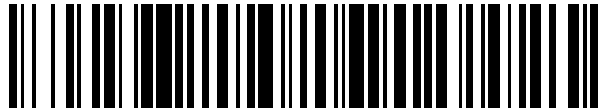


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 181**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2011 PCT/US2011/058212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011 E 11782315 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2635697**

54 Título: **Método para detectar una actividad biológica**

30 Prioridad:

**01.11.2010 US 408977 P**  
**01.11.2010 US 408966 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.10.2018**

73 Titular/es:

**3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY**  
**(100.0%)**  
**3M Center, P.O.Box 33427**  
**St. Paul, MN 55133-3427, US**

72 Inventor/es:

**CHANDRAPATI, SAILAJA,;**  
**WEBB, HEATHER M.,;**  
**PEDERSON, JEFFREY C.,;**  
**HALVERSON, KURT J., y**  
**ENGEL, BRIAN J.,**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 687 181 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

Método para detectar una actividad biológica

5 **Antecedentes**

Los métodos para la detección de una célula (p. ej., un microorganismo patógeno o una célula cancerosa) en una muestra, implican con frecuencia la detección de una actividad biológica (p. ej., una actividad enzimática o una ruta bioquímica) que se sabe están asociadas a la célula particular. Con frecuencia, la actividad biológica se detecta utilizando un sistema indicador que se modifica a través de la actividad biológica, dando lugar a un derivado biológico.

Algunos métodos emplean dos sistemas indicadores para detectar un tipo particular de célula. Por ejemplo, los métodos para detectar *E. coli* pueden incluir un primer sistema indicador que incluye lactosa junto con un indicador de pH. La fermentación de la lactosa a ácidos orgánicos indica la presencia de un miembro de las bacterias coliformes (que incluyen *E. coli* y otros microorganismos entéricos). Los métodos incluyen además un segundo sistema indicador, tal como el ácido 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónico, que se usa para detectar la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, una enzima que está presente en la mayoría de las cepas de *E. coli*. Por tanto, en un método que emplea ambos sistemas indicadores, la acumulación de productos finales ácidos de la lactosa, junto con la acumulación de un compuesto fluorescente (4-metilumbeliferona) pueden indicar la presencia de *E. coli* en una muestra.

La detección de una actividad biológica particular en una muestra puede ser indicativa de células viables en la muestra. Las esporas bacterianas, por ejemplo, incluyen actividades biológicas (p. ej., actividades enzimáticas tales como  $\alpha$ -glucopiranosidasa o  $\beta$ -glucopiranosidasa) que pueden usarse en métodos (incluidos, p. ej., métodos rápidos) para detectar la presencia de esporas viables en una muestra. La destrucción de una de estas u otras actividades biológicas se puede utilizar para verificar y/o validar la eficacia de un proceso de esterilización. En la patente US-5.073.488 se describe un medio nutriente para el crecimiento y detección de esporas bacterianas en un indicador de esterilización biológico.

**Sumario de la invención**

La presente descripción se refiere, en general, a métodos para detectar una actividad biológica en una muestra. Los métodos de la invención proporcionan medios para detectar actividad biológica con al menos dos (p. ej., "primer" y "segundo") reactivos indicadores. Los métodos proporcionan una detección rápida y sensible de un derivado biológico del segundo reactivo indicador en una mezcla de reacción que, inicialmente, incluye una concentración suficientemente elevada de un primer reactivo indicador para interferir con la detección del derivado biológico.

En un primer aspecto, se proporciona un método para detectar una actividad enzimática, que comprende:  
 proporcionar  
 una muestra que puede comprender una fuente de una o más de actividades enzimáticas predeterminadas;  
 un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia, en donde el primer reactivo indicador comprende un tinte indicador de pH o un tinte redox, en donde el primer reactivo indicador puede ser convertido por una primera actividad enzimática predeterminada a un primer derivado biológico;  
 un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por la primera actividad enzimática predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, en donde el segundo reactivo indicador comprende un sustrato enzimático fluorogénico;  
 un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador de una mezcla acuosa; en donde el sustrato comprende nailon cargado; y  
 un instrumento que detecta el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico, en donde el instrumento comprende una trayectoria óptica;  
 formar una primera mezcla acuosa que comprende la muestra, el primer reactivo indicador, y el segundo reactivo indicador;  
 poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar una segunda mezcla acuosa en la que una concentración del primer reactivo indicador es inferior a la concentración del primer reactivo indicador en la primera mezcla acuosa;  
 observar el sustrato para detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico; y  
 detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico, en donde detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico comprende usar el instrumento para detectar el segundo derivado biológico, en donde la trayectoria óptica no atraviesa ninguna parte del sustrato; en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de las longitudes de onda presentes en el segundo espectro de emisión;  
 en donde detectar la presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico comprende detectar la presencia o ausencia de fluorescencia en la segunda mezcla acuosa.

Además, se proporciona un método para detectar una actividad enzimática, que comprende:  
 proporcionar un indicador de esterilización biológico que comprende;  
 un bastidor que comprende una primera y una segunda cámaras;

un recipiente que contiene un primer líquido acuoso, el recipiente está dispuesto en una primera cámara, en donde al menos una parte del recipiente es frangible, comprendiendo el líquido un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia y un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por una segunda actividad enzimática

5 predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, en donde el primer reactivo indicador puede ser convertido por una primera actividad enzimática predeterminada a un primer derivado biológico, en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de longitudes de onda del segundo espectro de emisión;

10 en donde el primer reactivo indicador comprende un tinte indicador de pH o un tinte redox; en donde el segundo reactivo indicador comprende un sustrato enzimático fluorogénico una fuente de la segunda actividad enzimática predeterminada dispuesta en una segunda cámara; y un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador del primer líquido acuoso, el sustrato dispuesto en el bastidor; en donde el sustrato comprende nailon cargado;

15 proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico, en donde el instrumento comprende una trayectoria óptica; formar una mezcla acuosa que comprende el primer líquido acuoso y la fuente de la segunda actividad enzimática predeterminada; poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar un segundo líquido acuoso en el que la concentración del primer reactivo indicador es inferior a la concentración del primer reactivo

20 indicador en el primer líquido acuoso; observar el sustrato para detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico; y detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico en la segunda mezcla acuosa, en donde detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico comprende usar el instrumento para detectar el segundo derivado biológico, en donde la trayectoria óptica no atraviesa ninguna parte del sustrato.

25 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método de detección de una actividad biológica. El método puede comprender proporcionar una muestra que puede comprender una fuente de una o más actividades biológicas predeterminadas, un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia, un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es

30 convertido por una segunda actividad biológica predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, y un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador de una mezcla acuosa. El primer reactivo indicador puede convertirse mediante una primera actividad biológica predeterminada a un primer derivado biológico. El primer espectro de absorbancia puede incluir la absorbancia detectable en al menos una parte de longitudes de onda presentes en el segundo espectro de emisión. El método puede comprender además formar

35 una primera mezcla acuosa que comprende la muestra, el primer reactivo indicador, y el segundo reactivo indicador. El método puede comprender además poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar una segunda mezcla acuosa en la que la concentración del primer reactivo indicador es inferior a la concentración del primer reactivo indicador en la primera mezcla acuosa. El método puede comprender además detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico.

40 En algunas realizaciones, detectar la presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico puede comprender detectar la presencia o ausencia de fluorescencia en la segunda mezcla acuosa. En algunas realizaciones, el método puede comprender además observar el sustrato para detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico. En cualquiera de las realizaciones anteriores, una concentración del primer reactivo indicador en la

45 primera mezcla acuosa puede ser suficiente para evitar la detección de una cantidad de otro modo detectable del segundo derivado biológico. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el método puede comprender además proporcionar un nutriente para facilitar el crecimiento de una célula biológica, en donde la formación de la primera mezcla acuosa comprende formar una mezcla que incluye el nutriente. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el método puede comprender además exponer la actividad biológica a un esterilizante. El esterilizante se puede

50 seleccionar del grupo que consiste en vapor, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno, formaldehído y ozono.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el primer reactivo indicador puede comprender un cromóforo, en donde detectar un derivado biológico del primer reactivo comprende detectar un color. En cualquiera de las

55 modalidades anteriores, el primer reactivo indicador puede comprender un indicador cromogénico. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el primer reactivo indicador puede comprender un indicador de pH o un sustrato enzimático. En algunas realizaciones, el primer reactivo indicador puede comprender púrpura de bromocresol.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el segundo reactivo indicador puede comprender un compuesto fluorogénico. El compuesto fluorogénico puede comprender un sustrato enzimático fluorogénico.

60 En cualquiera de las realizaciones anteriores, la detección de la presencia o ausencia del segundo derivado biológico puede comprender además la medición de una cantidad del segundo derivado biológico. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la detección de la presencia o ausencia del primer derivado biológico puede comprender además la medición de una cantidad del primer derivado biológico.

65

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el método puede comprender además proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador o el derivado biológico del segundo reactivo indicador y usar el instrumento para detectar el primer reactivo indicador o el derivado biológico del segundo reactivo indicador.

5 En algunas realizaciones, el método puede comprender además proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico y usar el instrumento para detectar el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico. En algunas realizaciones, el método puede comprender además proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador y el segundo derivado biológico y usar el instrumento para detectar el primer reactivo indicador y el segundo derivado biológico.

10 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para detectar una actividad biológica. El método puede comprender proporcionar un bastidor, un recipiente, una fuente de una segunda actividad biológica predeterminada y un sustrato. El bastidor puede comprender una primera y una segunda cámaras. El recipiente puede contener un primer líquido acuoso. El recipiente puede estar dispuesto en la primera cámara. Al menos una parte del recipiente puede ser frangible. El primer líquido acuoso puede comprender un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia y un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por una actividad biológica predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de las longitudes de onda presentes en el segundo espectro de emisión. El primer reactivo indicador puede convertirse mediante una primera actividad biológica predeterminada a un primer derivado biológico. La fuente de la actividad biológica predeterminada puede estar dispuesta en la segunda cámara. El sustrato puede estar dispuesto en el bastidor y puede recibir y concentrar el primer reactivo indicador del primer líquido acuoso. El método puede comprender además poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar una segunda mezcla acuosa en la que la concentración del primer reactivo indicador es inferior a la concentración del primer reactivo indicador en la primera mezcla acuosa. El método puede comprender además detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico. En algunas realizaciones, detectar la presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico puede comprender detectar la presencia o ausencia de fluorescencia en la segunda mezcla acuosa. En algunas realizaciones, llevar la primera mezcla acuosa a una comunicación de fluidos con el sustrato para formar un segundo líquido acuoso puede comprender fracturar al menos una parte del recipiente frangible. En algunas realizaciones, el indicador de esterilización biológico puede comprender además un interruptor dispuesto en el bastidor, en donde fracturar el recipiente frangible comprende presionar entre sí el recipiente y el interruptor. En algunas realizaciones, el bastidor del indicador de esterilización biológico puede incluir una primera parte y una segunda parte. La segunda parte puede adaptarse para acoplarse a la primera parte, siendo la segunda parte móvil con respecto a la primera parte, cuando se acopla a la primera parte, entre una primera posición y una segunda posición. El método puede comprender además mover la segunda parte del bastidor desde la primera posición a la segunda posición.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un sistema para detectar una actividad biológica predeterminada. El sistema puede comprender un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia, un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por una actividad biológica predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, un recipiente configurado para contener un medio líquido, un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador de una mezcla acuosa, y un instrumento configurado para recibir el recipiente y para detectar el primer reactivo indicador o un derivado biológico del segundo reactivo indicador. El primer reactivo indicador puede convertirse mediante una primera actividad biológica predeterminada a un primer derivado biológico. El primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de las longitudes de onda presentes en el segundo espectro de emisión. En algunas realizaciones, el instrumento se puede configurar para detectar el primer derivado biológico. En algunas realizaciones, el sistema puede comprender además un procesador. En cualquiera de las realizaciones anteriores del sistema, el instrumento se puede configurar además para regular una temperatura de un medio líquido. En cualquiera de las realizaciones anteriores del sistema, el instrumento se puede configurar para detectar tanto el primer reactivo indicador como el segundo derivado biológico.

