



Volume 11, No. 6

This Spore News article will explore several reported issues which are
BI Impossible
by Kellie Matzinger

この孢子ニュース記事は BI が不可能であるいくつかの報告された問題を探ります

ケース 1 : 「Bourbon」効果

使用される BI の種類 : MagnaAmp (または ProSpore) アンプル

疑われる問題 : 顧客は、BI が滅菌装置から取り外されたときにすでに問題がないと報告しています

解決方法 : ネガティブコントロールの使用についてお客様へお知らせします

すべてのバイオロジカル・インジケータ (BI) 製品は一般的な方法で働きます - BI は滅菌サイクルにさらされ、孢子が培地と一緒にすることで、活性化または培養され、孢子種に特有の適切な温度で培養されます。MagnaAmp、SterilAmp、ProSpore (1ml および 4ml) および ProAmp 製品は、孢子がすでに増殖培地に懸濁されているため、単に培養するのみです。生存している孢子が露出した BI に残っていると、栄養源と理想的な培養温度を持っているので、孢子はそれらの栄養状態で発芽します。培地中の炭水化物を使用して、栄養細胞は酸性代謝物を産生し、それが蓄積するにつれて培地の pH を低下させます。pH の低下は pH 指示薬のシフトを引き起こし、失敗した滅菌サイクル (陽性) の目視確認が可能となります。それは生き残ったたった 1 つの孢子が存在しても色の変化を起こします。しかしながら、多くの生存細胞が BI 内に残っているという滅菌の大きな失敗であっても、色の変化の開始は、検出されるために依然として数時間の培養時間を必要とします。

長期間および/または高温の蒸気滅菌サイクルでは、MagnaAmp 培地内の成分はわずかに劣化し始め、培地は「バーボン色」または茶色がかった紫色になります。この鮮やかな紫色からの色の変化は、滅菌サイクルからの取り出し時または BI 培養時間の終了時に直ちに観察されると、ポジティブユニットと誤解されることがあります。このため、「ネガティブコントロールアンプル」が開発され、現在は BI 製品に付属しています。ネガティブコントロールアンプルは同じ種類および量の培地を含みますが、ネガティブコントロールアンプル内には孢子は存在していません。ネガティブコントロールアンプルは、BI 含有孢子とともに滅菌チャンバー内で露出させるべきであり、その後両方を培養します。クリティカルリードタイムでは、BI 内の培地の色とネガティブコントロール内の培地の色を比較する必要があります。ネガティブコントロールアンプルと比較した場合の試験 BI における黄色になる色の差は、孢子がそのサイクルを生き残り、そして色の変化が試験 BI

における微生物活性に起因したことを示すこととなります。培養後も BI とネガティブコントロールの色が変わらない場合、これはネガティブユニットまたは滅菌サイクルが成功したことを意味します。

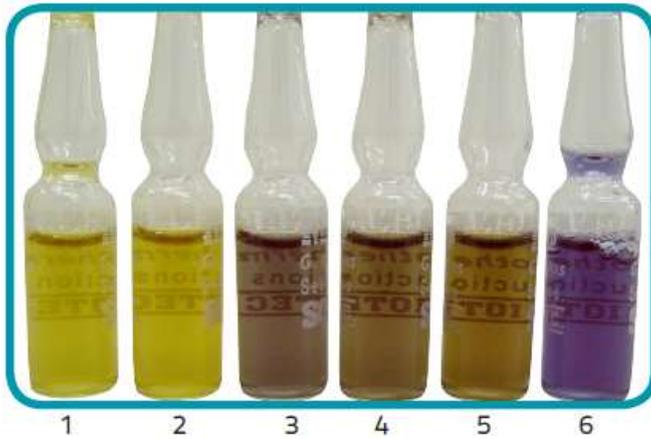


図 1

- 1) 非曝露、陽性反応
- 2) 致死量以下の曝露、陽性反応
- 3) 致死量の曝露、陰性反応
- 4) 長期曝露による培地の熱劣化、陰性反応
- 5) 培地のさらなる熱分解、長期にわたる曝露、陽性反応
- 6) 色比較のために示された非曝露、培養なし

多くの議論の後、この顧客は滅菌サイクルにおいてネガティブコントロールアンプルを曝露していなかったことに注目しました。そして、曝露していないネガティブコントロールを、曝露した BI と単に比較するだけで明らかな色の違いを確認しました。このトピックに関する追加情報については、Spore News Volume 8 No. 3 を参照してください。

