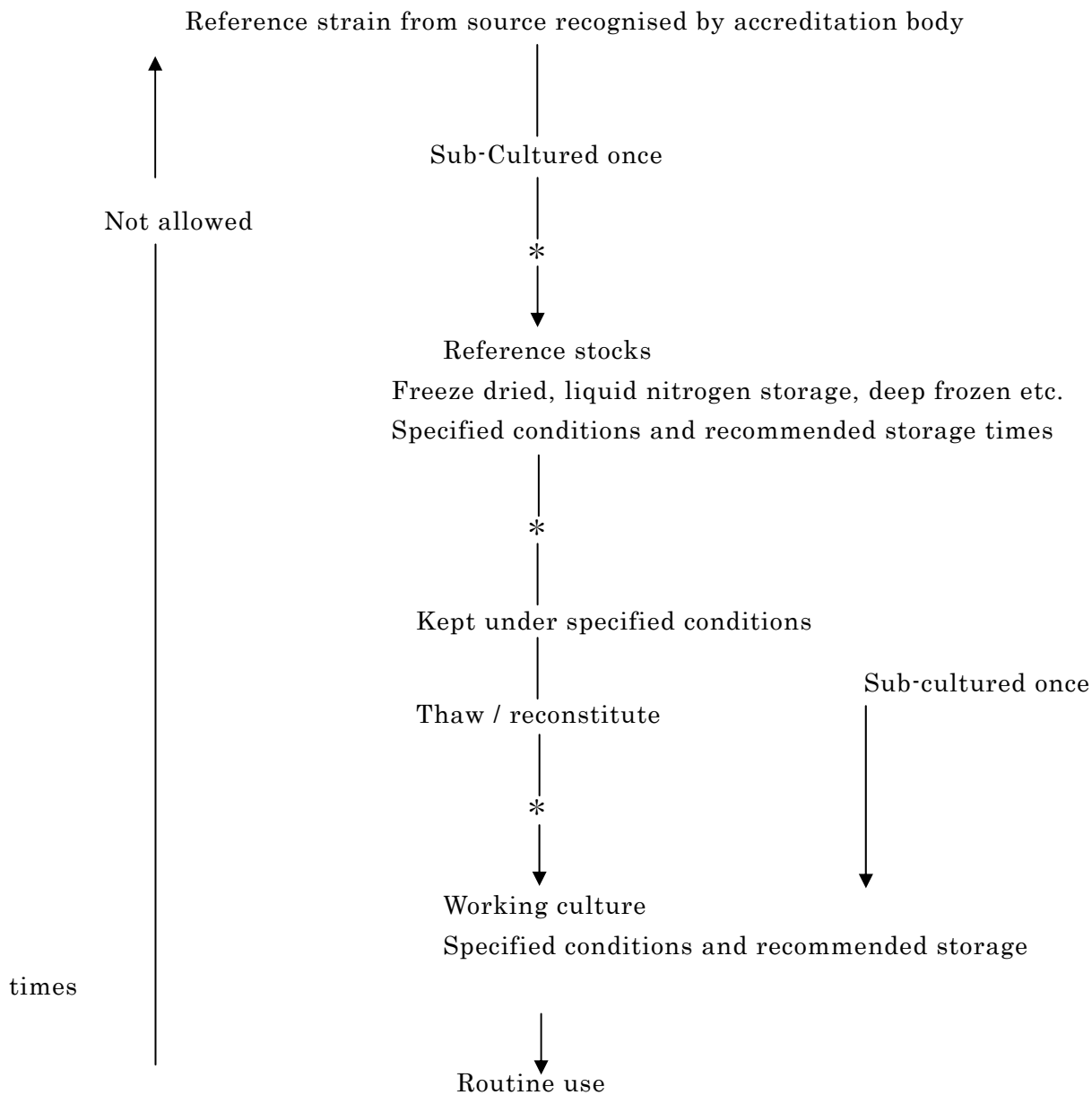
Calibration	<p>Set of operations that establish, under specified conditions, the relationship between values of quantities indicated by a measuring instrument or measuring system, or values represented by a material measure or a reference material, and the corresponding values realized by standards</p> <p>NOTES</p> <p>1 The result of a calibration permits either the assignment of values of measurands to the indications or the determination of corrections with respect to indications.</p> <p>2 A calibration may also determine other metrological properties such as the effect of influence quantities.</p> <p>3 The result of a calibration may be recorded in a document, sometimes called a calibration certificate or a calibration report.</p> <p>[VIM: 1993 ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology]</p>
Certified reference material	<p>Reference material, accompanied by a certificate, one or more of whose property values are certified by a procedure, which establishes traceability to an accurate realisation of the unit in which the property values are expressed, and for which each certified value is accompanied by an uncertainty at a stated level of confidence.</p> <p>[ISO Guide 30:1992]</p>
Limit of determination	<p>Applied to quantitative microbiological tests - The lowest number of microorganisms within a defined variability that may be determined under the experimental conditions of the method under evaluation</p>
Limit of detection	<p>Applied to qualitative microbiological tests- The lowest number of microorganisms that can be detected, but in numbers that cannot be estimated accurately.</p>
Negative deviation	<p>Occurs when the alternative method gives a negative result without confirmation when the reference method gives a positive result. This deviation becomes a false negative result when the true result can be proved as being positive.</p>
Positive deviation	<p>Occurs when the alternative method gives a positive result without confirmation when the reference method gives a negative result. This deviation becomes a false positive result when the true result can be proved as being negative.</p>
Reference cultures	<p>Collective term for reference strain, reference stocks and working cultures.</p>
Reference strains	<p>Microorganisms defined at least to the genus and species level, catalogued and described according to its characteristics and preferably stating its origin.</p>