Las palabras “preferido” y “preferible” se refieren a las realizaciones de la invención que pueden dar como resultado determinados beneficios, en determinadas circunstancias. No obstante, otras realizaciones también pueden ser preferidas en las mismas u otras circunstancias. Además, la enumeración de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles y no se prevé que excluyan otras realizaciones del alcance de la invención.

Los términos “comprende” y variaciones de los mismos no tienen un significado limitativo cuando estos términos aparecen en la descripción y en las reivindicaciones.

60 Como se utiliza en la presente memoria, “un”, “uno”, “el”, “al menos uno”, y “uno o más” se usan indistintamente. Por tanto, por ejemplo, un sustrato puede interpretarse como que significa “uno o más” sustratos.

El término “y/o” significa uno o todos los elementos relacionados o una combinación de dos cualquiera o más de los elementos relacionados.

65

La expresión “actividad biológica” como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier proceso o grupos de procesos catalíticos específicos asociados a una célula biológica. Los ejemplos no limitativos de actividades biológicas incluyen actividades enzimáticas catabólicas (p. ej., rutas de fermentación de carbohidratos), actividades enzimáticas anabólicas (p. ej., rutas de síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos o proteínas), reacciones acopladas (p. ej., una ruta metabólica), reacciones redox mediadas por biomoléculas (p. ej., sistemas de transporte de electrones), y reacciones bioluminiscentes. La actividad biológica “predeterminada” significa que el método está orientado a la detección de un proceso biológico específico (p. ej., una reacción enzimática) o grupo de procesos biológicos (p. ej., una ruta bioquímica). Un experto en la técnica apreciará que determinadas actividades biológicas predeterminadas se pueden asociar con un tipo de célula en particular (p. ej., una célula cancerosa o un microorganismo) o un proceso patológico.

“Derivado biológico”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un producto una actividad biológica. Esto incluye, por ejemplo, los productos de reacciones enzimáticas y sistemas biológicos de transporte de electrones.

Como se utiliza en la presente memoria, “biomoléculas” puede ser cualquier compuesto químico que aparece de forma natural en organismos vivos, así como derivados o fragmentos de estos compuestos naturales. Las biomoléculas constan principalmente de carbono e hidrógeno, junto con nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. A veces se incorporan otros elementos, pero son mucho menos comunes. Las biomoléculas incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas, polipéptidos, carbohidratos, polisacáridos, lípidos, ácidos grasos, esteroides, prostaglandinas, prostaciclina, vitaminas, cofactores, citoquinas, y ácidos nucleicos (incluidos ADN, ARN, nucleósidos, nucleótidos, purinas y pirimidinas), productos metabólicos que son producidos por organismos vivos que incluyen, por ejemplo, antibióticos y toxinas. Las biomoléculas pueden incluir además derivados de biomoléculas de origen natural, tales como una proteína o un anticuerpo que ha sido modificado con sustancias químicas (p. ej., oxidada con peryodato de sodio). Las biomoléculas pueden incluir también biomoléculas naturales reticuladas, o un producto reticulado de una biomolécula natural con una sustancia química. Por tanto, “biomolécula” incluye, aunque de forma no limitativa, moléculas modificadas y no modificadas (p. ej., proteínas glicosiladas, anticuerpos oxidados) y fragmentos de las mismas (p. ej., fragmentos de proteínas). Los fragmentos de biomoléculas pueden incluir aquellos que resultan de la hidrólisis debida a tratamientos químicos, enzimáticos o de irradiación, por ejemplo.

También en la presente memoria, la enumeración de intervalos numéricos mediante puntos extremos incluye todos los números subsumidos dentro de ese intervalo (p. ej. 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

El resumen anterior de la presente invención no pretende describir cada realización descrita ni cada implementación de la presente invención. La descripción que se ofrece a continuación muestra de un modo más concreto las realizaciones ilustrativas. En algunos puntos de la solicitud se proporcionan directrices mediante listas de ejemplos, cuyos ejemplos se pueden utilizar en varias combinaciones. En cada caso, la lista enumerada sirve únicamente de grupo representativo y no debe interpretarse como una lista exclusiva.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1A es una vista superior en perspectiva de un sustrato y un recipiente que contiene un medio líquido que comprende un reactivo indicador.

La Fig. 1B es una vista superior en perspectiva del recipiente de la Fig. 1A, que se encuentra inmediatamente después de la inmersión del sustrato de la Fig. 1A en el medio líquido.

La Fig. 1C es una vista superior en perspectiva del recipiente de la Fig. 2A transcurrido un período de tiempo.

La Fig. 2 es un espectro de absorbancia UV-visible de una solución acuosa de púrpura de bromocresol y un espectro de emisión de fluorescencia de una solución de 4-metilumbeliferona.

La fig. 3 es un diagrama de bloques de una realización de un método para detectar una actividad biológica según la presente descripción.

La Fig. 4 es una vista en perspectiva frontal de un indicador de esterilización biológico según una realización de la presente descripción, incluyendo el indicador de esterilización biológico un bastidor que incluye una primera parte y una segunda parte.

La Fig. 5 es una vista en perspectiva posterior del indicador de esterilización biológico de la Fig. 4.

La Fig. 6 es una vista despiezada anterior del indicador de esterilización biológico de las Figs. 4-5.

La Fig. 7 es una vista en corte transversal lateral del indicador de esterilización biológico de las Figs. 4-6, tomada a lo largo de la línea 4-4 de la Fig. 4, mostrado el indicador de esterilización biológico en un primer estado, y mostrada la segunda parte del bastidor del indicador de esterilización biológico en una primera posición.

La Fig. 8 es una vista en corte transversal superior del indicador de esterilización biológico de las Figs. 4-6, tomada a lo largo de la línea 5-5 de la Fig. 6.

La Fig. 9 es una vista en corte transversal lateral del indicador de esterilización biológico de las Figs. 4-8, mostrando el indicador de biológico en un segundo estado, y mostrada la segunda parte del bastidor del indicador de esterilización biológico en una segunda posición.

La Fig. 10 es una vista en corte transversal superior del indicador de esterilización biológico de las Figs. 4-9, con partes retiradas para mayor claridad.

### Descripción detallada

La presente descripción se refiere a un método rápido para detectar una actividad biológica. El método incluye el uso de dos o más reactivos indicadores. El método incluye, como se define en las reivindicaciones, proporcionar una mezcla líquida, que comprende un primer y un segundo reactivo indicador, en donde el primer reactivo indicador está presente en la mezcla a una concentración suficiente para interferir con la detección (p. ej., detección óptica) de una cantidad de otro modo detectable de un derivado biológico del segundo reactivo indicador. El método de la invención proporciona una detección rápida y sensible de una actividad biológica al secuestrar al menos una parte de la cantidad interferente del primer reactivo indicador del volumen de la mezcla líquida para facilitar la detección del derivado biológico del segundo reactivo indicador. El método proporciona además un medio para observar más fácilmente el primer reactivo indicador o un derivado biológico del mismo. El método de la invención se puede usar en un sistema para la detección automatizada de una actividad biológica.

El sistema y/o método de la invención de la presente descripción se puede usar para detectar una actividad biológica (p. ej., una actividad asociada con una enzima, una célula o un microorganismo). En algunas realizaciones, el sistema y/o método de la invención puede usarse, por ejemplo, para detectar una actividad biológica asociada con un tipo particular de microorganismo (p. ej., una célula vegetativa o una espora) que ha sobrevivido a la exposición a un proceso (p. ej., un proceso de desinfección, un proceso de preparación de alimentos o bebidas, un proceso de esterilización).

El método de la invención se refiere a la detección de una actividad biológica en una muestra. La muestra puede ser cualquier muestra que incluya una actividad biológica como se define en la presente memoria. Ejemplos no limitativos de muestras adecuadas incluyen suspensiones o cultivos de células (p. ej., células de mamífero, células de insecto, células de levadura, hongos filamentosos, células bacterianas), muestras ambientales (p. ej., torundas superficiales) alimentos, (p. ej., materias primas, muestras dentro de procesos y muestras de productos terminados), bebidas, muestras clínicas, (p. ej., sangre, orina, esputo, tejido, mucosa, heces, exudado de heridas, pus) y agua (p. ej., agua superficial, agua potable, agua de procesos).

Los microorganismos (p. ej., bacterias, hongos, virus) son una fuente de actividad biológica y pueden analizarse en una muestra de prueba que puede derivarse de cualquier fuente, tal como un fluido fisiológico, p. ej., sangre, saliva, fluido de lente ocular, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, pus, sudor, exudado, orina, moco, leche o similar. Además, la muestra de prueba puede proceder de un lugar corporal, p. ej., una herida, piel, orificios nasales, cuero cabelludo, uñas, etc.

Muestras de interés particular incluyen muestras que contienen mucus, tales como las muestras nasales (de p. ej., orificios nasales, cavidad nasofaríngea, cavidades nasales, vestíbulo nasal anterior, etc.), así como muestras del oído externo, oído medio, boca, recto, vagina u otro tejido similar. Los ejemplos de tejidos musosales específicos incluyen las membranas mucosas bucal, gingival, nasal, ocular, traqueal, bronquial, gastrointestinal, rectal, uretral, ureteral, vaginal, cervical y uterina.

Además de los fluidos fisiológicos, otras muestras de prueba pueden incluir otros líquidos, así como sólidos disueltos en un medio líquido. Las muestras de interés pueden incluir corrientes de proceso, agua, suelo, plantas u otra vegetación, aire, superficies (p. ej., superficies contaminadas), y similares. Las muestras también pueden incluir células cultivadas. Las muestras también pueden incluir muestras sobre o en un dispositivo que comprende células, esporas o enzimas (p. ej., un dispositivo indicador biológico).

Las muestras sólidas pueden desintegrarse (p. ej., mediante mezclado, sonicación, homogeneización) y pueden suspenderse en un líquido (p. ej., agua, tampón, caldo). En algunas realizaciones, en el método se puede usar un dispositivo de recolección de muestras (p. ej., una torunda, una esponja) que contenga material de muestra. Alternativamente, el material de muestra puede eluirse (p. ej., enjuagarse, raspase, expresarse) del dispositivo de recolección de muestras antes de usar el material de muestra en el método. En algunas realizaciones, las muestras líquidas o sólidas pueden diluirse en un líquido (p. ej., agua, tampón, caldo).

Las muestras adecuadas incluyen también muestras líquidas y/o sólidas que se han expuesto a un esterilizante. Ejemplos no limitativos de estas muestras incluyen suspensiones de esporas, tiras de esporas y cupones de diversos materiales sobre los que se ha aplicado una suspensión de esporas o de células microbianas vegetativas.

Las muestras adecuadas incluyen también medios de suspensión celular (p. ej., caldo de cultivo, medios de cultivo celular semisólidos y medios de cultivo de tejidos, filtrado) que contienen células o que contenían anteriormente células. Muestras adecuadas también incluyen los lisados celulares. Los lisados celulares pueden producirse por medios químicos (p. ej., detergentes, enzimas), medios mecánicos (vibración sónica, homogeneización, French Press) u otros medios de lisis celular conocidos en la técnica.

