

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 465**

51 Int. Cl.:

C12N 9/38 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2007** **E 07872302 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 2084293**

54 Título: **Indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética**

30 Prioridad:

20.09.2006 US 533522

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.10.2014

73 Titular/es:

**AMERICAN STERILIZER COMPANY (100.0%)
5960 HEISLEY ROAD
MENTOR, OH 44060-1834, US**

72 Inventor/es:

**FRANCISKOVICH, PHILLIP P.;
YIRAVA, WILLIAM A. y
CREGGER, TRICIA A.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 501 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética.

5 Campo técnico

La tecnología descrita se refiere a indicadores biológicos desarrollados mediante ingeniería genética. Estos indicadores biológicos pueden ser útiles para determinar la eficacia de uno o más procesos de esterilización.

10 Antecedentes

Fundamentalmente en la industria del cuidado de la salud, pero además en muchas otras aplicaciones comerciales e industriales, frecuentemente es necesario controlar la eficacia de los procesos usados para esterilizar equipos tales como dispositivos médicos y no médicos, instrumentos y otros artículos y materiales. En estos procesos de esterilización frecuentemente la práctica estándar es incluir un indicador de esterilización en el grupo de artículos a esterilizar. Esto permite un enfoque directo para ensayar la letalidad de los procesos de esterilización.

15

Hansen y otros se refirieron a un biosensor de tetraciclina que comprende células de E.coli que almacenan los genes gfp bajo el control del promotor Ptet regulado por tetR. Este sensor se usa para detectar oxitetraciclina en suelo estéril (Applied and Environmental Microbiology, En. 2001, 239-244).

20

Los métodos clásicos de seguridad de la esterilidad típicamente involucran exponer un indicador de esterilización que contiene unos o más organismos de prueba al proceso de esterilización y después medir el brote de cualquiera de los organismos de prueba sobrevivientes. La esterilidad puede asegurarse si no hay brote de los organismos de prueba seguido de la exposición al proceso de esterilización. Las esporas bacterianas (por ejemplo, Geobacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, Bacillus atrophaeus, y similares) se usan típicamente como los organismos de prueba. Tras la terminación del proceso de esterilización, el indicador de esterilización se expone a un medio soporte de crecimiento líquido bajo condiciones que promoverían el crecimiento de cualquiera de las células de los organismos de prueba sobrevivientes. El medio soporte de crecimiento frecuentemente contiene un colorante químico que cambia de color en respuesta a las células en crecimiento activamente (que metabolizan). Debido a los requerimientos para el crecimiento y el metabolismo, los procesos que emplean estos organismos de prueba típicamente requieren aproximadamente 24 a 72 horas de incubación antes de que pueda determinarse la eficacia del proceso de esterilización. Un problema con este proceso se relaciona el hecho de que muchos usuarios de los artículos esterilizados, tales como los cuidadores de la salud y similares, tienen recursos limitados y pueden reutilizar los artículos "esterilizados" dentro de 24 a 72 horas y a veces inmediatamente. En tales ambientes, el período de almacenamiento de 24 a 72 horas para la verificación de la esterilidad puede ser poco práctico, costoso, e ineficiente.

25

30

35

Se propuso un proceso de detección para leer los resultados de pruebas de manera más rápida para ciertos ciclos de esterilización con vapor de agua en gravedad y prevació a 121 °C y 132 °C y ciclos de esterilización con óxido de etileno. El tiempo necesario para observar la evidencia de células indicadoras sobrevivientes se reporta ser tan pequeño como una hora. Se piensa que este proceso involucra detectar la actividad catalítica de la enzima alfa glucosidasa. Esta enzima puede producirse por un microorganismo como un componente normal de su metabolismo y puede presentarse en el revestimiento de la espora del microorganismo en ambas antes y durante la esterilización. La presencia de esta enzima puede detectarse mediante la lectura de la fluorescencia producida por la descomposición de un sustrato no fluorescente de enzima. Esto requiere el uso de un lector fluorométrico automático. La descomposición del sustrato de enzima puede tener una detección temprana alternativa a la espera de un cambio visual de color por pH para indicar un proceso de esterilización fallido. No se requiere ni el crecimiento ni el metabolismo para la señal fluorimétrica. Esto resulta en una reducción en el tiempo requerido para observar un fallo en el proceso de esterilización. Sin embargo, la enzima alfa glucosidasa, que en su origen es termofílica, puede ser más resistente al calor que el microorganismo del que se deriva. Esto puede guiar a fallos molestos, una circunstancia en la que el microorganismo de prueba, de hecho, se mata pero la enzima indicadora indica que el microorganismo permanece viable. En adición, ya que la enzima alfa glucosidasa puede presentarse en el revestimiento de la espora del microorganismo de prueba y su presencia no se necesita en el metabolismo, la detección de esta enzima puede no ser un indicio directo de vida.

40

45

50

55

Hay situaciones en donde el uso de la enzima alfa glucosidasa puede fallar al discriminar una carga esterilizada sin éxito. La esterilización exitosa con vapor de agua es dependiente tras alcanzar una temperatura y presión eficaz durante una extensión mínima de tiempo. Las esporas bacterianas se seleccionan típicamente como los organismos de prueba para este proceso porque ellas son altamente resistentes a esta combinación de los parámetros. Esto lleva una combinación particularmente letal de temperatura, presión y tiempo para matar esporas bacterianas. Aunque la molécula objetivo/reportera (alfa glucosidasa) es una enzima catalítica derivada de un organismo termofílico, y por lo tanto algo resistente al calor, es el calor del proceso el que destruye a la larga la función de la enzima. Es decir, la presión y el tiempo juegan un papel reducido en la desnaturalización de la alfa glucosidasa. Por ello, bajo condiciones de presión o tiempo subletales la enzima indicadora puede destruirse aun aunque las esporas bacterianas pueden no destruirse. Esto puede resultar en un fallo para detectar una carga no esterilizada.

60

5 La incapacidad de la tecnología existente para dar cuenta de todos los parámetros que se relacionan a la muerte celular significa que "crecimiento externo" puede requerirse para proporcionar en resultado confirmatorio final. Sin embargo, un inconveniente mayor con procesos que requieren lo que se conoce tradicionalmente como crecimiento externo se relaciona al tiempo de retardo en los resultados obtenidos para las pruebas de esterilización. Los indicadores de esterilización que requieren crecimiento externo normalmente emplean el uso de esporas bacterianas que tienen que cultivarse por al menos aproximadamente 24 a 72 horas para asegurar la detección adecuada de cualquier espora sobreviviente. Durante este tiempo, los artículos que pasaron por el proceso de esterilización y que están bajo evaluación no deberían usarse hasta que se determine la prueba de viabilidad de las esporas. Sin embargo, como se indicó anteriormente, esto es poco práctico para muchos usuarios de los artículos que requieren esterilización.

10 Por lo tanto, un problema que se presentó en la materia es proporcionar un indicador biológico que detecta con seguridad y directamente la eficacia de un proceso de esterilización dentro de un período de tiempo relativamente corto. La tecnología descrita proporciona una solución a este problema.

15 Resúmen

20 La tecnología descrita se relaciona a un indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética, que comprende: al menos un organismo de prueba y al menos un gen reportero apropiado para producir una enzima indicadora, el gen reportero que es captado por el organismo de prueba, y al menos un gen represor que inhibe la expresión del gen reportero hasta que el gen reportero se expone al menos a un inductor.

25 La tecnología descrita se relaciona a un proceso de esterilización, que comprende: exponer a un medio de esterilización un artículo a esterilizar y el indicador biológico indicado anteriormente.

30 La tecnología descrita se relaciona a un proceso para determinar la eficacia de un proceso de esterilización, que comprende: exponer a un medio de esterilización al menos un artículo a esterilizar y un indicador de esterilización que comprende el indicador biológico indicado anteriormente; y poner en contacto el indicador de esterilización con al menos un inductor y al menos un sustrato de enzima para determinar si la esterilización es eficaz.

35 La tecnología descrita se relaciona a un indicador de esterilización, que comprende: un portador que tiene una primera superficie y una segunda superficie; un soporte, el soporte que tiene una primera sección y una segunda sección, el portador que recubre la primera sección del soporte, la segunda superficie del portador que se adhiere a la primera sección del soporte, y el indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética indicado anteriormente, la segunda sección del soporte que es de dimensión suficiente para permitir la manipulación del indicador de esterilización sin poner en contacto el indicador biológico.

40 La tecnología descrita se relaciona a un indicador de esterilización, que comprende: un primer compartimiento que contiene el indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética indicado anteriormente, el primer compartimiento que se adapta para permitir al indicador biológico ponerse en contacto con un medio de esterilización durante la esterilización, y un segundo compartimiento que contiene al menos un inductor y al menos un sustrato de enzima, el segundo compartimiento que se adapta para mantener separados el inductor y el sustrato de enzima del indicador biológico durante la esterilización, y el segundo compartimiento que se adapta para permitir al inductor y al sustrato de enzima ponerse en contacto con el indicador biológico luego de que el indicador biológico se expuso al medio de esterilización.

45 Breve descripción de los dibujos

50 En los dibujos anexados, las partes y características similares tienen referencias similares.

55 Las Figuras 1-3 son diagramas de constructos de plásmidos que pueden usarse para formar el indicador biológico descrito desarrollado mediante ingeniería genética.

La Figura 4 es un diagrama del constructo de plásmido usado en el Ejemplo 1.

La Figura 5 es una vista plana de una ilustración esquemática de un indicador de esterilización que puede usarse para soportar el indicador biológico descrito.

La Figura 6 es una ilustración esquemática de una elevación lateral del indicador de esterilización representado en la Figura 5.

60 La Figura 7 es una ilustración esquemática diagramática de un indicador de esterilización para determinar la eficacia de la esterilización, el indicador de esterilización que contiene dos compartimientos, el indicador biológico precedente que se coloca en un compartimiento y al menos un inductor y al menos un sustrato de enzima que se colocan en el otro compartimiento.