	[ISO 11133-1:2000] Normally obtained from a recognised national or international collection.
Reference material	Material or substance one or more of whose property values are sufficiently homogeneous and well established to be used for the calibration of an apparatus, the assessment of a measurement method, or for assigning values to materials. [ISO Guide 30:1992]
Reference method	Thoroughly investigated method, clearly and exactly describing the necessary conditions and procedures, for the measurement of one or more property values that has been shown to have accuracy and precision commensurate with its intended use and that can therefore be used to assess the accuracy of other methods for the same measurement, particularly in permitting the characterisation of a reference material. Normally a national or international standard method.
Reference stocks	A set of separate identical cultures obtained by a single sub-culture from the reference strain. [ISO 11133-1:2000]
Relative trueness	The degree of correspondence of the results of the method under evaluation to those obtained using a recognised reference method.
Repeatability	Closeness of the agreement between the results of successive measurements of the same measurand under the same conditions of measurement. [VIM: 1993 ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology]
Reproducibility	Closeness of the agreement between the results of measurements of the same measurand carried out under changed conditions of measurement. [VIM: 1993 ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology]
Sensitivity	The fraction of the total number of positive cultures or colonies correctly assigned in the presumptive inspection. [ISO 13843:2000]
Specificity	The fraction of the total number of negative cultures or colonies correctly assigned in the presumptive inspection. [ISO 13843:2000]
Working culture	A primary sub-culture from a reference stock. [ISO 11133-1:2000]
Validation	Confirmation, through the provision of objective evidence, that the requirements for a specific intended use or application have been fulfilled. [ISO 9000: 2000]

Appendix B References

1. ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
2. ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations.
3. ISO 6887-1, Preparation of dilutions.
4. ISO Guide 30, Terms and definitions used in connection with reference materials.
5. ISO 9000, Quality management systems - fundamentals and vocabulary.
6. VIM: 1993, ISO international vocabulary of basic and general terms in metrology.
7. ISO (CIPM):1995, Guide to the expression of uncertainty in measurements.
8. Draft ISO/DIS 16140, Food microbiology. Protocol for the validation of alternative methods.
9. ISO 13843, Water quality – Guidance on validation of microbiological methods.
10. ISO 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1- General guidelines on quality assurance for the preparation of media in the laboratory.
11. Draft ISO/FDIS 11133-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2- Practical guidelines on performance testing on culture media.
12. EN 12741, Biotechnology- Laboratories for research, development and analysis – Guidance for biotechnology laboratory operations.

Appendix C General use of reference cultures



* Parallel purity checks and biochemical tests as appropriate

All parts of the process shall be fully documented and detailed records of all stages must be maintained

Appendix D Guidance of calibration and calibration checks

This information is provided for guidance purposes and the frequency will be based on the need, type and previous performance of the equipment.

Type of equipment	Requirement	Suggested frequency
Reference thermometers (liquid-in-glass)	Full traceable re-calibration Single point (e.g. ice-point check)	Every 5 years Annually
Reference thermocouples	Full traceable re-calibration Check against reference thermometer	Every 3 years Annually
Working thermometers & Working thermocouples	Check against reference thermometer at ice-point and/or working temperature range	Annually
Balances	Full traceable calibration	Annually
Calibration weights	Full traceable calibration	Every 5 years
Check weight(s)	Check against calibrated weight or check on balance immediately following traceable calibration	Annually
Volumetric glassware	Gravimetric calibration to required tolerance	Annually
Microscopes	Traceable calibration of stage micrometer (where appropriate)	Initially
Hygrometers	Traceable calibration	Annually
Centrifuges	Traceable calibration or check against an independent tachometer, as appropriate	Annually

Appendix E Guidance on equipment validation and verification of performance

This information is provided for guidance purposes and the frequency will be based on the need, type and previous performance of the equipment.