Las Figs. 1A a 1C ilustran el proceso de recibir y concentrar a partir de un medio líquido un reactivo indicador (o un derivado biológico del mismo) sobre o en un sustrato según la presente descripción. La Fig. 1A muestra una vista en perspectiva superior de una realización de un sustrato 30 y un recipiente 10 que contiene una mezcla líquida 20 que comprende un reactivo indicador de color. La Fig. 1B muestra una vista en perspectiva superior del recipiente 10 de la Fig. 1A, inmediatamente después de sumergir el sustrato 30 en la mezcla líquida 20. La Fig. 1C muestra una vista superior en perspectiva del recipiente 10 de la Fig.1B, tras un período de tiempo suficiente para permitir que el sustrato 30 reciba y concentre el reactivo indicador de color de la mezcla líquida 20. En la Fig.1C puede observarse que el color de la mezcla líquida se ha vuelto menos intenso, mientras que el sustrato 30 ha recibido y retenido el reactivo indicador de color y, de ese modo, ha cambiado de su estado inicial incoloro hasta un estado coloreado.

En algunas realizaciones, el sustrato puede recibir y concentrar pasivamente el reactivo indicador o el derivado biológico del mismo (p. ej., por difusión simple del reactivo o derivado a través del medio líquido). De forma alternativa o adicional (no mostrada), el sustrato puede recibir y concentrar activamente el reactivo indicador y/o el derivado biológico (p. ej., el sustrato puede moverse con respecto al líquido mediante mezclado o rodado y/o el medio líquido puede moverse con respecto al sustrato mediante un flujo de fluido que es generalmente lateral, tangencial u ortogonal respecto a una superficie principal del sustrato).

#### Reactivos indicadores

La técnica anterior incluye varios sustratos enzimáticos crómicos o fluorogénicos de distinto origen que son conocidos, comercializados, que se han utilizado en métodos para detectar actividades biológicas predeterminadas, y son adecuados para usar como primer o segundo reactivo indicador según la presente descripción. Entre estos, hay una variedad de derivados de 4-metilumbeliferilo fluorogénicos (hidrolizables para dar 4-metilumbeliferona); derivados de 7-amido-4-metil-cumarina, p. ej., como se describen en la patente GB-1.547.747 y en la patente EP-0.000.063; derivados de diacetilfluoresceína; y fluorescamina.

El primer reactivo indicador según la presente descripción comprende un reactivo que tiene un primer espectro de absorción y por ello absorbe luz en las longitudes de onda ultravioleta y/o visible del espectro electromagnético.

En algunas realizaciones, el primer reactivo indicador puede ser un tinte indicador (p. ej., un tinte indicador del pH, un tinte redox). El tinte indicador específico utilizado para detectar cualquier actividad biológica dada se seleccionará según criterios que son conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, compatibilidad (p. ej., preferiblemente no inhibitoria) con la actividad biológica a detectar, solubilidad, sistema de detección (p. ej., visual y/o automatizado).

En cualquiera de las realizaciones del método, el tinte indicador puede ser un indicador de pH adecuado para detectar la actividad biológica. El tinte indicador se puede seleccionar según criterios conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, intervalo de pH, compatibilidad con la actividad biológica, y solubilidad. En algunas realizaciones, se puede usar una forma salina del indicador de pH, por ejemplo, para aumentar la solubilidad del indicador de pH en una mezcla acuosa. Los ejemplos no limitativos de tintes indicadores de pH adecuados incluyen, por ejemplo, azul de timol, tropeolina OO, amarillo de metilo, naranja de metilo, azul de bromofenol, verde de bromocresol, rojo de metilo, azul de bromotimol, rojo de fenol, rojo neutro, fenoltaleína, timoltaleína, amarillo de alizarina, tropeolina O, nitramina, ácido trinitrobenzoico, azul de timol, azul de bromofenol, azul de tetrabromofenol, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, rojo de metilo, azul de bromotimol, rojo de fenol, rojo Congo, y rojo de cresol.

En cualquiera de las realizaciones del método, el tinte indicador puede ser un indicador de oxidorreducción (también denominado indicador redox) adecuado para detectar la actividad biológica. Los tintes indicadores de oxidorreducción pueden ser dependientes del pH o independientes del pH. Los ejemplos no limitativos de tintes indicadores de oxidorreducción incluyen 2,2'-Bipiridina (complejo de Ru), Nitrofenantrolina (complejo de Fe), Ácido N-fenilantranílico 1,10-Fenantrolina (complejo de Fe), N-Etoxicrisoidina, 2,2'-Bipiridina (complejo de Fe), 5,6-Dimetilfenantrolina (complejo de Fe), o-Dianisidina, Difenilamina sulfonato sódico, Difenilbencidina, Difenilamina, Viologen, 2,6-Dibromofenol-indofenol sódico, 2,6-Diclorofenol-indofenol sódico, o-Cresol indofenol sódico, Tionina (sin. violeta de Lauth), Azul de metileno, Ácido indigotetrasulfónico, Ácido indigotrisulfónico, Ácido indigodisulfónico, Ácido indigomonosulfónico, Fenosagranina, Safiranina T, y Rojo neutro.

En algunas realizaciones, el primer reactivo indicador puede ser un indicador de pH de sulfonftaleína (p. ej. púrpura de bromocresol), como se muestra en el Ejemplo 4. El indicador de pH de sulfonftaleína (p. ej., púrpura de bromocresol) puede estar presente en la mezcla acuosa a una concentración de aproximadamente 0,03 g por litro. El indicador de pH de sulfonftaleína puede estar alojado y concentrado mediante un sustrato (p. ej. un sustrato de nailon cargado tal como, por ejemplo, membrana de nailon cargada MAGNAPROBE de 0,45 micrómetros, número de pieza NP0HY00010,

comercializado por GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN). El sustrato se puede configurar como una tira generalmente plana (p. ej. una tira que tiene aproximadamente 3 mm por aproximadamente 10 mm).

El segundo reactivo indicador, según la presente descripción, se puede convertir a un segundo derivado biológico. El segundo derivado biológico comprende un reactivo que tiene un segundo espectro de absorción. Por otro lado, el segundo derivado biológico tiene un segundo espectro de emisión característico (p. ej., un espectro de emisión fluorescente). En algunas realizaciones, el segundo derivado biológico tiene un segundo espectro de absorción característico que incluye longitudes de onda en la parte del ultravioleta del espectro de energía electromagnética. El segundo espectro de emisión del segundo derivado biológico puede incluir longitudes de onda en la parte visible del espectro de energía electromagnética.

Los compuestos adecuados para usar como segundo reactivo indicador incluyen compuestos fluorogénicos (p. ej., sustratos enzimáticos fluorogénicos). Los sustratos enzimáticos fluorogénicos incluyen derivados de 4-metilumbeliferilo, derivados de 7-amido-4-metilcumarina, y derivados de diacetilfluoresceína.

Los derivados de 4-metilumbeliferilo adecuados incluyen, por ejemplo: 4-metilumbeliferilo-2-acetamido-4, 6-O-bencilideno-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido; acetato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferilo-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidina; 4-metilumbeliferilo-N-acetil- $\alpha$ -D-glucosaminidina; 4-metilumbeliferilo-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidina; ácido 2'-(4-metilumbeliferilo)- $\alpha$ -D-N-acetil neuramínico;  $\alpha$ -L-arabinofuranósido de 4-metilumbeliferilo;  $\alpha$ -L-arabinósido de 4-metilumbeliferilo; butirato de 4-metilumbeliferilo;  $\beta$ -D-celobiosido de 4-metilumbeliferilo; metilumbeliferilo  $\beta$ -D-N, quitobiosido de N'diacetilo; elaidato de 4-metilumbeliferilo;  $\beta$ -D-fucósido de 4-metilumbeliferilo;  $\alpha$ -L-fucósido de 4-metilumbeliferilo;  $\beta$ -L-fucósido de 4-metilumbeliferilo;  $\alpha$ -D-galactósido de 4-metilumbeliferilo;  $\beta$ -D-galactósido de 4-metilumbeliferilo; a-D-glucósido de 4-metilumbeliferilo;  $\beta$ -D-glucósido de 4-metilumbeliferilo;  $\beta$ -D-glucurónido de 4-metilumbeliferilo; p-guanidinobenzoato de 4-metilumbeliferilo; heptanoato de 4-metilumbeliferilo;  $\alpha$ -D-mannopiranosido de 4-metilumbeliferilo;  $\beta$ -D-mannopiranosido de 4-metilumbeliferilo; oleato de 4-metilumbeliferilo; palmitato de 4-metilumbeliferilo; fosfato de 4-metilumbeliferilo; propionato de 4-metilumbeliferilo; estearato de 4-metilumbeliferilo; sulfato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferilo  $\beta$ -D-N, N', N"-triacetilquitotriosa; 2,3,5-tri-o-benzil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido de 4-metilumbeliferilo; cloruro de cinamato de 4-metilumbeliferilo-p-trimetilamonio; y  $\beta$ -D-xilósido de 4-metilumbeliferilo.

Los derivados de 7-amido-4-metilcumarina adecuados incluyen, por ejemplo: L-alanina-7-amido-4-metilcumarina; L-prolina 7-amido-4-metilcumarina; L-tirosina-7-amido-4-metilcumarina; L-leucina-7-amido-4-metilcumarina; L-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina; y 7-glutarilfenilalanina-7-amido-4-metilcumarina.

Los derivados peptídicos adecuados de 7-amido-4-metilcumarina incluyen, por ejemplo: N-t-BOC-Ile-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; Pro-Phe-Arg 7-amido-4-metilcumarina; N-t-BOC-Val-Pro-Arg 7-amido-4-metilcumarina; y N-glutaril-Gly-Arg 7-amido-4-metilcumarina.

Los derivados de diacetilfluoresceína adecuados incluyen, por ejemplo, diacetato de fluoresceína, fluoresceína di- $(\beta$ -D-galactopiranosido), y dilaurato de fluoresceína.

Cuando la actividad biológica a detectar es alfa-D-glucosidasa, quimiotripsina, o esterasa de ácido graso, p. ej., de *Geobacillus stearothermophilus*, los sustratos enzimáticos fluorogénicos preferidos son 4-metilumbeliferil-alfa-D-glucósido, 7-glutarilfenilalanina-7-amido-4-metilcumarina, o heptanoato de 4-metilumbeliferilo, respectivamente. Cuando la actividad biológica a detectar es alfa-L-arabinofuranosidasa, p. ej., derivada de *Bacillus subtilis*, un sustrato enzimático fluorogénico preferido es 4-metilumbeliferil-alfa-L-arabinofuranósido. Cuando la actividad biológica a detectar es beta-D-glucosidasa, p. ej., derivada de *Bacillus subtilis*, un sustrato enzimático fluorogénico preferido es 4-metilumbeliferil-beta-D-glucósido.

Para llevar a cabo un método de la presente invención para detectar una actividad biológica que comprende una enzima, el operario debería tener conocimientos sobre la actividad enzimática a detectar y los sustratos enzimáticos que reaccionarán con la enzima, de manera que produzcan un producto que se pueda detectar bien por su fluorescencia, color, etc. (véase M. Roth, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 7, D. Glock, Ed., Interscience Publishers, Nueva York, NY, 1969). El sustrato enzimático adecuado a utilizar dependerá de la actividad biológica a detectar.