Descripción detallada

- El término "esterilización" se refiere a rendir una sustancia incapaz de reproducción, de metabolismo y/o de crecimiento. Mientras esto se toma frecuentemente para querer decir ausencia total de organismos vivos, el término puede usarse en la presente para referirse a una sustancia libre de organismos vivos a un grado previamente acordado para ser aceptable. A menos que se indique de cualquier otra manera, el término esterilización puede usarse en la presente para referirse además a métodos y procedimientos menos rigurosos que la esterilización, por ejemplo, la desinfección, la higienización, y similares. El indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética y los procesos y aparatos descritos en la presente pueden usarse en los campos del cuidado de la salud, campos científicos, y similares. Esto puede usarse en aplicaciones comerciales e industriales donde pueden desearse la esterilización, la desinfección, la higienización, la descontaminación, la limpieza, y similares. Las aplicaciones comerciales e industriales pueden incluir procesos tales como, procesamiento de alimentos, pasteurización, saneamiento de suelos, saneamiento de agua, y similares.
- El proceso de esterilización por el que el indicador de esterilización descrito puede usarse puede comprender cualquier proceso de esterilización. El proceso de esterilización puede incluir los procesos de esterilización en donde el medio de esterilización o quimioesterilizante puede comprender vapor de agua, calor seco, radiación, plasma, así como también uno o más quimioesterilizantes gaseosos, uno o más quimioesterilizantes líquidos, y similares. La radiación puede comprender un haz de electrones o cualquier espectro electromagnético que incluye radiación ionizante, luz blanca pulsada o ultravioleta, microondas, y similares. La radiación puede comprender radiación gamma o beta. Los quimioesterilizantes gaseosos pueden comprender óxido de etileno, peróxido de hidrógeno gaseoso, y similares. Los líquidos quimioesterilizantes pueden comprender formalina (gas de formaldehído disuelto en agua y que opcionalmente contiene metanol para inhibir la formación de sustancias tóxicas), glutaraldehído, ácido peracético, peróxido de hidrógeno líquido, y similares.
- El indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética puede usarse para examinar la letalidad de los quimioesterilizantes contra cualquier microorganismo con menos resistencia al proceso de esterilización que el organismo de prueba proporcionada con el indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética. Estos microorganismos pueden incluir bacterias tales como *Escherichia coli*, *Legionella sp.*, *Campylobacter sp.*, y otra bacteria entérica, así como también especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* y otros microorganismos patógenos a humanos tal como *Cryptosporidium*.
- El crecimiento de un organismo puede comprender el resultado combinado de una multitud de procesos celulares. En las aplicaciones típicas del indicador de esterilización esto puede observarse en diversas maneras. Como las células crecen y se dividen sus números individuales incrementan a un punto en el que el medio soporte de las células puede cambiar de claro a opaco (turbio). Para facilitar esta observación del crecimiento, puede usarse un colorante indicador de pH. El crecimiento requiere energía. Esta energía puede proporcionarse por la capacidad de la célula para metabolizar nutrientes contenidos en el medio soporte. Los productos de descomposición de este proceso pueden provocar que el medio soporte se haga ácido. Esta acidez puede inducir a un colorante indicador de pH a cambiar de color (por ejemplo, rojo fenol). Como un resultado, el crecimiento puede observarse como la conversión del medio soporte de un color rojo claro a amarillo, por ejemplo, a una condición amarilla turbia. Aunque estos procesos son lentos, ellos representan la evidencia convincente de vida y generalmente son aceptados como punto de referencia por los varios cuerpos regulatorios de la seguridad de la esterilidad. Mediante la medición indirecta de la viabilidad como una función de la estabilidad de una enzima objetivo/reportera (por ejemplo, alfa glucosidasa), es posible acortar el tiempo requerido para conseguir un indicio de esterilidad. Sin embargo, como se indica anteriormente, este proceso aun puede requerir crecimiento externo como última confirmación. Debido a que el crecimiento y la acumulación de productos desperdicios metabólicos son el resultado final de los procesos de vida, ellos pueden requerir tiempo significativo (24 a 72 horas) para hacerse aparentes.
- Con la presente invención, un gen reportero (por ejemplo, lacZ) apropiado para producir una enzima indicadora (por ejemplo β -Galactosidasa) puede ser captado por un organismo de prueba (por ejemplo, un microorganismo bacteriano) mediante el uso de un vehículo apropiado (por ejemplo, plásmido o virus). La expresión del gen reportero puede bloquearse activamente por un gen represor (por ejemplo, xylR). La expresión del gen reportero puede permanecer bloqueada hasta que el gen represor se expone a un inductor (por ejemplo, xilosa) que puede estar presente en el medio de recuperación. Ya que el organismo de prueba no se expone al inductor hasta luego de completarse el proceso de esterilización, la enzima indicadora puede no existir antes de o durante la esterilización. Esto significa que puede no requerirse correlación entre la vulnerabilidad del organismo de prueba y aquella de la enzima indicadora para el proceso de esterilización. Lo que puede exponerse al proceso de esterilización son los mecanismos varios y vitales que el organismo de prueba usa para sobrevivir y crecer y que además se usan para la producción de la enzima indicadora. Estos puede incluir las ADN polimerasas usadas para el crecimiento celular (y replicación del plásmido), las ARN polimerasas para la transcripción de los requerimientos metabólicos de los organismos de prueba (y el gen reportero borne de plásmido o virus, por ejemplo, lacZ) y los polisomas ribosomales requeridos para la traducción de proteínas celulares (así como también la expresión de la enzima indicadora). Debido a que la enzima indicadora puede ser de acción rápida como un mecanismo generador de señal, la presencia de cualquiera de los organismos que permanecen

viabiles pueden hacerse aparente más pronto que si ellos se relacionan a los resultados finales acumulados de los mecanismos de crecimiento vitales del organismo de prueba.

5 El organismo de prueba puede comprender cualquier organismo cuya resistencia a los procesos de esterilización destinados excede aquella de los organismos que están para destruirse por el proceso de esterilización. El tipo de organismo de prueba usado puede ser dependiente tras una variedad de factores ejemplificados por, pero son limitarse a, el tipo de proceso de esterilización que se usó. El organismo de prueba puede ser un microorganismo. Las cepas que pueden usarse pueden ser aquellas que son las más resistentes al proceso usado para la esterilización. El organismo de prueba puede comprender una o más bacterias, organismos gram negativos, organismos gram positivos, y/o
10 organismos vegetativos. Los microorganismos bacterianos pueden ser aquellos que forman endosporas, por ejemplo, esporas bacterianas. El organismo de prueba puede comprender bacterias del género *Bacillus*, *Geobacillus* o *Clostridia*. Estos pueden incluir *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis globigii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli*, y similares. La bacteria puede comprender
15 hongos, micobacteria, protozoo, bacteria vegetativa, y similares. Los ejemplos de hongos que pueden usarse incluyen *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella dermatitis*, y similares. Los ejemplos de micobacterias que pueden usarse incluyen *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmantis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, y similares. Los ejemplos de protozoos que pueden usarse incluyen *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, y similares. Los ejemplos de bacterias vegetativas que pueden usarse incluyen *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus radiodurans*, *Deinococcus radiodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y similares. Los organismos tales como *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, y similares, pueden usarse para determinar la eficacia de esterilización por calor húmedo (autoclave), y es especialmente útil el *Geobacillus stearothermophilus*

Los organismos vegetativos tales como bacterias vegetativas, células vegetativas y/o sus partes constituyentes pueden usarse como el organismo de prueba. Los ejemplos pueden incluir especies coliformes y células que no forman endoesporas por ejemplo, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae)*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y similares. Estos pueden usarse en combinación con uno o más excipientes. Los excipientes pueden definirse como una amplia clase de compuestos generalmente inertes que pueden usarse para estabilizar entidades lábiles. Una subclase de excipientes que pueden usarse incluyen los carbohidratos, por ejemplo, sacáridos oligoméricos y poliméricos. Un ejemplo de tal compuesto puede ser la trehalosa que es un disacárido. Las altas concentraciones de trehalosa en los tejidos de ciertos organismos puede permitir a los organismos sobrevivir es un estado de deficiencia de agua. La trehalosa puede usarse para reactivar los componentes celulares funcionales luego de la deshidratación. La trehalosa puede proporcionar estabilidad a membranas y otras estructuras macromoleculares esenciales para la viabilidad de una célula bajo condiciones ambientales extremas (por ejemplo, la liofilización). Otros compuestos excipiente estabilizante pueden incluir azúcares simples (por ejemplo, sacarosa, glucosa, maltosa y similares) y polímeros de cadena larga (por ejemplo, dextranos, almidón, agarosa, celulosa, y similares). Otros excipientes no basados en carbohidratos pueden incluir proteínas, fosfonatos, agentes amortiguadores, ceras, lípidos, aceites así como también otros materiales basados en hidrocarburos.

Los materiales indicadores pueden comprender cepas celulares que pueden ahora tener resistencia a medios normales de tratamiento con antibiótico o desinfección química debido a las modificaciones naturales o artificiales. Los ejemplos del primer tipo pueden incluir VRE (*enterococci* resistentes a la Vancomicina), MSRA (*Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina), *Mycobacterium chelonae*, y similares. Esto puede usarse porque los VRE y los MRSA desarrollaron resistencia a contramedidas terapéuticas (por ejemplo, resistencia a antibióticos) y *M. chelonae* desarrolló resistencia a algunos modos de desinfección (por ejemplo, resistencia a glutaraldehído).

El indicador de prueba puede comprender uno o más organismos emergentes. Esto puede representar un riesgo especial o desafío para el curso terapéutico de acción o desinfección.

55 El gen reportero que es captado por el organismo de prueba se proporciona para el propósito de introducir la enzima indicadora y puede comprender *lacZ*, *bgaB*, *xylE*, *cat*, *gfp*, o una mezcla de dos o más de estos. El término "*lacZ*" se refiere a un gen que codifica para β -galactosidasa. El término "*bgaB*" se refiere al gen que codifica para la β -Galactosidasa termoestable de *G. stearothermophilus*. El término "*xylE*" se refiere a un gen que codifica para catecol-2,3-dioxigenasa de *Pseudomonas putida*. El término "*cat*" se refiere al gen que codifica para cloranfenicol acetiltransferasa, por ejemplo, de pC194. El término "*pC194*" se refiere a un constructo particular de plásmido. El término "*gfp*" se refiere al gen que codifica las variantes termoestables de la proteína fluorescente verde.

65 El gen represor puede ser captado por el organismo de prueba. El gen represor puede comprender *xylR*, *lacI*, *tetR*, o una mezcla de dos o más de estos. El término "*xylR*" se refiere al regulador del operón de xilosa. El término "*lacI*" se

refiere al regulador del operón lac. El término "tetR" se refiere al regulador del operón tet. Los homólogos termoestables de estos pueden usarse. El gen represor puede usarse para bloquear activamente la expresión de un gen reportero hasta que el gen reportero se expone al inductor, que puede presentarse en el medio de recuperación. El gen represor puede ser captado por un organismo de prueba con el mismo vehículo usado para insertar el gen reportero en el organismo de prueba.

El vehículo para insertar el gen reportero y el gen represor en el organismo de prueba puede comprender uno o más plásmidos y/o uno o más virus. Estos vehículos pueden referirse a vectores. Los plásmidos pueden comprender ADN circular de cadena doble que se separa del ADN cromosómico. Los plásmidos pueden ser lineales. El tamaño de los plásmidos puede estar en el intervalo de aproximadamente 2000 a aproximadamente 20000 pares de base (bp), y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 5000 a aproximadamente 10000 bp. Una o más copias (por ejemplo, de 1 a aproximadamente 3000 copias, y en una modalidad de 1 a aproximadamente 60 copias, y en una modalidad de aproximadamente 20 a aproximadamente 3000 copias) del mismo plásmido pueden ser captadas por una única célula del organismo de prueba. Los plásmidos pueden contener una o más secuencias de ADN que sirven como un origen de replicación (ori). Los plásmidos pueden contener uno o más marcadores genéticos. Los plásmidos pueden contener un sitio polienlazador o de clonación múltiple (MCS) que puede ser una región relativamente corta que contiene uno o más sitios de restricción que permiten la inserción de los fragmentos de ADN. Los plásmidos pueden contener uno o más genes que proporcionan un marcador selectivo para inducir al organismo de prueba a retener el plásmido. El marcador selectivo puede comprender un gen de resistencia a antibiótico y/o un gen con capacidad nutricional. Los plásmidos pueden comprender plásmidos conjugativos que contienen transgenes que pueden realizar el proceso de conjugación, la transferencia sexual de plásmidos a otra bacteria.