Type of equipment	Requirement	Suggested frequency
Temperature controlled equipment (incubators, baths, fridges, freezers)	(a) Establish stability and uniformity of temperature (b) Monitor temperature	(a) Initially, every 2 years and after repair/modification (b) Daily/each use
Sterilising ovens	(a) Establish stability and uniformity of temperature (b) Monitor temperature	(a) Initially, every 2 years and after repair/modification (b) Each use
Autoclaves	(a) Establish characteristics for loads/cycles (b) Monitor temperature/time	(a) Initially, every 2 years and after repair/modification (b) Each use
Safety cabinets	(a) Establish performance (b) Microbiological monitoring (c) Air flow monitoring	(a) Initially, every year and after repair/modification (b) Weekly (c) Each use
Laminar air flow cabinets	(a) Establish performance (b) Check with sterility plates	(a) Initially, and after repair/modification (b) Weekly
Timers	Check against national time signal	Annually
Microscopes	Check alignment	Daily/each use
pH meters	Adjust using at least two buffers of suitable quality	Daily/each use
Balances	Check zero, and reading against check weight	Daily/each use
De-ionisers and reverse osmosis units	(a) Check conductivity (b) Check for microbial contamination	(a) Weekly (b) Monthly
Gravimetric diluters	(a) Check weight of volume dispensed (b) Check dilution ratio	(a) Daily (b) Daily
Media dispensers	Check volume dispensed	Each adjustment or replacement

Pipettors/pipettes	Check accuracy and precision of volume dispensed	Regularly (to be defined by taking account of the frequency and nature of use)
Spiral platers	(a) Establish performance against conventional method (b) Check stylus condition and the start and end points (c) Check volume dispensed	(a) Initially and annually (b) Daily/each use (c) Monthly
Colony counters	Check against number counted manually	Annually
Centrifuges	Check speed against a calibrated and independent tachometer	Annually
Anaerobic jars /incubators	Check with anaerobic indicator	Each use
Laboratory environment	Monitor for airborne and surface microbial contamination using, e.g. air samplers, settle plates, contact plates or swabs	Weekly

Appendix F Guidance on maintenance of equipment

This information is provided for guidance purposes and the frequency will be based on the need, type and previous performance of the equipment.

Type of equipment	Requirement	Suggested frequency
(a) Incubators (b) Fridges (c) Freezers, ovens	Clean and disinfect internal surfaces	(a) Monthly (b) When required (e.g. every 3 months) (c) When required (e.g. annually)
Water baths	Empty, clean, disinfect and refill	Monthly, or every 6 months if biocide used
Centrifuges	(a) Service (b) Clean and disinfect	(a) Annually (b) Each use
Autoclaves	(a) Make visual checks of gasket, clean/drain chamber (b) Full service (c) Safety check of pressure vessel	(a) Regularly, as recommended by manufacturer (b) Annually or as recommended by manufacturer (c) Annually
Safety cabinets Laminar flow cabinets	Full service and mechanical check	Annually or as recommended by manufacturer
Microscopes	Full maintenance service	Annually
pH meters	Clean electrode	Each use
Balances, gravimetric diluters	(a) Clean (b) Service	(a) Each use (b) Annually
Stills	Clean and de-scale	As required (e.g. every 3 months)
De-ionisers, reverse osmosis units	Replace cartridge/membrane	As recommended by manufacturer
Anaerobic jars	Clean/disinfect	After each use
Media dispensers, volumetric equipment, pipettes, and general service equipment	Decontaminate, clean and sterilise as appropriate	Each use
Spiral platers	(a) Service (b) Decontaminate, clean and sterilise	(a) Annually (b) Each use
Laboratory	(a) Clean and disinfect working surfaces (b) Clean floors, disinfect	(a) Daily, and during use (b) Weekly (c) Every 3 months

	sinks and basins (c) Clean and disinfect other surfaces	
--	--	--

様式番号 JAB NF18 REV.0

改定履歴（公開文書用）

版番号	改定内容概略	発行日	文書責任者	承認者
1	新規発行	2004-02-01	PM (食品)	試験所技術委員会
2	<ul style="list-style-type: none"> 引用文書(ISO/TS 19036及びCAC/GL 54-2004)の追加。 エディトリアル修正。 	2013-09-01	PM (食品)	試験所技術委員会

公益財団法人 日本適合性認定協会
〒141-0022 東京都品川区東五反田 1 丁目 22-1
五反田 AN ビル 3F
Tel.03-3442-1217 Fax.03-5475-2780

本協会に無断で記載内容を引用、転載及び複製することを固くお断り致します。