Los métodos de la presente descripción incluyen un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorción y un segundo reactivo indicador que se convierte, mediante una actividad biológica, en un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, en donde el primer espectro de absorción solapa al menos parcialmente con el segundo espectro de emisión. De este modo, cuando tanto el primer reactivo indicador como el segundo derivado biológico están presentes en una mezcla líquida, el primer reactivo indicador puede absorber al menos una parte de la luz emitida por el segundo reactivo indicador, disminuyendo de esta manera la capacidad de detectar el segundo derivado biológico.

Un dibujo puede ilustrar la relación entre un primer reactivo indicador y un segundo derivado biológico según la presente descripción. La Fig. 2 muestra el espectro de absorbancia del púrpura de bromocresol (a continuación en la memoria, denominado "BCP"), un primer reactivo indicador ilustrativo, y el espectro de emisión de fluorescencia de la 4-metilumbeliferona (a continuación en la memoria, denominada "4MU"), un posible derivado



biológico del 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucósido, un segundo reactivo indicador ilustrativo. Los espectros se obtuvieron como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

La línea "A", que muestra el espectro de absorbancia de BCP, indica un máximo de absorbancia en el intervalo visible aproximadamente a 600 nm, con relativamente menos absorbancia por BCP a las longitudes de onda de 425-550 nm. Los datos muestran un pico de absorbancia en las longitudes de onda visibles en aproximadamente 600 nm y un pico de absorbancia en las longitudes de onda del ultravioleta a <330 nm. La línea "B", que muestra el espectro de emisión de fluorescencia de 4MU, indica un máximo de emisión aproximadamente a 450 nm, con relativamente menos emisión en los intervalos de 375-425 nm y de 475-525 nm. Puede observarse en la Fig. 2 que el espectro de absorbancia de BCP solapa prácticamente con la totalidad del pico de emisión de fluorescencia (centrado aproximadamente a 450 nm) de 4MU.

Una persona normalmente experta en la técnica relevante reconocerá que la cantidad de absorbancia de cualquier longitud de onda particular de la luz emitida por una solución que contiene un primer reactivo indicador se verá afectada por la concentración del primer reactivo indicador en la solución y el coeficiente de extinción molar del reactivo indicador a la longitud de onda seleccionada. La persona experta también reconocerá que la cantidad de emisión de luz de cualquier longitud de onda particular desde una solución que contiene un derivado biológico de un segundo reactivo indicador se verá alterada por la concentración del segundo derivado biológico en la solución y el rendimiento cuántico de fluorescencia del derivado biológico. Por lo tanto, la concentración del primer reactivo indicador en la mezcla líquida se puede seleccionar junto con un sustrato adecuado para permitir i) al sustrato eliminar suficiente primer sustrato indicador de la mezcla líquida para permitir una detección más sensible del segundo derivado biológico y ii) el primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) se puede detectar fácilmente sobre el material sustrato.

La combinación de púrpura de bromocresol y 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucósido representa un ejemplo de primer y segundo reactivos indicadores adecuados, respectivamente, según la presente descripción. Esta combinación se puede usar para detectar una primera actividad biológica tal como la fermentación de un carbohidrato hasta los productos ácidos finales, y una segunda actividad biológica como la actividad de la enzima  $\alpha$ -D-glucosidasa, por ejemplo. Estas actividades pueden indicar la presencia o ausencia de una espora viable después de la exposición de un indicador de esterilización biológico a un proceso de esterilización, por ejemplo. El púrpura de bromocresol se puede usar a una concentración de aproximadamente 0,03 g/l, por ejemplo, en la mezcla acuosa. El 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucósido se puede usar, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 g/l (p. ej., aproximadamente 0,05 g/l, aproximadamente 0,06 g/l, aproximadamente 0,07 g/l, aproximadamente 0,08 g/l, aproximadamente 0,09 g/l, aproximadamente 0,1 g/l, aproximadamente 0,15 g/l, aproximadamente 0,2 g/l, aproximadamente 0,25 g/l, aproximadamente 0,3 g/l, aproximadamente 0,35 g/l, aproximadamente 0,4 g/l, aproximadamente 0,45 g/l, aproximadamente 0,5 g/l), en la mezcla acuosa.

De este modo, según la presente descripción, el primer reactivo indicador puede interferir con la detección de una cantidad por otra parte detectable del derivado biológico del segundo reactivo indicador. Un experto en la técnica puede demostrar la interferencia espectral entre cualquier primer y segundo reactivos indicadores propuestos realizando el siguiente experimento simple.

En primer lugar, el operador prepara una solución acuosa relativamente diluida, pero detectable mediante fluorescencia, del derivado biológico esperado del segundo reactivo indicador propuesto. Por ejemplo, si el segundo reactivo indicador es un compuesto de 4-metilumbeliferilo, el derivado biológico esperado es 4MU. La solución puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 0,2 microgramos por mililitro de 4MU. A continuación, el operador añade una cantidad eficaz del primer reactivo indicador propuesto. Por ejemplo, si BCP es el primer reactivo indicador propuesto, se puede añadir a una concentración (p. ej., 0,04 miligramos por mililitro) que se utilice en el medio de crecimiento microbiológico para la detección de microorganismos fermentativos. Al comparar la fluorescencia de las soluciones de 4MU con y sin BCP, se puede determinar si el primer reactivo indicador (en este ejemplo, BCP) puede interferir con la detección del derivado biológico del segundo reactivo indicador (en este caso, 4MU). A continuación, el operador puede estudiar si la adición de cantidades reducidas de BCP a la solución de 4MU mejora la detección de concentraciones relativamente bajas de 4MU. Este tipo de experimento se puede realizar fácilmente con cualquier combinación del primer y segundo reactivos indicadores. Un ejemplo de este procedimiento se muestra en el Ejemplo 3.

### Sustrato

Los sustratos adecuados, según la presente descripción, están configurados para recibir y concentrar el reactivo indicador. La capacidad del sustrato para concentrar el reactivo indicador o el derivado biológico del mismo puede verse afectada por una o más de diversas fuerzas conocidas en la técnica y descritas en la presente memoria. Por tanto, un experto en la técnica puede seleccionar un sustrato que es conocido por tener carga positiva para concentrar un reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) que se sabe tiene carga negativa, por ejemplo. Por el contrario, un experto en la técnica puede seleccionar un sustrato que es conocido por tener carga negativa para concentrar un reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) que se sabe tiene carga positiva. Un experto en la técnica puede seleccionar un sustrato que es conocido por tener propiedades hidrófobas para concentrar un reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) que se sabe comprende partes hidrófobas que quedarían retenidas por un sustrato hidrófobo. Además, un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente un material de sustrato

adecuado poniendo en contacto, durante un periodo de tiempo, un material de sustrato candidato con un líquido que comprende el reactivo indicador o el derivado biológico del mismo y analizando el sustrato para determinar si se acumula o no una cantidad detectable del reactivo indicador o de derivado del mismo en el sustrato.

5 Resultará evidente para un experto en la técnica que el material de sustrato se puede seleccionar según las propiedades conocidas del reactivo indicador o del derivado biológico del mismo. Por ejemplo, un sustrato cargado positivamente se puede seleccionar para su uso en el método cuando el derivado biológico del reactivo indicador es una molécula cargada negativamente. Además, un sustrato cargado negativamente se puede seleccionar para su uso en el método cuando el derivado biológico del reactivo indicador es una molécula cargada positivamente.

10 De forma alternativa, la idoneidad de cualquier material de sustrato dado para usar con un primer reactivo indicador en el método de la invención puede determinarse fácilmente utilizando el siguiente enfoque experimental. En un recipiente adecuado (p. ej., un tubo de ensayo), se puede añadir una fuente de actividad biológica predeterminada (p. ej., células microbianas capaces de fermentar un carbohidrato a productos finales ácidos) con un primer reactivo indicador (p. ej., un indicador de pH) a un medio líquido seleccionado para facilitar la actividad biológica (p. ej., un caldo de cultivo que comprende el carbohidrato fermentable). El medio líquido se puede poner en contacto con un sustrato candidato en condiciones que faciliten la actividad biológica predeterminada y el sustrato puede eliminarse del medio, opcionalmente enjuagarse y/o secarse para eliminar el exceso de líquido y observarse de modo visual o instrumental (p. ej. con un espectrofotómetro o un fluorímetro) para determinar si el material de sustrato concentró el primer reactivo indicador y/o un derivado biológico del mismo durante el contacto con el medio líquido. En el ejemplo ilustrativo, una combinación de sustrato/indicador adecuada mostraría evidencia de que el primer reactivo indicador o el derivado biológico del mismo se concentra sobre o en el material del sustrato (fuera del medio líquido) durante el período de contacto. Se puede llevar a cabo una reacción de control sin material de sustrato para confirmar la presencia de la actividad biológica en la mezcla.

25 El sustrato puede fabricarse en una forma de hoja generalmente plana (p. ej., una tira de membrana, como se muestra en la Fig. 1A). El tamaño y/o el área superficial efectiva del sustrato también pueden afectar a la capacidad del sustrato de concentrar el reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). Los materiales preferidos para el sustrato incluyen materiales porosos (p. ej., materiales tejidos, materiales no tejidos, membranas porosas, membranas microporosas, papel de filtro). En algunas realizaciones, los materiales de sustrato particularmente preferidos incluyen membranas cargadas, tales como por ejemplo, membranas de nailon cargadas (p. ej., membrana de nailon cargada MAGNAPROBE de 0,45 micrómetros, número de parte NP0HY00010, disponible de GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN). Los sustratos utilizados en la presente descripción pueden fabricarse a partir de diversos materiales. La patente US-6.562.297 describe membranas para la inmovilización de indicadores de pH. Ejemplos no limitativos de materiales de sustrato adecuados incluyen, por ejemplo, materiales naturales (p. ej., celulosa), materiales sintéticos (p. ej., nailon), y combinaciones y/o derivados de los mismos.

Método para detectar una actividad biológica:

40 La Fig. 3 muestra un diagrama de bloques de una realización de un método para detectar una de una pluralidad de actividades biológicas según la presente descripción.

El método incluye la etapa 40 de proporcionar una muestra que puede incluir una de una pluralidad de actividades biológicas predeterminadas, primeros y segundos reactivos indicadores, y un sustrato que recibe y concentra de un medio acuoso el primer reactivo indicador y, opcionalmente, un derivado biológico del mismo.

45 En algunas realizaciones, el método puede incluir el paso opcional 45 de exponer la actividad biológica a un desinfectante, a un antibiótico o a un esterilizante. Esta etapa opcional puede incluirse para determinar la eficacia de un proceso de esterilización o para detectar una actividad biológica predeterminada (o microorganismo) posterior a un proceso de cultivo de enriquecimiento selectivo. Exponer la actividad biológica a un esterilizante puede comprender exponer la actividad biológica a un proceso de esterilización. Los procesos de esterilización incluyen exponer la muestra, por ejemplo, a esterilizantes tales como vapor, calor seco, óxido de etileno, formaldehído, peróxidos, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ozono, o mezclas de los mismos (p. ej., una mezcla de ozono y peróxido de hidrógeno).

50 El método incluye la etapa 50 de formar una primera mezcla acuosa que comprende la muestra y el primer y segundo reactivos indicadores. La primera mezcla acuosa se forma en un medio acuoso. La fuente de actividad biológica en el método puede ser cualquier muestra que comprenda, o que se sospecha comprenda, una o más actividades biológicas, como se describe en la presente memoria. "Medio acuoso", como se usa en la presente memoria, se refiere a un líquido acuoso en el que el primer y segundo reactivos indicadores se disuelven, o pueden disolverse o suspenderse. Preferiblemente, el medio no interfiere sustancialmente con la detección de una actividad biológica predeterminada que se desea detectar. En algunas realizaciones, el medio acuoso puede comprender un componente (es decir, un agente tamponante) para ajustar el pH del medio. El medio acuoso puede comprender además un reactivo (p. ej., un detergente, un cofactor, un agente de lisis celular) conocido en la técnica para facilitar la detección de una o más actividades biológicas.