Los plásmidos pueden comprender al menos un origen de replicación, al menos un marcador seleccionable, al menos un promotor inducible, y al menos un gen reportero. Los Ejemplos se ilustran en las Figuras 1 y 2. El marcador seleccionable puede comprender un gen de resistencia a antibiótico y/o un gen con capacidad nutricional exógena. Estos pueden incluir genes de los antibióticos cloranfenicol, ampicilina o espectinomicina, y/o genes nutricionales de xilosa o lactosa. El promotor inducible puede comprender PxylA. El término PxylA se refiere a un promotor de transcripción que requiere xilosa para permanecer activo. El gen reportero puede comprender lacZ, bgaB, xylE, cat, gfp, y similares. El plásmido puede comprender dos orígenes de replicación. Uno de los orígenes de replicación puede comprender un origen de replicación gram negativo y el otro origen de replicación puede comprender un origen de replicación gram positivo. El origen de replicación gram negativo puede comprender *Escherichia coli*. El origen de replicación gram positivo puede comprender *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilis* o *Bacillus atrophaeus*. Los plásmidos ilustrados en las Figuras 1 y 2 pueden contener de aproximadamente 2000 a aproximadamente 20000 bp, y en una modalidad de aproximadamente 5000 a aproximadamente 10000 bp.

El plásmido puede tener la construcción ilustrada en la Figura 3. En la Figura 3, se usan las siguientes abreviaturas:

- "cat" se refiere a un segmento de ADN que contiene el gen para cloranfenicol acetiltransferasa de pC194.
- "rep" se refiere a genes para la replicación.
- "mob" se refiere a genes del factor de movilidad.
- "xylR" se refiere al regulador del operón de xilosa.
- "bgaB" se refiere al gen para la β -galactosidasa termoestable.
- "T1T2" se refiere a los terminadores 1 y 2.

Los términos "PcII," "BssSI," "BseYI," "ApaLI," "PstI," "NruI," "PacI," "PvuII," "XhoI," "SfiI," "Sall," "SpeI," "SacII," "NotI," "AatII," "SnaBI" se refieren a sitios de endonucleasa de restricción que ocurren dentro de la secuencia de ADN del plásmido representado en la Fig. 3. Estos sitios representan los puntos de clivaje para varias endonucleasas de restricción y se usan en la Figura 3 como puntos de referencia. Estos sitios pueden usarse para ayudar a identificar el plásmido. Ellos pueden usarse para cortar el plásmido en sus partes constituyentes. El plásmido ilustrado en la Figura 3 tiene 7967 pares de base.

Los plásmidos de origen natural existen sobre un amplio intervalo de organismos hospederos en la naturaleza. Ellos pueden comprender genes, elementos regulatorios y/o piezas estructurales del ADN. Los plásmidos usualmente proporcionan algunas ventajas a su organismo hospedero (por ejemplo la resistencia a antibióticos o la capacidad para usar ciertas fuentes nutricionales de energía) y pueden ser tolerados por sus organismos hospederos por tanto tiempo como pueda existir esta relación ventajosa. Los plásmidos desarrollados mediante ingeniería genética pueden comprender un mosaico de genes, elementos regulatorios y/o piezas estructurales de interés. Ya que hay muchos plásmidos de origen natural (y diseñados mediante ingeniería) disponibles, hay un extenso surtido de genes para elegir. En el caso del plásmido mostrado en las Figuras 1 y 2, los genes empleados pueden seleccionarse basado en las propiedades deseadas del constructo terminado. Estas propiedades pueden incluir la capacidad para transformar el intervalo completo de los organismos hospederos útiles, proporcionar algunas ventajas selectivas al organismo hospedero (por ejemplo, resistencia a antibióticos), producir una señal en demanda termoestable y rápidamente detectable, y proporcionar que la señal se apague hasta que se desee volver a encenderla. Esto puede lograrse al poner juntos (ligación) los atributos requeridos en la forma de segmentos de ADN de una variedad de fuentes de plásmidos. Por ejemplo, los fragmentos pueden comprender los orígenes de replicación para ambos organismos gram

positivos y gram negativos, un gen *cat* para la resistencia a cloranfenicol, un gen *bgaB* para la β -Galactosidasa termoestable, y un regulador *xyIR* para regular el producto del gen *bgaB* hasta que se necesite.

5 Un plásmido de diseño específico puede construirse mediante el ensamble de los elementos genéticos deseados. Los elementos genéticos pueden ensamblarse mediante digestión por restricción de la secuencia genética deseada de un plásmido u organismo donante para producir extremos del ADN que pueden después ligarse fácilmente a otra secuencia específica. Típicamente, un extremo no apareado 5' o 3' puede producirse a través de la digestión por restricción sobre ambas secuencias objetivo para ligación. Seguido de la digestión, las secuencias objetivo pueden purificarse y después ligarse junto con una enzima (ligasa). Es plásmido representado en la Figura 3 puede construirse mediante el ensamble de un plásmido base que contiene los orígenes de replicación de ambos organismos gram positivos y gram negativos así como también el gen *cat* para resistencia a cloranfenicol. El segmento regulador *xyIR* puede unirse al plásmido base mediante digestión por restricción del plásmido base y la ligación del segmento *xyIR*. Seguido de la confirmación de la propia unión del segmento regulador *xyIR* al segmento base, el proceso puede repetirse para ambos los segmentos del gen *bgaB* y los terminadores T1 y T2 para este gen. Tras el ensamble completo de los elementos y la confirmación del propio ensamble y la orientación, el plásmido puede insertarse en un organismo hospedero que puede usarse como organismo prueba.

20 Una partícula completa del virus, que puede referirse como un virión, puede ser un transportador de gen que puede comprender el ácido nucleico rodeado por un revestimiento protector de la proteína que puede referirse como una cápsida. Una cápsida puede comprender proteínas codificadas por el genoma viral y esta conformación puede servir como una base para la distinción morfológica. Las unidades de proteínas codificadas por virus, que pueden referirse como promotores, pueden autoensamblarse para formar la cápsida, lo que no requiere la entrada del genoma del virus, sin embargo, unos pocos virus pueden codificar proteínas que pueden asistir a la construcción de su cápsida. Las proteínas asociadas con el ácido nucleico pueden conocerse más técnicamente como nucleoproteínas, y la asociación de las proteínas de la cápsida viral con el ácido nucleico viral puede referirse como una nucleocápsida. Los virus pueden no considerarse organismos vivos y pueden perder los medios para su propia reproducción fuera de la célula hospedera. Los virus usados en la presente con bacterias pueden referirse como bacteriófagos o fagos. Los ejemplos de los virus pueden incluir bacteriófagos lambda o M13. El gen reportero y el gen represor pueden insertarse en el virus mediante un primer clivaje del ADN no recombinante del fago con una endonucleasa y después la ligación de una pieza del ADN a los dos extremos recientemente formados.

El vehículo (es decir, plásmido, virus) puede ser captado por el organismo de prueba mediante: transformación o conjugación, por ejemplo, con plásmidos, o transducción o transfección, por ejemplo, con los virus.

35 Las enzimas indicadoras, que pueden ser producidos por el gen reportero, pueden comprender beta-D-galactosidasa, beta-D-glucosidasa, alfa-D-glucosidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, butirato esterasa, caprilato esterasa lipasa, miristato lipasa, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, quimotripsina, fosfohidrolasa, alfa-D-galactosidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa, N-acetilo-beta-glucosaminidasa, beta-D-celobiosidasa, alanina aminopeptidasa, prolina aminopeptidasa, tirosina aminopeptidasa, fenilalanina aminopeptidasa, beta-D-glucuronidasa, ácido graso esterasa, o una mezcla de dos o más de estos. Pueden usarse los homólogos termoestables de estos.

45 El indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética puede exponerse al medio de esterilización durante un proceso de esterilización mediante el uso de un procedimiento apropiado. Estos pueden incluir el uso de los indicadores de esterilización ejemplificados por, pero sin limitarse a, aquellos ilustrados en las Figuras 5-7. En referencia a las Figuras 5 y 6, el indicador de esterilización 10 puede comprender el portador 12, el portador 12 que tiene una primera superficie 14 y una segunda superficie 16; el soporte 20, el soporte 20 que tiene una primera sección 22 y una segunda sección 24, el portador 12 que recubre la primera sección 22 del soporte 20, la segunda superficie 16 del portador 12 que se adhiere a la primera sección 22 del soporte 20; y un indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética 30 soportado por el portador 12. El indicador biológico 30 puede soportarse por o adherirse a la primera superficie 14 del portador 12. La segunda sección 24 del soporte 20 puede ser de dimensión suficiente para permitir manipular el indicador de esterilización 10 sin poner en contacto el indicador biológico 30. Es decir, la segunda sección 24 puede ser de dimensión suficiente para funcionar como un mango que permite de esta manera la manipulación aséptica del indicador de esterilización 10.

55 El portador 12 puede estar en la forma de un sustrato relativamente plano que se representa en los dibujos como que está en la forma de un círculo. Sin embargo, esto es para entender que el portador 12 puede tener cualquier conformación o forma deseada, por ejemplo, cuadrado, rectángulo, oval, y similares. El portador 12 puede tener una sección transversal prismática. El portador 12 puede tener un grosor que es relativamente pequeño, por ejemplo, de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 3 mm, y en una modalidad de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 2 mm, y en una modalidad de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1.5 mm, y en una modalidad de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1 mm. El área de la primera superficie 14 del portador 12, la cual proporciona soporte al indicador biológico 30, puede ser relativamente pequeña, por ejemplo, el área puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 80 mm², y en una modalidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 70 mm², y en una modalidad de aproximadamente 3 a aproximadamente 60 mm², y en una modalidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mm². Una ventaja de una pequeña área tal es que el tamaño del indicador

biológico 30 puede ser relativamente pequeño, y consecuentemente la cantidad de medio de recuperación necesario para incubar el indicador biológico puede ser relativamente pequeño y el requerimiento de tiempo para la incubación puede ser relativamente corto.

5 El portador 12 puede comprender un material poroso o un material no poroso. El portador puede comprender un portador sólido. El portador puede comprender cualquier material que no se disuelve o se deteriora durante los procesos de esterilización o incubación. El portador 12 puede comprender papel, metal, vidrio, cerámica, plástico, membranas, o una combinación de dos o más de estos. El metal puede comprender aluminio o acero. El plástico puede comprender una poliolefina, poliestireno, policarbonato, polimetacrilato, poliacrilamina, poliimida, poliéster, y similares. El portador 12
10 puede comprender una película. El portador puede estar en forma de un fieltro hilado o no tejido. El portador puede comprender una estera de fibras comprimidas. El portador puede comprender un material poroso fabricado de vidrio sinterizado, fibras de vidrio, cerámica, polímero sintético, o una combinación de dos más de estos. El portador puede comprender papel de filtro o papel absorbente. El portador puede comprender una almohadilla de celulosa.

15 El soporte 20 puede comprender cualquier material que no se disuelve o se desintegra durante los procesos de esterilización o incubación. El soporte puede comprender metal, vidrio, cerámica, plástico, o una combinación de éstos. El soporte puede comprender aluminio o acero inoxidable. El soporte puede comprender poliestireno, poliolefina (por ejemplo, polipropileno, polietileno), y similares. El soporte 20 puede ser flexible o rígido. El soporte 20 puede ser plegable. El soporte 20 representado en los dibujos es rectangular en conformación, sin embargo, esto es para entender
20 que el soporte puede tener cualquier conformación o forma, por ejemplo, cuadrado, círculo, oval, y similares. La longitud del soporte 20 puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 12 cm, y en una modalidad de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 10 cm, y en una modalidad de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 7 cm, y en una modalidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 cm, y en una modalidad de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3.5 cm. El ancho del soporte 20 puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 2 cm, y en una modalidad de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 1.5 cm, y en una modalidad de aproximadamente 0.25 a aproximadamente 1 cm. El grosor del soporte 20 puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 3 mm, y en una modalidad de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mm. La longitud de la segunda sección 24 puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 12 cm, y en una modalidad de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 11 cm, y en una modalidad de aproximadamente
25 0.5 a aproximadamente 10 cm, y en una modalidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 cm, y en una modalidad de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4.5 cm.