ケース 2：陽性ですか？それは陽性ですか？

使用された BI の種類：ProTest Steam（または EZTest Steam）

認識された問題：BI は黄色に変色しましたが、継代培養後に孢子は存在しません

解決策：プロセス後の培養技術について説明します

陽性の BI の範囲内で行われている生化学的プロセスは、標準的な成長曲線チャートに示されているものを模倣しています。しかし、最初は栄養素を消費しつつ、細胞は非常に急速に増殖しますが、新しい細胞が産生されるにつれて同数の細胞が生存不能になるところまで成長が遅くなります（図 2 に示す「定

常期))。酸性代謝物の蓄積および利用可能な栄養素の枯渇により、環境がそれら自身の代謝廃棄物から有毒になるにつれて細胞は死に始めます。

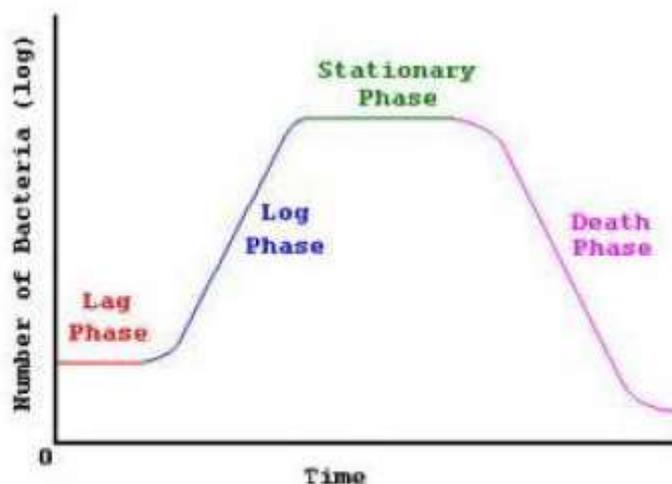


Figure 2

そのため、陽性の BI の継代培養は、そのユニットが陽性であることに気付いた直後に実行すべきです。この顧客の場合、陽性は 24 時間で認められたが、ユニットは 72 時間インキュベートし続け、それまで継代培養していませんでした。TSA 寒天プレート上に接種し、培養した時、コロニーは見られませんでした。これは生存細胞がもはや培地内に存在しないという事実によるものでした。

ケース 3 : 復元作用 - それは陽性ではない

使用される BI の種類 : EZTest Gas

認識された問題 : BI は最初、陽性 (黄色) であったが、その後長期の培養で陰性 (ピンク) になった

解決策 : 「復元作用」に関して説明します

前述のように、すべての BI は同じ一般的な方法で使用されています。BI は処理、活性化、または培養され、その後特定の孢子種を助長する増殖範囲で培養されます。ほとんどの細菌種では、初期の発芽と増殖は、エネルギー源を提供する増殖培地内に存在する炭水化物 (糖) によるものです。炭水化物代謝の副産物は酸性です。エネルギー源としてタンパク質を代謝する能力を持つ種もあります。タンパク質代謝の副産物は塩基性です。EZTest Gas 製品内に存在する孢子種は炭水化物とタンパク質の両方を代謝する能力を持つ *Bacillus atrophaeus* です。単糖は代謝がはるかに簡単です。したがって、利用可能な炭水化物とタンパク質が十分にある環境では、微生物は常に炭水化物を最初に代謝します。この顧客の場合、孢子はそのサイクルを生き延び、発芽し、そして得られた細胞は最初に培地中の炭水

化物を代謝します - それ故、培地の黄色は陽性を意味します。長時間の培養と炭水化物の枯渇により、細胞は培地内のタンパク質を代謝し始め、培地が塩基性になります。培地は最初、黄色から赤みがかかったオレンジ色（この製品内の培地の元の色で、通常は悪い結果を示します）に変わり、次第にマゼンタ色または明るいピンク色に変わることがあります。この時点で培地を精査しても、アンプル内の濁度または微生物の増殖を確認できます。

ほとんどの場合、細胞がタンパク質代謝に戻る前の pH の低下によって死滅するように、十分な炭水化物を提供するように培地処方設計しています。

ケース 4 : Subtilis の「センシティブ」な問題です

使用されている BI の種類 : SterilAmp '5230'