65 En algunas realizaciones, la muestra comprende agua y, por tanto, la propia muestra puede considerarse un medio acuoso. En cualquier realización, la muestra se puede mezclar opcionalmente con un segundo líquido (p.

ej., un medio acuoso, un diluyente, un tampón, una solución para neutralizar un desinfectante) antes de mezclar la muestra con los reactivos indicadores primero y segundo.

En algunas realizaciones, el medio acuoso puede combinarse con el primer y/o segundo reactivo indicador antes de mezclar el medio con la muestra. En algunas realizaciones, el primer y el segundo reactivo indicador y la muestra se pueden añadir secuencialmente al medio acuoso para formar la primera mezcla acuosa. En algunas realizaciones, el primer y el segundo reactivo indicador pueden combinarse con un medio acuoso y la muestra simultáneamente para formar la primera mezcla acuosa. En cualquiera de las realizaciones, cualquiera de los reactivos indicadores primero y segundo pueden estar inicialmente en forma de un reactivo seco, un líquido, un gel o una película antes de que el reactivo se combine con un medio acuoso y/o con una muestra para formar la primera mezcla acuosa.

El primer reactivo indicador puede ser cualquier reactivo adecuado descrito en la presente memoria. Dado que el primer reactivo indicador se selecciona para detectar una actividad biológica predeterminada, la naturaleza química del primer reactivo indicador y los derivados biológicos de los mismos se conocen, por lo que los materiales de sustrato adecuados pueden identificarse como se describe en la presente memoria. El segundo reactivo indicador puede ser cualquier reactivo adecuado descrito en la presente memoria.

En cualquier realización del método, la formación de la primera mezcla acuosa puede comprender formar una primera mezcla acuosa que incluye un nutriente. El nutriente puede proporcionarse, por ejemplo, para facilitar el crecimiento de una célula o microorganismo diana y puede proporcionarse como una mezcla de nutrientes. Los nutrientes y el medio nutriente para facilitar el crecimiento de microorganismos son conocidos en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en el "Handbook of Microbiological Media" de Ronald Atlas, publicado por CRC Press, Boca Raton, FL. Matner y col. (La patente US-5.073.488) describe un medio nutriente para el crecimiento y detección de esporas bacterianas en un indicador de esterilización biológico. Los nutrientes y los medios nutrientes para facilitar el crecimiento de células eucarióticas (p. ej., células de mamífero, células de insecto) también son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azúcares (p. ej., glucosa), aminoácidos, vitaminas (p. ej., tiamina, niacina), colina, inositol, suero, y mezclas de los mismos.

Los métodos de la presente descripción incluyen además la etapa 60 de poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar una segunda mezcla acuosa. De forma típica, el proceso de poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato se produce en un recipiente (p. ej., un tubo, un frasco, un matraz, un micropocillo). En cualquiera de las realizaciones, el recipiente puede estar sellado para minimizar la evaporación y/o para evitar la contaminación por una actividad biológica exógena, por ejemplo. En cualquiera de las realizaciones, poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato puede incluir el contacto de la mezcla líquida y el sustrato en condiciones que facilitan la actividad biológica predeterminada. Un experto en la técnica reconocerá las condiciones que facilitan la actividad biológica predeterminada. Las condiciones pueden incluir, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica o la capacidad tamponadora de la mezcla; la concentración del primer y/o segundo reactivo indicador; presencia de cofactores en la mezcla o recipiente; y/o temperatura de la mezcla.

En cualquiera de las realizaciones del método, la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato puede incluir controlar la temperatura de la mezcla. En algunas realizaciones, la temperatura puede ser controlada a una temperatura superior a la temperatura ambiente (p. ej., una temperatura que facilita una reacción, como una reacción catalítica o reacción de unión, que implique a la actividad biológica) usando un bloque de calentamiento, un incubador, o algún otro medio de calentamiento adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la temperatura de la mezcla se puede controlar a una temperatura inferior a la temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la mezcla puede someterse a un cambio transitorio de temperatura (p. ej., un choque térmico por calor o un choque térmico por frío) para facilitar la detección de la actividad biológica predeterminada.

Poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato según la presente descripción comprende concentrar el primer reactivo indicador y; opcionalmente, un derivado biológico del mismo; sobre y/o en el sustrato. Como resultado de ello, la concentración del primer reactivo indicador en la segunda mezcla acuosa es inferior a la concentración del primer reactivo indicador en la primera mezcla acuosa. Como se ha considerado anteriormente, el sustrato se selecciona para recibir y concentrar el primer reactivo indicador. El sustrato recibe el primer reactivo indicador mediante el contacto con el medio acuoso. El sustrato retiene el primer reactivo indicador o el derivado biológico del mismo por diversos medios. Sin pretender imponer ninguna teoría, la acumulación del primer reactivo indicador o derivado biológico del mismo sobre y/o en el material de sustrato puede producirse a través de una o más variedades de fuerzas de atracción química incluidas, aunque no de forma limitativa, interacción iónica, interacción hidrófoba, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno, por ejemplo.

El proceso de recibir y concentrar el primer reactivo indicador o el derivado biológico del mismo por el sustrato se produce durante el período de comunicación de fluidos entre el medio acuoso y el sustrato. Durante este período de comunicación de fluidos, el primer reactivo indicador o el derivado biológico del mismo se acumula en el sustrato a una velocidad que puede depender de varios factores que incluyen, por ejemplo, la concentración del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo), el área superficial del material de sustrato que contiene medio líquido, la porosidad del sustrato, una densidad de carga asociada con el material de sustrato, y/u otras sustancias en el medio líquido que puede interactuar con el sustrato y/o el primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) de un modo que interfiere con la recepción o concentración del primer reactivo indicador o derivado biológico del mismo

5 por el sustrato. Recibir y concentrar al menos una parte del primer reactivo indicador o derivado biológico del mismo sobre el sustrato puede producirse en un período de contacto relativamente corto (p. ej., en varios minutos) y puede continuar durante un período de contacto más largo (p. ej., hasta 1 hora, hasta 2 horas, hasta 4 horas, hasta 18 horas, hasta 24 horas, hasta 7 días, hasta dos semanas). En algunas realizaciones, el primer reactivo indicador puede concentrarse en o dentro del sustrato dentro de un período de tiempo relativamente corto (p. ej., minutos horas), mientras que el primer derivado biológico, si está presente, puede no estar concentrado de forma detectable sobre, o en, el sustrato durante un período de tiempo relativamente más largo (p. ej., horas, días).

10 Durante cualquiera de los períodos de comunicación de fluidos entre la mezcla acuosa y el sustrato descrito anteriormente, el sustrato puede recibir y concentrar toda o una parte del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 5 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 10 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 20 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 30 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 40 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 50 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 75 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 80 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra al menos 90 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra más de 90 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo). En algunas realizaciones, el sustrato recibe y concentra más de 95 por ciento del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo).

25 La determinación de que el sustrato recibe y concentra el primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) se puede llevar a cabo fácilmente poniendo en contacto fluido un medio líquido que comprende el primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) con el sustrato durante un periodo de tiempo, y analizar el sustrato para determinar la presencia del reactivo (o derivado biológico del mismo), como se muestra en el Ejemplo 1. Preferiblemente, cualquier exceso de medio líquido se elimina del sustrato (p. ej., mediante transferencia o mediante centrifugación) antes de analizar el sustrato de manera que la cantidad de reactivo o derivado biológico asociado con el sustrato indica la cantidad retenida por el sustrato. Los métodos de análisis adecuados resultarán evidentes para el experto en la técnica. Por ejemplo, un sustrato que recibe y concentra un primer reactivo indicador de color (p. ej., un indicador de pH) se puede analizar por espectroscopía de reflectancia usando, por ejemplo, un espectrodensitómetro portátil X-Rite modelo 530P.

30 Así, cuando un medio líquido que comprende una muestra y el primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) se lleva a una comunicación de fluidos con un sustrato adecuado, la concentración del primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) en el medio líquido a granel disminuye a medida que el primer reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) es recibido y concentrado por el sustrato. Esta característica de la invención facilita la detección de concentraciones relativamente pequeñas del derivado biológico del segundo reactivo indicador debido a que al menos una parte de la interferencia (es decir, la absorción de la fluorescencia) por el primer reactivo indicador se elimina cuando el primer reactivo indicador se concentra sobre el sustrato de la mezcla acuosa. En algunas realizaciones, el primer reactivo indicador y/o un derivado biológico del mismo, cuando se encuentra en una forma que se difunde libremente (es decir, en el medio líquido a granel) puede inhibir la actividad biológica. En estas realizaciones, una ventaja adicional de la invención es que el sustrato puede secuestrar eficazmente al menos una parte del primer reactivo indicador, reduciendo así la inhibición de la actividad biológica por el primer reactivo indicador.

35 Con referencia nuevamente a la Fig. 3, el método puede incluir además la etapa opcional 65 de facilitar el crecimiento de las células. Facilitar el crecimiento de las células se utiliza ampliamente para incluir proporcionar condiciones (p. ej., nutrientes, germinantes, tampones, oxidorreducción potencial, gases) para facilitar, por ejemplo, la germinación de esporas, el metabolismo energético, la biosíntesis y/o la división celular. Facilitar el crecimiento de las células puede dar lugar a la amplificación de una o más actividades biológicas predeterminadas de la muestra original y, por tanto, puede mejorar la sensibilidad para detectar las actividades biológicas predeterminadas.

50 Los métodos de la presente descripción incluyen además la etapa 70 de detectar un derivado biológico del segundo reactivo indicador (en la presente memoria, denominado “segundo derivado biológico”). En algunas realizaciones, el segundo derivado biológico se puede detectar en un medio acuoso. Detectar la presencia o ausencia del segundo biológico indica la presencia o ausencia, respectivamente, de la correspondiente actividad biológica predeterminada en la muestra.

55 El segundo derivado biológico se puede detectar mediante varios medios. En algunas realizaciones, el segundo derivado biológico se puede detectar ópticamente. En algunas realizaciones, detectar el segundo derivado biológico puede comprender detectar visualmente el derivado biológico. En algunas realizaciones, detectar el segundo derivado biológico puede comprender detectar el derivado biológico usando un instrumento. Por ejemplo, si el segundo derivado biológico puede detectarse utilizando un instrumento óptico, tal como un fluorímetro.

60

65

En cualquiera de las realizaciones, detectar la presencia o ausencia del segundo derivado biológico de la misma puede también comprender la medición de la cantidad del segundo derivado biológico. La medición de la cantidad puede hacerse mediante cualquier medio conocido en la técnica incluida, por ejemplo, la medición de la cantidad utilizando un instrumento (p. ej., un fluorímetro). En algunas realizaciones, la medición de la cantidad del segundo derivado biológico puede comprender comparar la fluorescencia en la mezcla acuosa con un patrón fluorescente.

En cualquiera de las realizaciones, los métodos de la presente descripción incluyen, opcionalmente, la etapa 75 de detectar el primer reactivo indicador o un primer derivado biológico del mismo. Los medios para detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico dependen de la naturaleza del primer reactivo indicador o del primer derivado biológico, como apreciará un experto en la técnica. Por ejemplo, si el primer reactivo indicador es un crómico (coloreado) y/o el primer derivado biológico es un compuesto crómico, el primer reactivo indicador y/o el primer derivado biológico se pueden detectar ópticamente (ya sea visualmente o mediante un instrumento (p. ej., un espectrofotómetro)). En algunas realizaciones, detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico puede también comprender detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico en una parte de la mezcla acuosa que no está asociada con el sustrato (p. ej., en el líquido a granel). Por ejemplo, si el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico se detecta utilizando un instrumento óptico tal como un espectrofotómetro, la trayectoria óptica no atraviesa ninguna parte del sustrato.