El soporte 20 puede estar en la forma de una hoja o tira rectangular, la primera sección 22 del soporte 20 que comprende una parte menor de la longitud del portador 20, la segunda sección 24 del soporte 20 que comprende una parte mayor de la longitud del soporte 20. La relación de la longitud de la segunda sección 24 con respecto a la longitud de la primera sección 22 puede estar en el intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 12:1, y en una modalidad de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 8:1, y en una modalidad de aproximadamente 5.5:1 a aproximadamente 6.5:1.
35

40 El portador 12 puede unirse al soporte 20 que usa soldadura sónica, sellador de calor, un adhesivo, o laminación. El portador 12 puede unirse al soporte 20 antes de o posterior a la aplicación del indicador biológico 30 al portador 12. El portador 12 puede unirse al soporte 20 posterior a la aplicación del indicador biológico 30 al soporte 12 que usa soldadura sónica o un adhesivo. La soldadura sónica puede involucrar unión del soporte al portador. El adhesivo puede ser cualquier adhesivo que es compatible con el portador 12 y el soporte 20, y no se devuelve o se deteriora durante los procesos de esterilización o incubación. El adhesivo no debe ser letal o inhibitorio a los organismos de interés. El adhesivo puede ser un adhesivo sensible a la presión.
45

El indicador de esterilización 10 para soportar el indicador biológico descrito puede usarse en cualquier proceso en donde el indicador de selección se expone a un medio de esterilización durante un proceso de esterilización y después a un inductor y sustrato de enzima para determinar si el proceso de esterilización es eficaz. El proceso de esterilización puede emplear quimioesterilizantes gaseosos o líquidos, calor seco, radiación, y similares. El indicador de esterilización 10 junto con los artículos a esterilizar pueden exponerse al medio de esterilización durante el proceso de esterilización. Tras la terminación del proceso de esterilización, el indicador de esterilización 10 puede ponerse en un frasco que contiene un medio de recuperación que comprende al menos un inductor y al menos un sustrato de enzima. El indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética puede después incubarse por un periodo de tiempo deseado y examinarse para determinar si el proceso de esterilización fue eficaz.
50
55

El indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética puede usarse en un indicador de esterilización autocontenido que comprende un envase con dos compartimentos separados. Uno de los compartimentos puede contener el indicador biológico. El otro compartimento puede contener un medio de recuperación que comprende al menos un inductor y al menos un sustrato de enzima. En el uso, el indicador de esterilización y los artículos a esterilizar pueden exponerse a un medio de esterilización. Seguido de la esterilización, el indicador de esterilización puede activarse de manera que el indicador biológico se pone en contacto con el medio de recuperación suficientemente para determinar si el proceso de esterilización fue eficaz. Estos indicadores de esterilización pueden usarse con cualquier
60

proceso de esterilización en donde el indicador biológico puede exponerse al medio de esterilización, por ejemplo, los procesos de esterilización que emplean quimioesterilizantes gaseosos.

5 El indicador de esterilización autocontenido puede estar en la forma ejemplificada por, pero sin limitarse a, aquel representado en la Figura 7. En referencia a la Figura 7, el indicador de esterilización 40 puede comprender un tubo estrecho 42, compartimiento interior 44, y tapa de cierre 46. La tapa de cierre 46 incluye las proyecciones 48. Un espacio anular 43 se forma entre la superficie interna del tubo estrecho 42 y la superficie exterior del compartimiento interior 44, el espacio anular 43 que forma otro compartimiento interior. El portador 50 se coloca en el espacio anular 43. El indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética puede soportarse por el portador 50. El portador 50 puede comprender el indicador de esterilización 10 ilustrado en las Figs. 4 y 5. El medio de recuperación puede estar contenido en el compartimiento interno 44. El tubo estrecho 42 y la tapa de cierre 46 pueden producirse de cualquier material que es compatible con las condiciones y sustancias químicas usadas en el proceso de esterilización. Estos materiales pueden incluir policarbonato, poliolefinas, poliamida, polimetacrilatos, polimetilpentenos, poliésteres, y similares. El compartimiento interno 44 puede estar en forma de un vidrio o ampulla de vidrio frágil. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre la construcción del tubo estrecho 42, el compartimiento interior 44 y la tapa de cierre en la patente de los Estados Unidos 4,304,869. El portador 50 puede comprender un material poroso o un material no poroso. El portador 50 puede comprender cualquier material que no se disuelve o deteriora durante el proceso de esterilización o incubación. El portador 50 puede comprender papel, metal, vidrio, cerámica, plástico, membranas, o una combinación de dos o más de estos. El metal puede comprender aluminio o acero. El plástico puede comprender una poliolefina, poliestireno, policarbonato, polimetacrilato, poliácridamina, poliimida, poliéster, y similares. El portador 50 puede comprender una película. El portador 50 puede estar en forma de un fieltro hilado o no tejido. El portador 50 puede comprender una estera de fibras comprimidas. El portador 50 puede comprender un material poroso fabricado de vidrio sinterizado, fibras de vidrio, cerámica, polímero sintético, o una combinación de dos más de estos. El portador 50 puede comprender papel de filtro o papel absorbente. El portador 50 puede comprender una almohadilla de celulosa. Durante la esterilización, el indicador de esterilización 40, junto con los artículos a esterilizar se expone al medio de esterilización. Cuando la esterilización se completa, la tapa de cierre 46 se presiona hacia abajo en el tubo estrecho 42. Las proyecciones 48 presionan contra el compartimiento interno 44 y provocan su ruptura. Esto le permite al medio de recuperación ponerse en contacto con el portador 50 y cualquier indicador biológico soportado por el portador 50 que pudo sobrevivir a la esterilización. Luego del tiempo predeterminado, el portador 50 puede eliminarse y la extensión de la esterilización puede determinarse mediante la detección de cambio en el indicador biológico.

35 El portador 12 o el portador 50 puede tener un área de superficie para soportar e indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 80 mm², y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mm². El número de unidades formadoras de colonias (cfu) del indicador biológico soportado por el portador 12 o el portador 50, antes de la esterilización, puede estar en el intervalo de aproximadamente 10⁴ a aproximadamente 10⁷ cfu/mm², y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 10⁵ a aproximadamente 10⁶ cfu/mm².

40 El inductor puede comprender uno o más de xilosa, alolactosa, isopropilo tiogalactosida, metalotionina, o una mezcla de dos o más de estos. El inductor puede combinarse con el sustrato de enzima en el medio de recuperación.

45 El sustrato de enzima puede comprender una sustancia o mezcla de sustancias que cuando actúan sobre la enzima indicadora se convierte en un producto modificado por enzimas. Generalmente, el producto modificado por enzimas puede comprender un material luminiscente, fluorescente, o coloreado. Alternativamente, el sustrato de enzima puede comprender uno o más compuestos que cuando actúan sobre la enzima indicadora, pueden rendir un producto que reacciona con un compuesto o composición adicional para rendir un material luminiscente, fluorescente, o coloreado.

50 Hay dos tipos básicos de sustratos de enzimas que pueden usarse para la detección de enzimas indicadoras específicas. El primer tipo de sustrato de enzima puede ser ya sea fluorogénico o cromogénico, y puede dársele una fórmula química tal como, AB. Cuando actúa sobre la enzima indicadora, AB, puede descomponerse a A+B. B, por ejemplo, puede ser ya sea fluorescente o coloreado. En una modalidad, dos compuestos B pueden reaccionar juntos para producir la señal fluorescente o coloreada. Un ejemplo específico de un sustrato fluorogénico de este tipo puede ser el 4-metilumbeliferil fosfato. En la presencia de la enzima indicadora fosfatasa, el sustrato puede descomponerse en 4-metilumbeliferona y fosfato. Otros sustratos fluorogénicos de este tipo pueden incluir los derivados de 4-metilumbeliferil, 7-amido-4-metilcumarina, indoxilo y fluoresceína. Un ejemplo de un sustrato cromogénico de este tipo puede ser el 5-bromo-4-cloro-3-indolilo fosfato. En la presencia de la fosfatasa, el sustrato puede descomponerse en azul índigo y fosfato. Otros sustratos cromogénicos de este tipo pueden incluir los derivados de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, nitrofenol y fenolfaleína.

60 El segundo tipo de sustrato de enzima puede darse por la fórmula química CD, por ejemplo, que puede convertirse por una enzima específica a C+D. Sin embargo, ni C ni D pueden fluorescer o colorearse, pero D puede ser capaz de reaccionar adicionalmente con el compuesto Z para dar un compuesto fluorescente o coloreado, que indica por lo tanto la actividad de la enzima. Un ejemplo fuorogénico específico de este tipo puede ser el aminoácido lisina. En la presencia de la enzima lisina decarboxilasa, la lisina puede perder una molécula de CO₂. La parte remanente de la lisina puede después llamarse cadaverina, que es fuertemente básica. Un indicador básico tal como la 4-metilumbeliferona puede

incorporarse y puede ser fluorescente en la presencia de una base fuerte. Un sustrato cromogénico de este tipo puede ser 2-naftilo fosfato. La enzima indicadora fosfatasa, puede reaccionar con el sustrato de enzima para rendir beta-naftol. El beta-naftol liberado puede reaccionar con un reactivo cromogénico que contiene 1-diazo-4-benzoilamino-2, 5-dietoxibenceno para producir un color violeta.

5

El sustrato de enzima puede comprender un compuesto fluorogénico, definido en la presente como un compuesto capaz de modificarse enzimáticamente, por ejemplo, mediante hidrólisis, para proporcionar un fluoróforo derivado que tiene una fluorescencia apreciablemente modificada o incrementada.

10

Los compuestos fluorogénicos pueden en sí mismos ser no fluorescentes o metafluorescentes (es decir, fluorescentes en una manera claramente diferente, por ejemplo por el color o la intensidad, que los productos correspondientes modificados por enzimas) y las longitudes de ondas adecuadas de excitación y detección, pueden usarse para separar la señal de fluorescencia desarrollada por la modificación de la enzima de cualquier otra fluorescencia que puede presentarse.

15

Un número de sustratos de enzimas pueden usarse para las enzimas indicadoras de diversos orígenes. Estos pueden incluir los derivados fluorogénicos de 4-metilumbeliferil (hidrolizable a 4-metilumbeliferona); derivados de 7-amido-4-metilcumarina; derivados de diacetilfluoresceína; y fluorescamina.

20

Los derivados de 4-metilumbeliferil que pueden usarse como el sustrato de la enzima pueden incluir: 4-metilumbeliferil-2-acetamido-4,6-O-bencilideno-2-deoxi-beta-D-lucopiranosida; 4-metilumbeliferil acetato; 4-metilumbeliferil-N-acetilo-beta-D-galactosaminida; 4-metilumbeliferil-N-acetilo-alfa-D-glucosaminida; 4-metilumbeliferil-N-acetilo-beta-D-glucosaminida; ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-alfa-D-N-acetilo neuramínico; 4-metilumbeliferil-alfa-L-arabinofuranosida; 4-metilumbeliferil alfa-L-arabinosida; 4-metilumbeliferil butirato; 4-metilumbeliferil-beta-D-celobiosida; metilumbeliferil-beta-D-N, N'-diacetilo quitobiosida; 4-metilumbeliferil elaidato; 4-metilumbeliferil-beta-D-fucosida; 4-metilumbeliferil-alfa-L-fucosida; 4-metilumbeliferil-beta-L-fucosida; 4-metilumbeliferil-alfa-D-galactósido; 4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido; 4-trifluorometilumbeliferil beta-D-galactósido; 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido; 4-metilumbeliferil-alfa-D-glucósido; 4-metilumbeliferil-beta-D-glucósido; 4-metilumbeliferil-7,6-sulfo-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucósido; 4-metilumbeliferil-beta-D-glucuronida; 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil-beta-D-glucuronida; 4-metilumbeliferil p-guanidinobenzoato; 4-metilumbeliferil heptanoato; 4-metilumbeliferil-alfa-D-mannopiranosida; 4-metilumbeliferil-beta-D-mannopiranosida; 4-metilumbeliferil oleato; 4-trifluorometilumbeliferil oleato; 4-metilumbeliferil palmitato; 4-metilumbeliferil fosfato; 4-metilumbeliferil propionato; 4-metilumbeliferil estearato; 4-metilumbeliferil sulfato; 4-metilumbeliferil-beta-D-N, N', N"-triacetilquitotriosa; 4'-metilumbeliferil 2,3,5-tri-beta-benzoil-alfa-L-arabinofuranosida; 4-metilumbeliferil-beta-trimetilamonio cinamato cloruro; 4-metilumbeliferil 4-guanidinobenzoato; y 4-metilumbeliferil-beta-D-xilosida.