認識されている問題 : 「BI に何か問題があります - それは私の殺菌サイクルで陽性ができました。」

解決策 : 枯草菌の感受性について説明します

SterilAmp「5230」製品は、121℃未満の温度で液体滅菌を監視する必要がある顧客向けに開発されました。通常、この製品を使用しているお客様は 105～118℃の範囲の滅菌サイクルを行っています。これらのユニット内に接種された胞子は、*Bacillus subtilis*「5230」 ATCC# 35021 に由来します。この種の最適生育範囲は 30-39℃です。胞子の最速発芽および細胞増殖をもたらす温度範囲です。しかしながら、胞子が依然として発芽および増殖する能力を有する（より遅い速度ではあるが）増殖範囲は約 15～50℃です。したがって、この製品を安定に保ち、滅菌サイクルで使用する時に問題を減らすためには、15℃（59°F）未満の保管温度を維持することが重要です。15℃以上の温度帯で一定時間置くと、胞子が発芽し始め、栄養細胞には殺菌プロセスに対する大きな抵抗がないため、製品は役に立たなくなります。

この顧客から判断されたのは、BI が滅菌する液体に入れられていて、サイクル内の事前の条件の一部は、40℃での保持時間がありました。この種の生育範囲内の温度では、胞子は実際には保持期間中に発芽し、得られた細胞は増殖して培地を黄色に変えました。サイクルの暴露段階中に温度が 115℃に上昇すると、抵抗特性を失った栄養細胞は死滅しました。したがって、実際には BI は陽性に見えたはずですが、滅菌液体の無菌性保証は提供されませんでした。

ケース 5 : 私は誰？どこから来たの？

使用される BI の種類 : ガス試験紙

認識された問題 : 顧客の受入検査の際、16S の rRNA 同定を行いました。胞子は *Bacillus*

vallismortis と同定され、Bacillus atrophaeus は同定されませんでした

解決策：身元確認の論理的根拠について説明します

当社の孢子のトレーサビリティが維持されているだけでなく、当社の BI 製品の製造前に同一性を確認する際の多相的アプローチが使用されています。孢子の供給源は、それぞれがその特定の供給源に遡ることが可能な、認識された微生物バンクから得ています。生化学的試験、増殖試験およびコロニー形態の視覚的確認を行うことによる表現型の確認も行われます。さらに、同一性の遺伝子型確認は、16S rRNA 解析を実施することによって得られます。

生化学的試験は、チロシンを含有する寒天上で褐色／黒色の色素を生成する能力、およびブドウ糖を含有する寒天上でオレンジ色の色素を生成する能力など、Bacillus atrophaeus 種にとって非常に独特のものです。すべての種は特定の生化学的「フィンガープリント」を持っていますが、これは類似の種と比較したときにユニークとなります。ほとんどの細菌種では、これが識別判定の主な手段であるため、このフィンガープリントは 16s rRNA の識別結果を裏付けるために使用されています。しかしながら、中温性孢子形成種を同定するとき - 逆となり、そして遺伝情報は明確な生化学的結果を支持します。Bacillus atrophaeus および他の中温性種は遺伝的に非常に近接に関連しているため、16s rRNA が行われるときに配列決定された 500 塩基対の中で 1 または 2 塩基対だけが異なります。このため、遺伝子レポートは属レベルにのみ信頼がおける場合があり、一致するいくつかの種（Bacillus vallismortis を含む）をリストとしてあげるかもしれません。

トレーサビリティ、表現型の確認、遺伝子型の確認（記載されている Bacillus atrophaeus の形式）を特定の製造ロットの確認済みと、耐性を組み合わせると、芽胞種は実際 Bacillus atrophaeus であると確信しています。識別の詳細については、Spore News Volume 1 No. 4 を参照してください。

Spore News を翻訳しております。原文は下記リンクでご確認できます。※日本語訳は原文解釈の参考としてご利用下さい。

<https://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2015/04/Spore-News-Vol-11-No-6.pdf>

ご不明点、ご質問、製品のお問い合わせに関してはレーベン・ジャパン株式会社までお気軽にお問い合わせ下さい。

レーベン・ジャパン株式会社 埼玉県越谷市川柳町 3-110-8

TEL：048-961-1781 FAX：048-961-1782

メールでのお問い合わせ：info@raven-japan.jp