En cualquiera de las realizaciones, detectar la presencia o ausencia del primer reactivo indicador o del primer derivado biológico puede también comprender medir la cantidad del primer reactivo indicador o del primer derivado biológico. La medición de la cantidad puede hacerse mediante cualquier medio conocido en la técnica incluida, por ejemplo, la medición de la cantidad utilizando un instrumento (p. ej., un espectrofotómetro, un espectrodensitómetro).

Las patentes US-5.252.484 y US-5.418.167 describen una realización de un indicador biológico de lectura rápida, en donde el indicador biológico comprende un vehículo enzimático (tira de esporas) y una ampolla contiene una solución con 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucósido ("MUG", un sustrato enzimático fluorogénico) y púrpura de bromocresol ("BCP", un indicador de pH). Se sabe que la MUG se hidroliza mediante la actividad enzimática a 4-metilumbeliferona (4MU), un derivado fluorescente de MUG. Como se muestra en los ejemplos 1 y 2 de la patente US-5.252.484, puede detectarse visualmente la 4MU producida por hidrólisis enzimática del MUG por fluorescencia en minutos después de que el vehículo enzimático se pone en comunicación de fluidos con la solución que contiene MUG y BCP.

Los investigadores de la presente memoria han descubierto que la concentración de BCP utilizada en una solución similar a la descrita en el Ejemplo 1 de la US-5.252.484 es suficiente para interferir con la detección de bajas concentraciones de 4MU en una solución acuosa. La eliminación de al menos una parte del BCP de la solución según la presente descripción permitirá la detección de cantidades inferiores de 4MU en un indicador biológico, permitiendo con ello la detección temprana de actividad biológica (p. ej., esporas, enzimas) que se han expuesto a un proceso de esterilización y que por tanto no se han desactivado y/o matado.

#### Sistema para detectar una actividad biológica

La presente descripción incluye un sistema para detectar una actividad biológica predeterminada en una muestra. El sistema puede usarse según el método de la invención para detectar la una o más actividades biológicas en una muestra. El sistema incluye un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador que puede ser convertido por una primera actividad biológica predeterminada a un primer derivado biológico. El primer reactivo indicador tiene un primer espectro de absorción y, opcionalmente, un primer espectro de emisión. El sistema incluye además un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que puede ser convertido por una segunda actividad biológica predeterminada a un segundo derivado biológico. El segundo derivado biológico tiene un primer espectro de absorción y un segundo espectro de emisión.

El sistema incluye además un instrumento configurado para recibir una muestra líquida que puede comprender el primer reactivo indicador, el segundo reactivo indicador, el primer derivado biológico, el segundo derivado biológico o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. El instrumento se puede configurar para extraer la muestra líquida de un recipiente externo mediante un medio "sipper", como se conoce en la técnica de instrumentos analíticos. Alternativamente, el instrumento puede configurarse para recibir un recipiente (p. ej., un tubo, una placa de micropocillos o similar) que contiene la muestra líquida.

El instrumento está configurado para detectar el segundo derivado biológico. Opcionalmente, el instrumento se puede configurar además para detectar el primer reactivo indicador, el segundo reactivo indicador, el primer derivado biológico o cualquier combinación de dos o más de los anteriores.

El reactivo indicador del sistema puede ser cualquier reactivo indicador adecuado, como se describe en la presente memoria, para detectar la actividad biológica predeterminada particular. El primer y el segundo reactivo indicador pueden proporcionarse, por ejemplo, en un kit, que opcionalmente puede incluir un medio acuoso (p. ej., un tampón, un medio de suspensión, un diluyente), en el que mezclar el reactivo indicador y la muestra. Como se ha tratado en la presente memoria, la muestra puede comprender agua y constituir por tanto el medio acuoso. De forma opcional, el kit puede incluir además un recipiente (p. ej., un tubo, una cubeta, o similar), en el que formar una mezcla acuosa que comprende la

muestra y el primer y segundo reactivo indicador. En algunas realizaciones, el sistema puede utilizarse con un indicador de esterilización biológico tal como, por ejemplo, los indicadores biológicos de las solicitudes de patente US-61/408.977 y US-61/408.988, presentadas el 1 de noviembre de 2010 y los indicadores biológicos descritos en la patente US-5.252.484.

5 Los instrumentos para detectar los espectros de absorción de compuestos crómicos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, una variedad de espectrofotómetros y espectrodensitómetros comerciales. También se conocen en la técnica instrumentos para detectar los espectros de emisión de compuestos fluorescentes, e incluyen, por ejemplo, una variedad de fluorímetros comerciales. Dichos instrumentos pueden adaptarse fácilmente para detectar un reactivo indicador (o un derivado biológico del mismo) asociado con una muestra líquida y/o a un sustrato situado en una ubicación predeterminada.

10 En algunas realizaciones, el sustrato puede retirarse de la mezcla acuosa y situarse (p. ej., sobre una superficie o en una cubeta) de modo que el reactivo indicador (o derivado biológico del mismo) pueda ser detectado por el instrumento. La patente US-6.025.189 describe un instrumento configurado para detectar, en una ubicación predeterminada en un indicador biológico autocontenido, una señal fluorescente asociada a una actividad biológica. El experto en la técnica podrá modificar un instrumento de este tipo para detectar una señal crómica.

15 En algunas realizaciones, el sistema puede también comprender un procesador. En algunas realizaciones, el instrumento puede comprender un microprocesador capaz de controlar el instrumento y de recoger y/o transmitir datos asociados con la detección del reactivo indicador o con el derivado biológico del mismo. En algunas realizaciones del sistema, el procesador puede comprender un procesador externo. El ordenador externo puede comprender un ordenador personal (PC), un ordenador de sobremesa, un ordenador portátil, un ordenador de mano, una estación de trabajo o similar. Por ejemplo, los programas informáticos pueden cargarse en un ordenador externo para controlar el instrumento y/o para facilitar la recogida, transferencia y/o análisis de datos procedentes del instrumento.

20 En algunas realizaciones, el sistema puede también comprender medios para regular la temperatura de un líquido. El medio para el control de la temperatura puede incluir cualquier medio conocido en la técnica, tal como por ejemplo, termopares e intercambiadores de calor. De forma ventajosa, estas realizaciones proporcionan un sistema que puede facilitar la actividad biológica controlando la temperatura y puede detectar el producto de la actividad biológica.

### 30 Indicadores de esterilización biológica:

Las Figs. 4-10 ilustran el indicador 100 de esterilización biológico según una realización de la presente descripción. Otras realizaciones adecuadas de indicadores de esterilización biológicos se describen en la publicación PCT en trámite con n.º WO 2011/011189, titulada “Biological Sterilization Indicator and Method of Using Same”; la solicitud de patente US-61/409.042, titulada “Biological Sterilization Indicator System and Method”; la solicitud de patente US-61/408.997, titulada “Biological Sterilization Indicator System and Method”; y la solicitud de patente US-61/408.977, titulada “Biological Sterilization Indicator and Method of Using Same”.

40 El indicador 100 de esterilización biológico puede incluir un bastidor 102, que puede incluir una primera parte 104 y una segunda parte 106 (p. ej., un tapón) adaptado para acoplarse entre sí para proporcionar un indicador de esterilización biológico autocontenido. En algunas realizaciones, la primera parte 104 y la segunda parte 106 pueden estar formadas por los mismos materiales y, en algunas realizaciones, la primera parte 104 y la segunda parte 106 pueden estar formadas por diferentes materiales. El bastidor 102 puede definir un depósito 103 del indicador 100 de esterilización biológico en el que se pueden introducir otros componentes y al que se puede dirigir un esterilizante durante un proceso de esterilización.

45 El bastidor 102 puede estar definido por al menos una pared impermeable a líquidos, tal como una pared 108 de la primera parte 104 y/o una pared 110 de la segunda parte 106. Se deberá entender que también se puede emplear un bastidor 102 unitario de una pieza, o que las primera y segunda partes 104 y 106 pueden tener otras formas, dimensiones, o estructuras relativas. Los materiales adecuados para el bastidor 102 (p. ej., las paredes 108 y 110) pueden incluir, aunque no de forma limitativa, vidrio, metal (p. ej., una lámina), polímero (p. ej., policarbonato (PC), polipropileno (PP), polifenileno (PPE), polietileno, poliestireno (PS), poliéster (p. ej., tereftalato de polietileno (PET)), poli(metacrilato de metilo) (PMMA o acrílico), acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), polímero de cicloolefina (COP), copolímero de cicloolefina (COC), polisulfona (PSU), poliétersulfona (PES), polieterimida (PEI), poli(tereftalato de butileno) (PBT)), cerámica, porcelana, o combinaciones de los mismos.

50 En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además un recipiente frangible 120 que contiene un líquido 122, y que está dimensionado para alojarse dentro del indicador 100 de esterilización biológico, por ejemplo, dentro de al menos una parte del bastidor 102 (p. ej., al menos dentro de la primera parte 104 del bastidor 102). El recipiente frangible 120 puede estar formado por una variedad de materiales, incluidos, aunque no de forma limitativa, uno o más metales (p. ej., lámina), polímero (p. ej., cualquiera de los polímeros indicados anteriormente con respecto al bastidor 102), vidrio (p. ej., una ampolla de vidrio), y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, solamente una parte del recipiente 120 es frangible, por ejemplo, el recipiente 120 puede incluir una pieza frangible o cubierta (p. ej., una barrera, película, membrana frangible, o similares). El recipiente frangible 120 puede tener un primer estado en el que está intacto y el líquido 122 está contenido en su interior, y un segundo estado en el que al menos una parte del recipiente 120 está fracturado. En el segundo estado del recipiente

120, el líquido 122 puede estar en comunicación de fluidos con el depósito 103 del indicador 100 de esterilización biológico, p. ej., cuando el recipiente 120 está colocado en el indicador 100 de esterilización biológico.

5 Como se muestra en la realización ilustrada, el recipiente 120 puede mantenerse en su sitio dentro del indicador 100 de esterilización biológico y/o fracturarse mediante una inserción 130, que se describe con mayor detalle más adelante. El recipiente 120 puede fracturarse, por ejemplo, al empujar el recipiente 120 contra la inserción 130 (p. ej., un inserto que funciona como un interruptor) o empujando la inserción 130 contra el recipiente 120.

10 La primera parte 104 del bastidor 102 puede estar adaptada para alojar una mayoría de los componentes del indicador 100 de esterilización biológico, y que se puede denominar como “tubo”, “cuerpo tubular”, “base”, o similar. El bastidor 102 puede incluir un depósito 103 que puede estar definido por una o ambas de la primera parte 104 y la segunda parte 106 del bastidor 102. El indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además esporas u otra(s) fuente(s) de actividad biológica 115 (o un locus de esporas) situado en comunicación de fluidos con el depósito 103. Como se muestra en las Figs. 4-6, la segunda parte 106 del bastidor 102 puede incluir una o más aberturas 107 para proporcionar comunicación de fluidos entre el interior del bastidor 102 (p. ej., el depósito 103) y el ambiente. Por ejemplo, la una o más aberturas 107 pueden proporcionar comunicación de fluidos entre las esporas 115 y el ambiente durante un proceso de esterilización, y pueden servir como entrada al interior del indicador 100 de esterilización biológico y como entrada de la ruta 164 de esterilizante (descrita con mayor detalle más adelante). En algunas realizaciones, la segunda parte 106 del bastidor 102 puede acoplarse a un primer (p. ej., abierto) extremo 101 de la primera parte 104 del bastidor 102, y las esporas 115 se pueden introducir en un segundo (p. ej., cerrado) extremo 105, opuesto al primer extremo 101, de la primera parte 104 del bastidor 102.