35

Los derivados de 7-amido-4-metilcumarina que pueden usarse como el sustrato de la enzima pueden incluir: L-alanina-7-amido-4-metilcumarina; L-prolina-7-amido-4-metilcumarina; L-tirosina-7-amido-4-metilcumarina; L-arginina-7-amido-4-metilcumarina; L-citrulina-7-amido-4-metilcumarina; L-leucina-7-amido-4-metilcumarina; L-metionina-7-amido-4-metilcumarina; ácido L-piroglutámico 7-amido-4-metilcumarina; ácido L-aspártico beta-(7-amido-4-metilcumarina); ácido L-glutámico 1-(7-amido-4-metilcumarina); L-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina; y 7-glutaril-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina.

40

Los derivados péptidos de 7-amido-4-metilcumarina que pueden usarse como el sustrato de la enzima pueden incluir: N-t-BOC-Ile-Glu-Gly-Arg 7-amido-4-metilcumarina; N-t-BOC-Leu-Ser-Thr-Arg 7-amido-4-metilcumarina; N-CBZ-Phe-Arg 7-amido-4-metilcumarina; N-succinil-Leu-Tyr-7-amido-4-metilcumarina; Gly-Pro 7-amido-4-metilcumarina; Pro-Phe-Arg 7-amido-4-metilcumarina; N-t-BOC-Val-Pro-Arg 7-amido-4-metilcumarina; y N-glutaryl-Gly-Arg 7-amido-4-metilcumarina.

45

Los derivados diacetilfluoresceína que pueden usarse como el sustrato de la enzima pueden incluir fluoresceína diacetato, fluoresceína dibutirato, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, fluoresceína di-(beta-D-N-acetilgalactosamina), fluoresceína di-(beta-D-galactósido), fluoresceína mono-(beta-D-galactósido), y fluoresceína dilaurato.

50

Cuando la enzima indicadora cuya actividad se va a detectar es alfa-D-glucosidasa, quimotripsina o ácido graso esterasa, un sustrato de enzima fluorogénico que puede usarse puede ser 4-metilumbeliferil-alfa-D-glucósido, 7-glutarilfenilalanina-7-amido-4-metilcumarina, o 4-metilumbeliferil heptanoato, respectivamente. Cuando la enzima indicadora cuya actividad se va a detectar es alfa-L-arabinofuranosidasa, un sustrato de enzima fluorogénico que puede usarse puede ser 4-metilumbeliferil-alfa-L-arabinofuranosida. Cuando la enzima indicadora cuya actividad se va a detectar es beta-D-glucosidasa, un sustrato de enzima fluorogénico que puede usarse puede ser 4-metilumbeliferil-beta-D-glucósido.

60

Un sustrato de enzima que puede usarse puede ser un compuesto cromogénico capaz de modificarse enzimáticamente para dar un cromóforo derivado, o un producto que reacciona con otro compuesto para dar un cromóforo derivado, cuyo cromóforo tiene un color diferente o más intenso. Los compuestos cromogénicos pueden ser no coloreados o coloreados en una manera claramente diferente, por ejemplo, ya sea por el color o la intensidad, que los productos correspondientes modificados por enzimas. Las longitudes de onda adecuadas de excitación y detección, en modos

65

bien conocidos por los usuarios de la instrumentación colorimétrica, pueden usarse para separar la señal coloreada desarrollada por la modificación de la enzima de cualquier otro color que puede presentarse.

5 Los compuestos cromogénicos que pueden usarse como sustratos de enzima pueden incluir derivados de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo; derivados de nitrofenil; derivados de indoxil; y derivados de fenolftaleína.

10 Los derivados de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo que pueden usarse pueden incluir 5-bromo-6-cloro-3-indolilo acetato, 5-bromo-4-cloro-3-indolilo acetato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranosida, 5-bromo-4-cloro-3-indolilo-1,3-diacetato, 5-bromo-4-cloro-3-indolilo-beta-D-fucopiranosida, 5-bromo-4-cloro-3-indolilo-beta-D-glucopiranosida, ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolilo-beta-D- glucurónico, 5-bromo-4-cloro-3-indolilo fosfato, y 5-bromo-4-cloro-3-indolilo sulfato.

15 Los derivados de nitrofenil que pueden usarse pueden incluir derivados de p-nitrofenol y o-nitrofenol. Estos incluyen dietil-p-nitrofenil fosfato; di-p-nitrofenil fosfato; p-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxi-3-O-beta-galactopiranosil-beta-glucopiranosida; p-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxi-beta-glucopiranosida; p-nitrofenil acetato; p-nitrofenil-N-acetilo-beta-D-glucosaminida; p-nitrofenil-beta-D-N, N'-diacetilquitobiosida; p-nitrofenil-alfa-glucopiranosida; p-nitrofenil-alfa-maltosida; p-nitrofenil-beta-maltosida; p-nitrofenil-alfa-mannopiranosida; p-nitrofenil-beta-mannopiranosida; p-nitrofenil miristato; p-nitrofenil palmitato; p-nitrofenil fosfato; bis(p-nitrofenil)fosfato; tris(p-nitrofenil)fosfato; p-nitrofenil-beta-glucopiranosida; p-nitrofenil-beta-glucuronida; alfa-p-nitrofenilglicerina; p-nitrofenil-alfa-rhamnopiranosida; p-nitrofenil estearato; p-nitrofenil sulfato; p-nitrofenil-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-beta-glucosaminida; p-nitrofenil timidina mono-fosfato; metil éster del ácido p-nitrofenil-2,3,4-triO-acetilo-beta-glucurónico; y p-nitrofenil valerato.

20 Los o-nitrofenoles útiles pueden incluir o-nitrofenil acetato, o-nitrofenil-beta-glucósido y o-nitrofenil-beta-D-glucopiranosida. Otros derivados de nitrofenil útiles pueden incluir nitrofenil-beta-fucopiranosida; nitrofenil-alfa-galactopiranosida; nitrofenil-beta-galactopiranosida; nitrofenil butirato; nitrofenil caprato; nitrofenil caproato; nitrofenil caprilato; nitrofenil laurato; y nitrofenil propionato.

25 Los derivados de indoxilo que pueden usarse pueden incluir indoxil-acetato; indoxil beta-D-glucósido; 3-indoxil sulfato; y 3-indoxil fosfato.

30 Los derivados de fenolftaleína que pueden usarse pueden incluir: fenolftaleína dibutirato; fenolftaleína difosfato; fenolftaleína disulfato; fenolftaleína ácido glucurónico; fenolftaleína ácido mono-beta-glucosidurónico; fenolftaleína ácido mono-beta-glucurónico; y fenolftaleína mono-fosfato.

35 Los sustratos cromogénicos de enzima descritos anteriormente pueden reaccionar directamente con una enzima indicadora adecuada para producir un cromóforo.

40 Sustratos enzimáticos adicionales que contienen derivados de 1-naftilo, 2-naftilo y naftilo-AS-BI pueden emplearse si el producto modificado de enzima reacciona después con un reactivo cromogénico, tal como colorantes diazo, por ejemplo, 1-diazo-4-benzoilamino-2, 5-dietoxibenceno, 1-diazo-4-benzoilamino-2, 5-dietoxibenceno, p-diazo-2,5-dietoxi-N-benzoilalanina, cloruro de 4-cloro-2-metilbenceno diazonio, y sal de o-aminoazotolueno diazonio, para producir un cromóforo.

Los derivados de 1-naftilo que pueden usarse pueden incluir 1-naftilo-N-acetil-beta-D-glucosaminida.

45 Los derivados de 2-naftilo que pueden usarse pueden incluir 2-naftilo-fosfato; 2-naftilo-butilato; 2-naftilo-caprilato; 2-naftilo-miristato; L-leucil-2-naftiloamida; L-valil-2-naftiloamida; L-cistol-2-naftiloamida; N-benzoil-DL-arginina-2-naftiloamida; N-glutaril-fenilalanina 2-naftiloamina; 2-naftilo-fosfato; 6-Br-2-naftilo-alfa-D-galacto-piranosida; 2-naftilo-beta-D-galacto-piranosida; 2-naftilo-2-D-glucopiranosida; 6-promo-2-naftol-beta-D-glucopiranosida; 6-bromo-2-naftilo-2-D-manopiranosida; y 2-naftilo-alfa-L-fucopiranosida.

50 Los derivados de naftilo-AS-BI que pueden usarse pueden incluir naftilo-AS-BI-fosfato; y naftilo-AS-BI-beta-D-glucurónido.

55 Cuando la enzima indicadora cuya actividad va a detectarse es alfa-D-glucosidasa, el sustrato de enzima puede ser p-nitrofenil-alfa-glucopiranosida. Cuando la enzima indicadora cuya actividad va a detectarse es alfa-L-arabinofuranosidasa, el sustrato de enzima que puede usarse puede ser p-nitrofenil-alfa-L-arabinofuranosida. Cuando la enzima indicadora cuya actividad va a detectarse es β -Galactosidasa, el sustrato de enzima puede ser 5-bromo-4-cloro-3-indolilo- β -D-galactopiranosida o 4-metilumbeliferona- β -D-galactopiranosida.

60 El sustrato de enzima que puede usarse puede depender de la identidad de la enzima indicadora cuya actividad está bajo estudio. Más abajo está una lista de un número de sustratos de enzimas y las enzimas indicadoras correspondientes que pueden reaccionar con el sustrato de enzima para producir un producto que tiene modificada o incrementada considerablemente la fluorescencia o el color.