25 En algunas realizaciones, una barrera o filtro (p. ej., una barrera estéril; no mostrada) se puede colocar en la ruta 164 del esterilizante (p. ej., en una entrada formada por la apertura 107) para inhibir la entrada de organismos, objetos o materiales contaminantes o extraños en el indicador 100 de esterilización biológico. Dicha barrera puede incluir un material impermeable a microorganismos transmisores de gases, y puede estar acoplada con el bastidor 102 mediante una variedad de medios de acoplamiento que incluyen, aunque no de forma limitativa, un adhesivo, un sello térmico, una soldadura sónica, o similar. De forma alternativa, la barrera puede acoplarse a la ruta 164 del esterilizante mediante una estructura de soporte (tal como la segunda parte 106) que está acoplada a la primera parte 104 del bastidor 102 (p. ej., con un cierre a presión, un encaje atornillado, un encaje a presión, o una combinación de los mismos). Durante la exposición a un esterilizante, el esterilizante puede atravesar la barrera hasta la ruta 164 del esterilizante y entrar en contacto con las esporas 115.

35 En algunas realizaciones, como se muestra en la realización ilustrada, el bastidor 102 puede incluir una parte inferior 114 y una parte superior 116, que pueden estar al menos parcialmente separadas por una pared interna (o pared parcial) 118, repisa, partición, reborde, o similar, en el que se puede formar una abertura 117 que proporciona comunicación de fluidos entre la parte inferior 114 y la parte superior 116. En algunas realizaciones, la parte inferior 114 de la primera parte 104 del bastidor 102 (denominada a veces sencillamente “la parte inferior 114” o la “la parte inferior 114 del bastidor 102”) puede adaptarse para alojar las esporas 115 o un locus de esporas. En algunas realizaciones, la parte inferior 114 se puede denominar como la “parte de detección” o la “región de detección” del bastidor 102, porque al menos una porción de la parte inferior 114 se puede analizar para encontrar signos de crecimiento de las esporas. Además, en algunas realizaciones, la parte superior 116 de la primera parte 104 del bastidor 102 (a veces denominada como “la parte superior 116” o la “la parte superior 116 del bastidor 102” por simplicidad) se puede adaptar para alojar al menos una parte del recipiente frangible 120, especialmente antes de la activación.

45 En algunas realizaciones, la parte del depósito 103 que está definida al menos parcialmente por la parte superior 116 del bastidor 102 se puede denominar como primera cámara (o depósito, zona, región, o volumen) 109 y la parte del depósito 103 que está definida al menos parcialmente por la parte inferior 114 del bastidor 102 se puede denominar como segunda cámara (o depósito, zona, región, o volumen) 111. En algunas realizaciones, la segunda cámara 111 se puede denominar como “cámara de crecimiento de esporas” o “cámara de detección”, y puede incluir un volumen a cuestionar respecto a la viabilidad de las esporas para determinar la eficacia de un proceso de esterilización.

55 La primera cámara 109 y la segunda cámara 111 pueden estar colocadas en comunicación de fluidos entre sí para permitir que un esterilizante y el líquido 122 se muevan desde (es decir, a través) de la primera cámara 109 hasta la segunda cámara 111. En algunas realizaciones, el grado de conexión de fluidos entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 (p. ej., el tamaño de una apertura, tal como la apertura 117, que conecta la primera cámara 109 y la segunda cámara 111) puede aumentarse después, simultáneamente con, y/o en respuesta a la etapa de activación (es decir, el líquido 122 que se libera desde el recipiente 120). En algunas realizaciones, el control de la comunicación de fluidos (o la extensión de la comunicación de fluidos) entre la primera cámara 109 (p. ej., en la parte superior 116) y la segunda cámara 111 (p. ej., en la parte inferior 114) puede proporcionarse por al menos una parte de la inserción 130.

65 El recipiente 120 puede estar colocado y sujeto en la primera cámara 109 durante la esterilización y cuando el recipiente 120 está en un primer estado sin fracturar. Las esporas 115 pueden estar alojadas en la segunda cámara 111 y en comunicación de fluidos con el ambiente cuando el recipiente 120 está en el primer estado. La primera cámara 109 y la segunda cámara 111 se pueden configurar de forma que el recipiente 120 no está presente en la segunda cámara 111, y especialmente, no cuando el recipiente 120 está en su primer estado sin

fracturar. Un esterilizante puede entrar en la segunda cámara 111 (p. ej., vía la primera cámara 109) durante la esterilización, y el líquido 122 puede entrar en la segunda cámara 111 (p. ej., desde la primera cámara 109) durante la activación, cuando el recipiente 120 se fractura y el líquido 122 se libera en el interior del bastidor 102.

5 Como resultado, cuando el recipiente 120 está en el primer estado, la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 pueden estar en comunicación de fluidos entre sí, y con el ambiente (p. ej., durante la esterilización). Por ejemplo, la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 pueden estar en comunicación de fluidos con el ambiente mediante una o más aperturas 107. En algunas realizaciones, la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 pueden estar en comunicación de fluidos con el ambiente de forma que la primera cámara 109 esté aguas arriba de la segunda cámara 111 cuando un esterilizante entra en el indicador 100 de esterilización biológico. Esto es, la primera cámara 109 puede estar colocada entre la entrada de esterilizante (p. ej., la una o más aperturas 107) y la segunda cámara 111, y la entrada de esterilizante puede estar colocada en una cara opuesta de la primera cámara 109 de la segunda cámara 111.

15 Como se muestra en las Figs. 7 y 9, en algunas realizaciones, la primera cámara 109 puede estar definida por una o ambas de la primera parte 104 y la segunda parte 106, especialmente cuando el recipiente 120 está en el primer estado. Además, en algunas realizaciones, la primera cámara 109 puede incluir un primer extremo 112 situado adyacente al extremo abierto 101 de la primera parte 104 del bastidor 102, adyacente a la segunda parte 106 del bastidor 102, y/o definido al menos parcialmente por la segunda parte 106. La primera cámara 109 puede incluir además un segundo extremo 113 situado adyacente y en comunicación de fluidos con la segunda cámara 111 y orientado hacia el extremo cerrado 105 del bastidor 102. El primer extremo 112 de la primera cámara 109 puede estar definido por la primera parte 104 y/o la segunda parte 106 del bastidor 102.

20 Como se muestra adicionalmente en las Figs. 7 y 9, en algunas realizaciones, la segunda cámara 111 puede incluir un primer extremo 124 colocado adyacente y en comunicación de fluidos con la primera cámara 109 y colocado hacia el extremo abierto 101 del bastidor 102, y un segundo extremo 125 al menos definido parcialmente por, que incluye, o colocado adyacente al extremo cerrado 105 del bastidor 102.

25 Dicho de otra forma, como se muestra en las Figs. 7 y 9, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir una dirección longitudinal  $D_L$  y, en algunas realizaciones, la primera cámara 109 puede estar situada longitudinalmente por encima de la segunda cámara 111.

30 En algunas realizaciones, la segunda cámara 111 puede estar al menos parcialmente definida por, puede incluir, o puede estar colocada adyacente al extremo cerrado 105 del indicador 100 de esterilización biológico. Además, en algunas realizaciones, la segunda cámara 111 puede ser más pequeña (p. ej., en volumen y/o superficie del área seccional transversal) que al menos una de la primera cámara 109 y el volumen del líquido 122 en el recipiente 120 que se liberará cuando se active el indicador 100 de esterilización biológico. Como resultado, en dichas realizaciones, la segunda cámara 111 puede mostrar un efecto de trampa del aire donde el gas (p. ej. aire) que está presente en la segunda cámara 111 puede inhibir el movimiento del fluido al interior de la segunda cámara 111. En algunas realizaciones, como se describe más detalladamente a continuación, una ruta de fluido que permite ventilar la segunda cámara 111 hacia otra parte del indicador 100 de esterilización biológico puede facilitar el movimiento del fluido al interior de la segunda cámara 111.

35 En algunas realizaciones, la pared 118 (denominada a veces como "pared de separación") puede estar angulada o inclinada, por ejemplo, orientada en un ángulo distinto de cero y que no sea recto con respecto a la dirección longitudinal  $D_L$  del bastidor 102 (p. ej. donde la dirección longitudinal  $D_L$  se extiende a lo largo del bastidor 102). Dicha angulación o inclinación de la pared 118 puede facilitar el movimiento del líquido 122 desde la parte superior 116 hasta la parte inferior 114 tras la esterilización y una vez que el recipiente 120 se haya roto para liberar el líquido 122.

40 Como se muestra en las Figs. 4-6, en algunas realizaciones, la pared 118 puede estar al menos parcialmente formada por un cambio en la dimensión interior del bastidor 102. Por ejemplo, como se muestra, la pared 118 puede estar formada por una disminución en un área seccional transversal desde una primera posición longitudinal en la primera cámara 109 hasta una segunda posición longitudinal en la segunda cámara 111. Además, solamente como ejemplo, la forma seccional transversal interna del bastidor 102 puede cambiar en la transición desde la primera cámara 109 hasta la segunda cámara 111 de ser prácticamente redonda (p. ej., con una cara plana que constituye menos de 50 % del perímetro) en la primera cámara 109 a prácticamente paralelepípedo (p. ej., prácticamente cuadrado) en la segunda cámara 111.

45 Adicionalmente, en algunas realizaciones, la pared 118 puede estar también al menos parcialmente formada por un cambio en la dimensión exterior del bastidor 102. Como se muestra en las Figs. 4-6, en algunas realizaciones, el bastidor 102 incluye un escalón (o repisa, saliente, transición, o similar) 123 que está inclinada consistentemente con la pared 118 (si la pared 118 está inclinada) y que incluye un cambio en la forma y dimensiones exteriores del bastidor 102. Sin embargo, debe entenderse que, en algunas realizaciones, incluso si la dimensión interior del bastidor 102 cambia para crear una segunda cámara 111 que tenga una forma o dimensión seccional transversal diferente a las de la primera cámara 109, la forma y dimensión exterior del bastidor 102 no tiene que cambiar, o cambia coherentemente con el cambio en la forma y/o dimensión interior. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el escalón 123 puede estar orientado prácticamente perpendicular con respecto a la dirección longitudinal  $D_L$ .

50

55

60

65



En algunas realizaciones, el depósito 103 tiene un volumen de al menos aproximadamente 0,5 mililitros (ml), en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1 ml, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1,5 ml. En algunas realizaciones, el depósito 103 tiene un volumen no superior a aproximadamente 5 ml, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 3 ml, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 2 ml.

5 En algunas realizaciones, el recipiente frangible 120 tiene un volumen de al menos aproximadamente 0,25 ml, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 0,5 ml, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1 ml. En algunas realizaciones, el recipiente frangible 120 tiene un volumen no superior a aproximadamente 5 ml, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 3 ml, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 2 ml.

10 En algunas realizaciones, el volumen del líquido 122 contenido en el recipiente frangible 120 es al menos aproximadamente 50 microlitros, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 75 microlitros, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 100 microlitros. En algunas realizaciones, el volumen del líquido 122 contenido en el recipiente frangible 120 es no superior a aproximadamente 5 ml, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 3 ml, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 2 ml.