	Sustrato de enzima	Enzima Indicador
5	4-metilumbeliferil-β-D- galactopiranosida	β-D-Galactosidasa
	4-metilumbeliferil-α-D- galactopiranosida	α-D-Galactosidasa
	4-metilumbeliferil-β-D-galactósido	β-D-Galactosidasa
	D-Melibiosa	α-D-Galactosidasa
10	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosida	β-D-Galactosidasa
	p-nitrofenil-α-D-galactopiranosida	α-D-Galactosidasa
	Fenil- β-D-glucopiranosida	β-D-glucosidasa

15 Cuando la enzima indicadora es β-galactosidasa, el sustrato de enzima puede comprender 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida (X-gal), 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-β-galactopiranosida (Mag-gal), 5-Bromo-3-indolil-β-D-galactopiranosida (Bluo-gal), 6-Bromo-2-naftilo-β-D-galactopiranosida, 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida (Rose-gal), 3-indoxil-β-D-galactopiranosida (Y-gal), 5-yodo-3-indoxil-β-D-galactopiranosida, N-metilindoxil-β-D-galactopiranosida, 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosida (ONPG), 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosida (PNPG), fenilo-β-D-galactopiranosida (P-gal), 2-cloro-4-nitrofenil-β-D-lactósido, 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 4-trifluorometilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, fluoresceína di(β-D-galactopiranosida) (FDG), fluoresceína mono-β-D-galactopiranosida, fluoresceína di-(β-D-acetilo galactosamina), 4-metilumbeliferil-β-D-lactopiranosida, 2-naftilo-p-D-galactopiranosida, 8-hidroxiquinoleína-β-D-galactopiranosida, Resorufina β-D-galactopiranosida, 3-Carboxiumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 4-Clorometil-6,8-difluorumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 6,8-Difluor-4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 6,8-Difluoro-4-heptadecilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 5-(Pentafluorobenzoilamino)-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, C₂-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, C₈-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, C₁₂-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, 5-Clorometilfluorescein-β-D-galactopiranosida, C₁₂-resorufin-β-D-galactopiranosida, 7-hidroxilo-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO), o una mezcla de dos o más de estos.

30 Luego que se completó el proceso de esterilización, el portador 12 o el portador 50, con cualquiera de los indicadores biológicos desarrollados mediante ingeniería genética que pudieron sobrevivir el proceso de esterilización, pueden ponerse en contacto con o ponerse en un medio de recuperación que contiene un medio de crecimiento nutriente, un inductor y un sustrato de enzima. El medio de recuperación puede comprender un medio acuoso o solución acuosa que proporciona la germinación, el metabolismo y el posterior crecimiento fuera de los organismos como se requiere. El medio acuoso o la solución acuosa pueden amortiguarse. El inductor puede provocar que el gen represor en el indicador biológico se disocie del vehículo (es decir, plásmido, virus). Esto puede permitir que la transcripción/traduccion ocurra lo que produce por lo tanto la enzima indicadora. La enzima indicadora puede ponerse en contacto con el sustrato de enzima que resulta en la formación del producto modificado por enzima que puede tener un color o una fluorescencia detectable.

40 La concentración de sustrato de enzima en la solución acuosa o medio acuoso puede ser dependiente de la identidad del sustrato de enzima y la enzima indicadora, la cantidad de producto modificado por enzima que debe generarse para ser detectable, ya sea visualmente o mediante instrumento, y la cantidad de tiempo requerido para determinar si está presente la enzima indicadora. La cantidad de sustrato de enzima que puede ser suficiente puede ser la cantidad necesaria para reaccionar con cualquier enzima indicadora que puede estar presente luego de que la esterilización se completó tal que un producto modificado por enzimas a una concentración molar de al menos aproximadamente 10⁻¹⁵ molar puede producirse dentro de un periodo de tiempo hasta aproximadamente 4 horas, y en una modalidad una concentración molar de al menos aproximadamente 10⁻⁸ molar dentro de un periodo hasta aproximadamente 2 horas.

50 La concentración del inductor en la solución acuosa o medio acuoso puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 % p/v, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % en p/v, y en una modalidad aproximadamente 2 % p/v.

55 El pH de la solución acuosa o medio acuoso que contiene el medio de crecimiento nutriente, inductor y sustrato de enzima puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9.5, y en una modalidad aproximadamente 7.5.

60 El inductor y el sustrato de enzima en el medio de recuperación pueden incubarse con el indicador biológico luego de que el indicador biológico se sometió al ciclo de esterilización. La incubación puede continuarse por un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para liberar una cantidad detectable del producto modificado por enzimas, suponiendo que cualquiera de los indicadores biológicos permanece funcional. En general, la cantidad de producto modificado por enzima que puede detectarse puede ser tan inferior como aproximadamente 1 x 10⁻¹⁵ molar. Las condiciones de incubación pueden ser suficientes para generar al menos aproximadamente 1 x 10⁸ molar de producto modificado por enzimas, y en una modalidad de aproximadamente 1 x 10⁻⁶ a aproximadamente 1 x 10⁻⁵ molar de producto modificado por enzimas. El tiempo y la temperatura de incubación necesarios para producir una cantidad

detectable de producto modificado por enzimas puede depender de la identidad de la enzima indicadora y el sustrato de enzima, y las concentraciones de cada una presentes en el medio de recuperación. En general, la temperatura de incubación puede estar en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 70 °C. El tiempo de incubación puede estar en el intervalo hasta aproximadamente 4 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 4 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 1 hora.

Generalmente, los métodos aplicables para detectar el producto modificado por enzima que pueden usarse pueden incluir técnicas fotométricas, potenciométricas, gravimétricas, calorimétricas, conductométricas, o amperométricas. Pueden usarse métodos fluorométricos o espectrofotométricos. Por ejemplo, el sustrato de enzima puede comprender un derivado de 4-metilumbeliferil que en interacción con la enzima indicadora puede dar lugar a umbeliferona que puede controlarse fluorométricamente o el sustrato puede comprender un nitrofenol, o tipo similar de derivado, que en interacción con la enzima indicadora puede dar lugar a un producto modificado por enzima que puede controlarse colorimétricamente.

El indicador biológico, aunque se describió primariamente en la presente en términos de una enzima indicadora única, puede proporcionar una pluralidad de enzimas indicadoras. Por ejemplo, el indicador biológico puede proporcionar tres tipos de enzimas indicadoras, una enzima que es resistente al calor, una segunda enzima que es resistente al medio esterilizante gaseoso, y una tercera que es resistente a la radiación, por ejemplo, radiación beta o gamma.

La tecnología descrita puede proporcionar un número de ventajas sobre la materia anterior. Estas pueden incluir identificar una enzima (por ejemplo, beta galactosidasa) solamente sobre las bases de la estrategia de generación de señal, seleccionar un sustrato de enzima (por ejemplo, 5-bromo-4-cloro-3-indolilo-β-D galactopiranosida o X-gal) para la enzima que no siempre necesita el uso de un lector electromecánico, y acoplar la seguridad de la esterilidad (muerte celular) a la viabilidad genética total del organismo de prueba. Al limitar el rol de la enzima indicadora a la generación de la señal, puede eliminarse la necesidad de ajustar o correlacionar la susceptibilidad de la enzima indicadora a la del organismo de prueba.

Las ventajas de utilizar el indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética descrito pueden incluir proporcionar resultados de si la esterilización es eficaz dentro de un período relativamente corto de tiempo en el intervalo de hasta aproximadamente 4 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 4 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 horas, y en una modalidad en el intervalo de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 1 hora. En virtud del uso del indicador biológico descrito desarrollado mediante ingeniería genética, este puede ser posible para medir directamente la viabilidad de un organismo de prueba, más que por la medición indirecta de una molécula sustituta. El uso del indicador biológico descrito puede no limitarse a cualquier método particular de esterilización. Es decir, los indicadores biológicos descritos pueden usarse para cualquier proceso de esterilización. La eficacia de un proceso de esterilización puede determinarse mediante el uso del indicador biológico descrito desarrollado mediante ingeniería genética sin que requiera crecimiento externo para proporcionar la confirmación final de la eficacia de la esterilización. Al usar el indicador biológico descrito, puede no ser necesario emplear un sensor electroquímico para determinar si la esterilización es eficaz, aunque pueden ser posibles resultados más rápidos con un sensor. Este indicador biológico descrito puede corregirse para usar con aplicaciones instantáneas de lectura tales como aplicaciones chip o sensor. El indicador biológico descrito desarrollado mediante ingeniería genética puede aplicarse a cualquier proceso que emplea un organismo más resistente, un organismo clínicamente significativo o un organismo de guerra biológica.

El uso del indicador biológico descrito desarrollado mediante ingeniería genética para la detección de la eficacia de un proceso de esterilización puede involucrar el uso de la medición basado en un modelo teórico genético (solo una célula viva puede expresar un gen). El indicador biológico descrito desarrollado mediante ingeniería genética puede responder a cualquier evento letal o combinación de eventos letales (transcripción, traducción, etc.). El indicador biológico descrito puede proporcionar una respuesta de acción rápida a cualquier modo de acción biocida (vapor de agua, ácido peracético, óxido de etileno, formaldehído líquido, formaldehído gaseoso, peróxido de hidrógeno líquido estabilizado, vapor de peróxido de hidrógeno oxidado, calor seco, ozono, orto-ftalaldehído, glutaraldehído, cloraminas, aminos cuaternarias, fenólicos, iodóforos, radiación ionizante, radiación ultravioleta, luz blanca pulsada, plasma, radiación de microonda, etc.). El uso del indicador biológico descrito desarrollado mediante ingeniería genética puede proporcionar la ventaja de la ausencia de una enzima indicadora o molécula reportera (por ejemplo, beta-galactosidasa) antes de o durante el proceso de esterilización bajo evaluación.

Ejemplo 1

El plásmido ilustrado en la Figura 4 se construye mediante digestión por restricción del plásmido base y la ligación del segmento regulador *xyIR* al plásmido base. Seguido de la confirmación de la unión adecuada del regulador *xyIR* al segmento base, el proceso se repite para ambos el segmento del gen *bgaB* y los terminadores T1 y T2 para este gen.

Tras el completo ensamble de los elementos genéticos y la confirmación del ensamble y la orientación adecuados, el plásmido se inserta en un organismo hospedero. El plásmido puede referirse como Plásmido núm. 1.

Ejemplo 2

5

Un plásmido puede internalizarse mediante el uso de la técnica de transformación dentro de un organismo hospedero mediante el uso de diversos métodos. Estos métodos pueden incluir los métodos de protocubrimiento, de electroporación, de metodologías de balística, de inducción de competencia, de transducción, o químicos (cloruro cálcico). Para este ejemplo, la *E. coli* competente se transforma a través de transformación química. La *E. coli* deficiente de cualquier sistema de restricción se almacena a -70 °C. La *E. coli* se descongela en hielo y se mezcla. La *E. coli* se expone al Plásmido núm. 1 en hielo por 30 minutos. La mezcla *E. coli*/plásmido resultante se choca con calor a 42 °C por 30 segundos y se transfiere a un baño de hielo por dos minutos. El medio caliente después se añade a la mezcla de *E. coli*/plásmido y se incuba a 37 °C por 60 minutos. Las muestras se ponen en placas de agar que contienen antibiótico y X-gal. Las colonias que exhiben un color azul se transforman exitosamente.

10

15

Ejemplo 3

El *Bacillus subtilis* se crece toda la noche en caldo de cultivo LB que contiene 0.5 M sorbitol, se lava tres veces en 10 % en peso de glicerol con 0.5 M sorbitol y 0.5 M manitol, y se somete a electroporación en la presencia del Plásmido núm. 1. La electroporación se realiza en un intervalo de voltajes (1800-2500 V). Los organismos resultantes se recuperan en el medio (caldo de cultivo LB con 0.5 M sorbitol y 0.5 M manitol) y se permite su recuperación por tres horas a 37 °C. Seguido de la recuperación, los organismos se ponen sobre placas de agar LB que contienen antibióticos para la selección de los organismos transformados y se incuban a 37 °C. La colonias que exhiben crecimiento se ponen sobre placas de agar LB que contienen un inductor (2 % en peso de xilosa), marcador seleccionable (cloranfenicol a 5 mg/ml), y X-gal (80 mg/ml). Las colonias que exhiben un color azul sobre estas placas de agar se transformaron exitosamente.

20

25

El *Bacillus subtilis* transformado se esporula mediante el uso del siguiente método. Una alícuota de *B. subtilis* vegetativo se esparce por las placas con medio agar. Las placas de agar se incuban a 37 °C por cinco días. Seguido de la incubación, los organismos se recuperan de forma aséptica a partir de la superficie del agar y se evalúan para la esporulación mediante el uso de microscopía de contraste de fase. Las endosporas se lavan diversas veces antes de usar.

30

Ejemplo 4

Las esporas de *Bacillus subtilis* transformado se inoculan directamente en la parte inferior de diversos frascos SCBI fabricados a partir de diferentes materiales (Lexan, Huntsman P4G4Z-011, Huntsman P4C6Z-D59, y Exxon PD9465E1 y unos 200 µl de microcélulas) y se secan al aire toda la noche. Una alícuota de 10 µl de una suspensión de spora de 10⁸ cfu/ml de *B. subtilis* transformado se usa para la inoculación. Seguido del secado de la suspensión de spora inoculada e inmediatamente antes de la incubación, se añadió 1 ml de caldo de cultivo LB con 2 % xilosa a los materiales Lexan, Huntsman, y Exxon. Se le añadieron a la microcélula, 100 µl de caldo de cultivo LB con 2 % en peso de xilosa.

35

40

El caldo de cultivo LB tiene la siguiente formulación:

45

Agua desionizada	800 ml
NaCl	10 g/l
Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
xilosa	20 g/l

50

Agua desionizada para proporcionar un volumen final de 1 litro
5N NaOH para ajustar el pH a 7.0

55

Inmediatamente seguido de la adición de medio de crecimiento, se añadieron 100 µl de 200 µg/ml 4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido (MUG) en N,N - dimetilformamida (DMF) a las muestras (10 µl para la microcélula). Cada muestra se pone en un Módulo Turner precalentado en una incubadora a 37 °C. El Módulo Turner se opera en el modo de fluorescencia UV. La fluorescencia producida a partir de una conversión del sustrato que resulta de la producción de beta-galactosidasa de los organismos en crecimiento se evalúa cada minuto por 3 horas. Un incremento en la fluorescencia indica la producción de beta-galactosidasa. Los resultados son de la siguiente manera:

60

ES 2 501 465 T3

		Tiempo de incubación (min)			
Muestra		60 min	90 min	120 min	180
5	Lexan	0.8716	0.8679	0.8677	0.8680
	Huntsman P4G4Z-011	0.8399	0.8386	0.8386	0.8384
	Huntsman P4C6Z-D59	0.8497	0.8448	0.8423	0.8428
10	Exxon	0.8470	0.8437	0.8425	0.84431
	Microcell	0.8696	0.8697	0.8735	--

15 Los datos de fluorescencia se normalizan.

Ejemplo 5

20 La cantidad de beta-galactosidasa producida a partir de *Bacillus subtilis* cultivado en medio de crecimiento LB con varias concentraciones de xilosa se evalúa mediante el uso de un espectrofotómetro en ultravioleta visible. Las siguientes combinaciones se evalúan:

- Caldo LB solamente
- Caldo LB que contiene 1 % en peso de xilosa
- 25 • Caldo LB que contiene 2 % en peso de xilosa
- Caldo LB que contiene 3 % en peso de xilosa

30 Se usa el siguiente procedimiento. Los 9 ml de cada combinación medio - xilosa se transfieren a un vaso estéril. Una alícuota de 1 ml de 10^8 cfu/ml esporas de *Bacillus subtilis* transformado se transfiere a cada vaso para dar una concentración inicial de partida de 10^7 cfu/ml esporas *B. subtilis*. Cada muestra se incuba a 37 °C por 6.5 horas para permitir que ocurra la producción de suficiente beta-galactosidasa. Seguido de la incubación, cada muestra se filtra en un filtro HV Durapore 0.45 µm. Una alícuota de 1 ml de cada muestra se hace reaccionar con una alícuota de 1 ml de 1.0 mg/ml solución de ONPG (en amortiguador fosfato) por 30 minutos a temperatura ambiente en una cubeta de espectrofotometría ultravioleta visible. Se toman las mediciones de la absorbancia de cada muestra a 420 nm. Los resultados de la absorbancia son de la siguiente manera:

Medio	Abs a 420nm
Caldo LB solamente	0.002
40 Caldo LB con 1% en peso de xilosa	0.075
Caldo LB con 2% en peso de xilosa	0.113
Caldo LB con 2% en peso de xilosa	0.067

45 Los valores superiores de absorbancia se correlacionan a una superior producción de beta-galactosidasa.

Ejemplo 6

50 Las muestras de la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* transformado se inoculan en 200 µl de microcélulas para dar las siguientes poblaciones de esporas: 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0 cfu/microcélula. A cada microcélula inoculada, se le añadieron 100 µl de caldo de cultivo LB con 2 % en peso de xilosa y 10 µl de 100 µg/ml MUG en DMF. Cada muestra se puso en el Módulo Turner a 37 °C y las mediciones de la fluorescencia se tomaron cada minuto por 2 horas. Un incremento en la fluorescencia indica producción de beta-galactosidasa. Los resultados son de la siguiente manera:

		Tiempo de incubación (min)				
Población	15	30	45	60	90	120
60 10^6 cfu	0.8566	0.8465	0.8530	0.8549	0.8636	0.8708
10^4 cfu	0.8797	0.8705	0.8770	0.8751	0.8790	0.8841
10^2 cfu	0.8617	0.8516	0.8515	0.8588	0.8648	0.8699
65 10^0 cfu	0.9167	0.9019	0.9009	0.8977	0.8984	0.9016

Los datos de fluorescencia se normalizan.

Ejemplo 7

Una alícuota de 10 µl de 10⁸ cfu/ml esporas de *Bacillus subtilis* transformado se transfieren en cada uno de cuatro 200 µl de microcélulas. Las microcélulas inoculadas resultantes se secan al aire. Se le añadieron a cada muestra, 100 µl de caldo de cultivo LB con 2 % en peso de xilosa. Después se añadieron 10 µl de la concentración adecuada de MUG. Se evalúan las siguientes concentraciones de MUG:

- 1.0 mg/ml
- 500 µg/ml
- 200 µg/ml
- 100 µg/ml

Todas las soluciones de MUG contienen MUG disuelto en DMF. Seguindo de la adición de las soluciones de MUG a la microcélula, la microcélula se pone en el Módulo Turner y se precalienta a 37 °C en una incubadora. Las mediciones de la fluorescencia se toman cada minuto por 120 minutos. Un incremento en la fluorescencia indica la producción de beta-galactosidasa. Los resultados son de la siguiente manera:

		Tiempo de incubación (min)					
Concentración de MUG		15	30	45	60	90	120
1 mg/ ml		0.9100	0.9003	0.8955	0.8926	0.8955	0.9003
500 µg/ ml		0.8867	0.8852	0.8935	0.8959	0.9011	0.9094
200 µg/ ml		0.8513	0.8562	0.8588	0.8602	0.8659	0.8726
100 µg/ml		0.8643	0.8694	0.8721	0.8754	0.8807	0.8870

Los datos de fluorescencia se normalizan.

Mientras la tecnología descrita se explicó en relación a modalidades específicas, debe entenderse que varias modificaciones de estos se harán aparentes para los expertos en la materia tras la lectura de la especificación. Por lo tanto, debe entenderse que la invención descrita en la presente se destina a cubrir tales modificaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. indicador de esterilización, que comprende
 5 un portador, el portador que tiene una primera superficie y una segunda superficie;
 un soporte, el soporte que tiene una primera sección y una segunda sección, el portador que recubre la primera
 sección del soporte, la segunda superficie del portador que se adhiere a la primera sección del soporte; y
 un indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética, que comprende:
- 10 al menos un organismo de prueba y al menos un gen reportero apropiado para producir una enzima
 indicadora, el gen reportero que comprende lacZ, bgaB, xylE, cat, gfp, o
 una mezcla de dos o más de estos, el gen reportero que es captado por el organismo de prueba; y
 al menos un gen represor que inhibe la expresión del gen reportero hasta que el gen reportero se expone al
 menos a un inductor, el gen represor que comprende xylR, lacI, tetR o una mezcla de dos de estos
 15 que se soporta por el portador, la segunda sección del soporte que es de dimensión suficiente para permitir
 manipular el indicador de esterilización sin poner en contacto el indicador biológico.
2. indicador de esterilización, que comprende:
- 20 un primer compartimiento que contiene un indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética, que
 comprende:
- 25 al menos un organismo de prueba y al menos un gen reportero apropiado para producir una enzima
 indicadora, el gen reportero que comprende lacZ, bgaB, xylE, cat, gfp, o una mezcla de dos o más de
 estos, el gen reportero que es captado por el organismo de prueba; y
 al menos un gen represor que inhibe la expresión del gen reportero hasta que el gen reportero se expone
 al menos a un inductor, el gen represor que comprende xylR, lacI, tetR o una mezcla de dos de estos, el
 primer compartimiento que se adapta para permitir al indicador biológico ponerse en contacto con un
 medio de esterilización durante la esterilización; y
 30 un segundo compartimiento que contiene al menos un inductor y al menos un sustrato de enzima, el
 segundo compartimiento que se adapta para mantener separados el inductor y el sustrato de enzima del
 indicador biológico durante la esterilización, y el segundo compartimiento que se adapta para permitir al
 inductor y al sustrato de enzima ponerse en contacto con el indicador biológico luego de que el indicador
 biológico se expuso al medio de esterilización.
- 35 3. indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el gen reportero y el gen
 represor son captados por el organismo de prueba mediante el uso de al menos un plásmido y/o al menos un
 virus.
- 40 4. indicador de esterilización de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el organismo
 de prueba comprende una o más bacterias, organismos gram negativos, organismos gram positivos,
 organismos vegetativos; o en donde el organismo de prueba comprende esporas bacterianas; o en donde el
 organismo de prueba comprende hongos, micobacterias, protozoos, bacterias vegetativas, o una mezcla de
 dos o más de estos; o en donde el organismo de prueba comprende células vegetativas.
- 45 5. Indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 4, en donde el organismo de prueba
 comprende *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus*
anthracis, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium*
botulinum, *Bacillus subtilis globigii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli*, o una mezcla de dos o
 50 más de estos, o *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella dermatitis*,
Mycobacterium chelonae, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmantis*, *Mycobacterium terrae*,
Mycobacterium bovis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Aeromonas*
hydrophila, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*,
Escherichia coli, *Klebsiella (pneumoniae)*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*
aeruginosa, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus radiodurans*, *Deinococcus radiodurans*,
 55 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, o una mezcla de dos o
 más de estos, o *enterococci* resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium cheloni*,
 resistente a metilicina o una mezcla de dos o más de estos.
- 60 6. Indicador de esterilización de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se produce
 una enzima indicadora por el gen reportero, la enzima indicadora comprende beta-D-galactosidasa,
 cloroamfenicol acetiltransferasa, catacol-2,3-dioxigenasa, o una mezcla de dos o más de estos.
7. Indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 3 en donde el gen reportero comprende lacZ.

8. Indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 3 en donde el gen reportero comprende *xylR*.
9. indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 3 en donde el plásmido comprende un gen reportero y un gen represor, preferentemente un gen *lacZ* y un gen *xylR*, una o más secuencias de ADN que sirven como un origen de replicación, unos o más marcadores genéticos, uno o más sitios de clonación múltiples, uno o más genes que proporcionan un marcador seleccionable para inducir al organismo de prueba a retener el plásmido; y un gen de resistencia a antibiótico, preferentemente un gen del antibiótico cloranfenicol, ampicilina o espectinomicina y/o un gen con capacidad nutricional exógena, preferentemente un gen nutricional de xilosa, lactosa o aminoácido.
10. indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 3, en donde el plásmido comprende al menos un origen de replicación, al menos un gen de marcador seleccionable, al menos un promotor inducible y al menos un gen reportero.
11. indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 3, en donde el tamaño del plásmido está en el intervalo de 2000 a 20000 pares de base.
12. indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 3, en donde de 1 a 3000 copias del mismo plásmido son captadas por una célula única del organismo de prueba.
13. Indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 9, en donde el origen de replicación gram negativo comprende *Escherichia coli*, y el origen de replicación gram positivo comprende *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, o una mezcla de dos o más de estos.
14. Indicador de esterilización de conformidad con la reivindicación 3, en donde el virus comprende al menos un gen transportador que comprende el ácido nucleico rodeado por una cápsida.
15. Indicador de esterilización de la reivindicación 14, en donde el virus comprende al menos un bacteriófago, preferentemente un bacteriófago lambda o M13.
16. Indicador de esterilización de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el inductor comprende xilosa, alolactosa, isopropilo tiogalactósido, metalotionina, o una mezcla de dos o más de estos.
17. Un proceso de esterilización, que comprende exponer un artículo a esterilizar y el indicador de esterilización de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a un medio de esterilización.
18. El proceso de la reivindicación 17 en donde el medio de esterilización comprende vapor de agua, calor seco, radiación, plasma, uno o más esterilizantes gaseosos y/o uno o más esterilizantes líquidos; o en donde el medio de esterilización comprende radiación de haz de electrones, radiación electromagnética, radiación gamma, radiación beta, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno gaseoso, peróxido de hidrógeno líquido, formalina, glutaraldehído, y/o ácido peracético.
19. Un proceso para determinar la eficacia de la esterilización, que comprende exponer al menos un artículo a esterilizar y un indicador de esterilización de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a un medio de esterilización; y poner en contacto el indicador de esterilización con al menos un inductor y al menos un sustrato de enzima para determinar la eficacia de la esterilización.
20. El proceso de la reivindicación 19 en donde el inductor comprende xilosa, alolactosa, isopropilo tiogalactósido, metalotionina, o una mezcla de dos o más de estos.
21. El proceso de la reivindicación 19 en donde el sustrato de enzima comprende: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida (X-gal), 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-β-galactopiranosida (Mag-gal), 5-Bromo-3-indolilo- (β -D-galactopiranosida (Bluo-gal), 6-Bromo-2-naftilo-β-D-galactopiranosida, 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida (Rose-gal), 3-indoxil-β-D galactopiranosida (Y-gal), 5-yodo-3-indoxil- β -D-galactopiranosida, N-metilindoxil-β-D-galactopiranosida, 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosida (ONPG), 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosida (PNPG), fenil-β-D-galactopiranosida (P-gal), 2-cloro-4-nitrofenil-β-D-lactósido, 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 4-trifluorometilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, fluoresceína di(β-D-galactopiranosida) (FDG), fluoresceína mono-β-D-galactopiranosida, fluoresceína di-(β-D-acetil galactosamina), 4-metilumbeliferil-β-D-lactopiranosida, 2-naftil-β-D-galactopiranosida, 8-hidroxiquinoleína-β-D-galactopiranosida, Resorufina β-D-galactopiranosida, 3-Carboxiumbeliferil- β -D-galactopiranosida, 4-Clorometil-6,8-difluorumbeliferil- β -D-galactopiranosida, 6,8-Difluor-4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 6,8-Difluoro-4-heptadecilumbeliferil-β-D-galactopiranosida, 5-(Pentafluorobenzoilamino)-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, C₂-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, C₈-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, C₁₂-fluoresceína-β-D-galactopiranosida, 5-Clorometilfluoresceína-β-D-

galactopiranosida, C₁₂-resorufina-β-D-galactopiranosida, 7-hidroxilo-9H-(1,3-diclor-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO), 4-metilumbeliferil elaidato, 4-metilumbeliferil oleato, p-nitrofenil acetato, p-naftil acetato, indoxil acetato, N-metilindoxil acetato, N-metilindoxil miristato, 5-Bromoindoxil acetato, 5-Br-4-Cl-3-indolil acetato, Diacetilfluoresceína; o una mezcla de dos o más de estos.

5

22. Uso de un indicador biológico desarrollado mediante ingeniería genética para detectar la eficacia en un proceso de esterilización, en donde el indicador desarrollado mediante ingeniería genética comprende al menos un organismo de prueba y al menos un gen reportero apropiado para producir una enzima indicadora, el gen reportero que comprende lacZ, bgaB, xylE, cat, gfp, o una mezcla de dos o más de estos, el gen reportero que es captado por el organismo de prueba; y

10

al menos un gen represor que inhibe la expresión del gen reportero hasta que el gen reportero se expone al menos a un inductor, el gen represor que comprende xylR, lacl, tetR, o una mezcla de dos o más de estos.

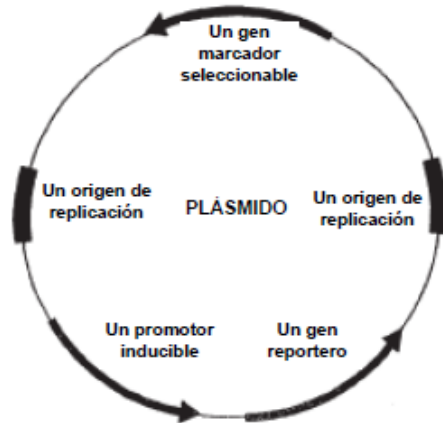


FIG. 1

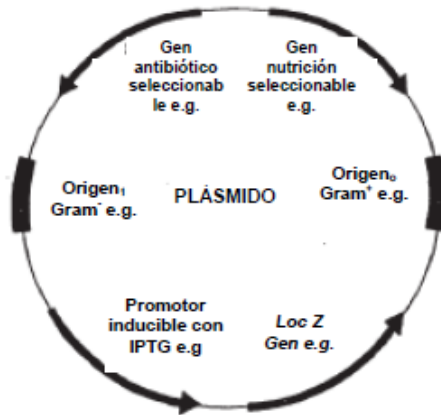


FIG. 2

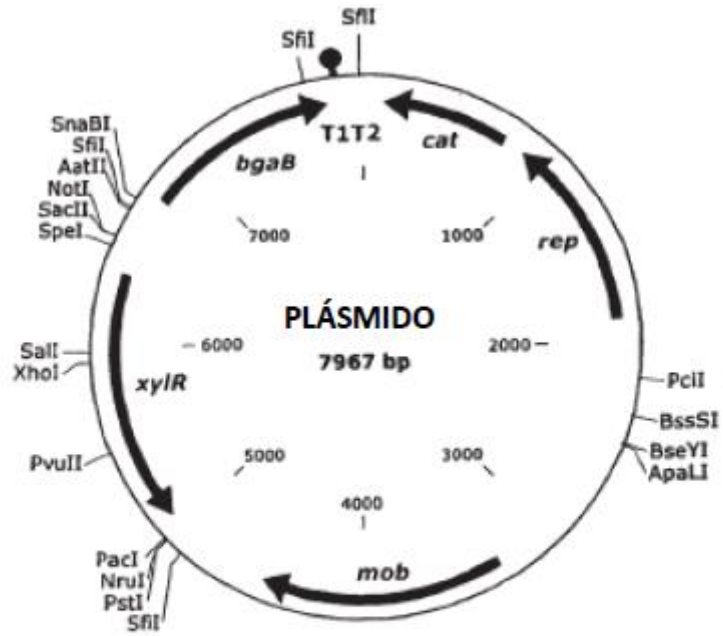


FIG. 3

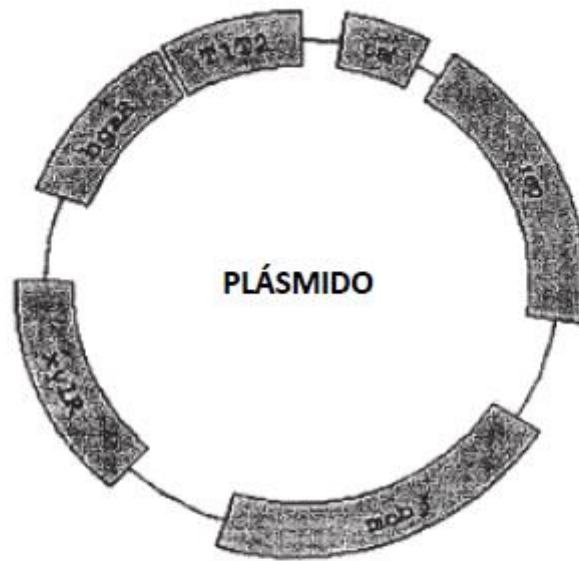


FIG. 4

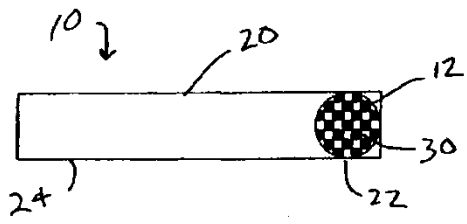


FIG. 5

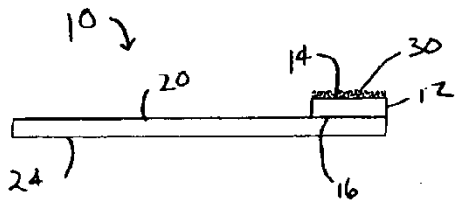


FIG. 6

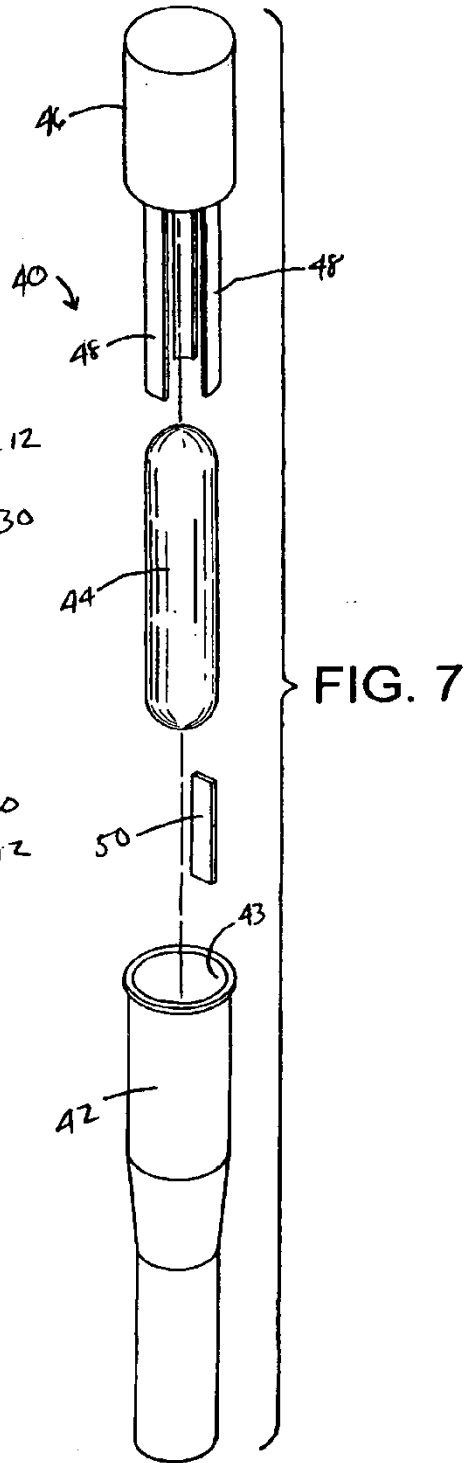


FIG. 7