15 En algunas realizaciones, la primera cámara 109 (es decir, formada por la parte superior 116 de la primera parte 104 del bastidor 102) tiene un volumen de al menos aproximadamente 500 microlitros (o milímetros cúbicos), en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1000 microlitros, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 2000 microlitros, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 2500 microlitros. En algunas realizaciones, la primera cámara 109 tiene un volumen no superior a aproximadamente 5000 microlitros, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 4000 microlitros, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 3000 microlitros. En algunas realizaciones, la primera cámara 109 tiene un volumen de aproximadamente 2790 microlitros, o 2800 microlitros.

20 En algunas realizaciones, la segunda cámara 111 (es decir, formada por la inferior 114 de la primera parte 104 del bastidor 102) tiene un volumen de al menos aproximadamente 5 microlitros, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 20 microlitros, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 35 microlitros. En algunas realizaciones, la segunda cámara 111 tiene un volumen no superior a aproximadamente 250 microlitros, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 200 microlitros, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 175 microlitros y, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 100 microlitros. En algunas realizaciones, la segunda cámara 111 tiene un volumen de aproximadamente 208 microlitros, o 210 microlitros.

25 En algunas realizaciones, el volumen de la segunda cámara 111 es al menos aproximadamente 5 % del volumen de la primera cámara 109, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 7 %. En algunas realizaciones, el volumen de la segunda cámara 111 no es superior a aproximadamente 20 % del volumen de la primera cámara 109, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 15 %, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 12 %, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 10 %. En algunas realizaciones, el volumen de la segunda cámara 111 es aproximadamente 7,5 % del volumen de la primera cámara 109.

30 En algunas realizaciones, el volumen de la segunda cámara 111 no es superior a aproximadamente 60 % del volumen del líquido 122 incluido en el recipiente 120, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 50 %, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 25 %. En algunas realizaciones, diseñar la segunda cámara 111 para que tenga un volumen que es sustancialmente inferior al del líquido 122 incluido en el recipiente 120 puede garantizar que el volumen de líquido adicional puede compensar la evaporación no prevista.

35 En algunas realizaciones, la primera cámara 109 (es decir, formada por la parte superior 116 de la primera parte 104 del bastidor 102) tiene un área seccional transversal (o área seccional transversal promedio) en la transición entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111, o en la posición adyacente a la segunda cámara 111, de al menos aproximadamente 25 mm<sup>2</sup>, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 30 mm<sup>2</sup>; y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 40 mm<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, la primera cámara 109 tiene un área seccional transversal en la transición entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111, o en la posición adyacente a la segunda cámara 111, no superior a aproximadamente 100 mm<sup>2</sup>, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 75 mm<sup>2</sup>, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 50 mm<sup>2</sup>.

40 En algunas realizaciones, la segunda cámara 111 (es decir, formada por la parte inferior 114 de la primera parte 104 del bastidor 102) tiene un área seccional transversal en la transición entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111, o en la posición adyacente a la primera cámara 109, de al menos aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 10 mm<sup>2</sup>, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 15 mm<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, la segunda cámara 111 tiene un área seccional transversal (o área seccional transversal promedio) no superior a aproximadamente 30 mm<sup>2</sup>, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 25 mm<sup>2</sup>, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente mm<sup>2</sup>.

45 En algunas realizaciones, el área seccional transversal de la segunda cámara 111 en la transición entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 puede ser no superior a aproximadamente 60 % del área seccional transversal

de la primera cámara 109 en la transición, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 50 %, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 40 %, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 30 %.

En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además un sustrato 119. En algunas realizaciones, como se muestra en las Figs. 4-7 y 9, el sustrato 119 puede estar dimensionado para colocarse adyacente a la pared 118, y especialmente, para quedar apoyado sobre la pared 118. El sustrato 119 se puede colocar entre la parte superior 116 (es decir, la primera cámara 109) y la parte inferior 114 (es decir, la segunda cámara 111) del indicador 100 de esterilización biológico y, en algunas realizaciones, puede definir al menos parcialmente la primera cámara 109 y la segunda cámara 111. Así, en algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede colocar entre el recipiente 120 y las esporas 115. En algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede colocar en la primera cámara 109, o sobre un lado de la primera cámara de la pared 118, de forma que el sustrato 119 no esté colocado en la segunda cámara 111.

Además, el sustrato 119 se puede colocar para minimizar la difusión de una señal de ensayo (p. ej., fluorescente) al exterior de la segunda cámara 111. En algunas realizaciones, dependiendo del material que constituye el sustrato 119, el sustrato 119 también puede absorber colorante, reactivos indicadores, u otros materiales de la solución que puedan inhibir lecturas precisas de una señal procedente del indicador 100 de esterilización biológico (es decir, "inhibidores"). En algunas realizaciones, como se muestra en las Figs. 4-7, 9 y 10, el sustrato 119 puede incluir una o más aberturas 121, que pueden estar configuradas para controlar (es decir, facilitar y/o limitar, dependiendo del número, tamaño, forma y/o ubicación) el desplazamiento del fluido entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 del indicador 100 de esterilización biológico, y especialmente, que puede facilitar el desplazamiento del líquido 122 a las esporas 115 cuando el recipiente 120 se fractura. A modo de ejemplo, solamente, se observaron beneficios o ventajas especiales cuando la apertura 121 se colocó en frente de (o "delante de") el centro del sustrato 119, como se muestra. En la realización ilustrada en las Figs. 4-10, el "frente" del indicador 100 de esterilización biológico o los componentes del mismo se describirán de forma general como orientados hacia una cara plana 126. En general, el "frente" del indicador 100 de esterilización biológico puede referirse a la parte del indicador 100 de esterilización biológico que cuestionará un aparato de lectura.

Además, a modo de ejemplo únicamente, la apertura 121 se ilustra como circular o redonda; sin embargo, son posibles otras formas de la apertura seccional transversal y están comprendidas en el ámbito de la presente descripción. Adicionalmente, únicamente a modo de ejemplo, y como se muestra en la Fig. 6, el sustrato 119 está conformado para llenar prácticamente el área de la sección transversal de la primera cámara en la transición entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111. Sin embargo, son posibles otras formas del sustrato 119 y se pueden adaptar para ajustarse al bastidor 102, la primera cámara 109, la segunda cámara 111, la pared 118, u otro componente del indicador 100 de esterilización biológico.

Como se ha mencionado anteriormente, la segunda cámara 111 puede incluir un volumen a cuestionar. Dicho volumen se puede evaluar respecto a la viabilidad de esporas con el fin de determinar la letalidad o eficacia de un procedimiento de esterilización. En algunas realizaciones, el volumen a cuestionar puede ser la totalidad o una parte de la segunda cámara 111. En algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede colocar fuera del volumen a cuestionar, lo que puede reducir el número de estructuras del volumen que pueden interferir con los procedimientos de ensayo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede colocar de forma que el sustrato 119 no esté en contacto directo con al menos una de las esporas 115, el soporte 135 de las esporas, y el depósito 136 de esporas. En algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede colocar de tal manera que el sustrato 119 no está situado entre un sistema de detección (p. ej., un sistema de detección óptico, tal como una fuente de excitación de fluorescencia y un detector de emisiones) y al menos una de las esporas 115, el soporte 135 de las esporas, y el depósito 136 de esporas. El sustrato 119 puede tener las posiciones anteriores cuando el recipiente 120 está en el primer estado y/o el segundo estado, pero especialmente, cuando el recipiente 120 está en el segundo estado.

En algunas realizaciones, la posición del sustrato en el indicador 100 de esterilización biológico puede afectar la correlación de un sistema de detección rápida para determinar la viabilidad de las esporas (p. ej., detección de fluorescencia) con un sistema de detección más lento (p. ej., durante la noche o 24 h) (p. ej., un indicador de pH que puede mostrar un cambio de color (p. ej., en 24 h) en respuesta al crecimiento de las esporas). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato 119 puede mejorar la correlación de las lecturas de fluorescencia en varios puntos temporales con los resultados de crecimiento después de 24 horas, especialmente cuando el sustrato 119 está colocado en una "primera posición" (como se describe en la presente memoria y como se muestra en las Figs. 1, 2 y 4 - 7), la fluorescencia puede correlacionarse con exactitud con el crecimiento. Dicha correlación puede ser una mejora sobre otras posiciones del sustrato y otros indicadores de esterilización biológicos sin sustrato.

Además, el sustrato 119 puede estar situado en el indicador 100 de esterilización biológico de forma que el sustrato 119 no está en contacto directo con el recipiente 120 cuando el recipiente 120 está en el primer estado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede situar en la primera cámara 109 (p. ej., adyacente a un extremo inferior (p. ej., el segundo extremo 113) de la primera cámara 109), pero incluso en dichas realizaciones, el sustrato 119 se puede situar de tal manera que el sustrato 119 no esté en contacto con el recipiente 120. Por ejemplo, como se muestra en las Figs. 4-5 y 7-9, en algunas realizaciones, la inserción 130 se puede colocar entre el recipiente 120 y el sustrato 119 cuando el recipiente 120 está en el primer estado, de forma que la inserción 130 soporte el recipiente 120 en el primer estado. La inserción 130, o una parte de la

misma, puede estar situada adyacente al sustrato 119. Por ejemplo, como se muestra en la realización ilustrada, el sustrato 119 se puede situar entre (p. ej., intercalado entre) la inserción 130 y la pared 118. Así, en algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede colocar entre la inserción 130 y la segunda cámara 111.

5 Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede colocar y configurarse para controlar o alterar el flujo de fluido en el indicador 100 de esterilización biológico, especialmente, para controlar el flujo de fluido entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede configurar (p. ej., dimensionar, orientar, y/o fabricar con determinados materiales) para controlar la velocidad a la que un esterilizante se suministra a la segunda cámara 111 (y a las esporas 115). Por ejemplo, la velocidad de administración del esterilizante puede ser menor de lo que sería si el sustrato 119 no estuviera presente entre en la primera cámara 109 y la segunda cámara 111.

15 Además, en algunas realizaciones, el sustrato 119 se puede configurar (p. ej., dimensionar, orientar, y/o fabricar con determinados materiales) para controlar la velocidad a la que los productos detectables se difunden fuera del volumen para ser cuestionados. En algunas realizaciones, el producto puede incluir una señal (p. ej., una señal fluorescente) que indica la viabilidad de las esporas, y en algunas realizaciones, el producto detectable puede ser la(s) propia(s) esporas(s) 115. El control de la difusión de los productos detectables fuera del volumen a cuestionar puede ser especialmente útil en realizaciones en las que el volumen del líquido 122 es superior al volumen de la segunda cámara 111 (o del volumen a cuestionar), porque el líquido 112 en dichas realizaciones puede extenderse al indicador 100 de esterilización biológico en una cantidad mayor que la segunda cámara 111 (o el volumen a cuestionar) cuando el recipiente 120 está en su segundo estado fracturado. En algunas realizaciones, los productos detectables pueden moverse libremente a través de todo el volumen del líquido 122 (es decir, un volumen fuera del volumen a cuestionar), salvo que exista alguna barrera o medio para controlar la difusión, tal como el sustrato 119. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sustrato 119 puede colocarse en un nivel justamente por encima del volumen a cuestionar (es decir, por debajo del nivel del líquido 122), para inhibir el desplazamiento de los productos detectables hasta la parte del líquido 122 que está colocada por encima del sustrato 119.

20 En algunas realizaciones, el sustrato 119 puede controlar la velocidad de administración del esterilizante (p. ej., al interior de la segunda cámara 111) y/o la velocidad de difusión de los productos detectables (p. ej., fuera de la segunda cámara 111) proporcionando una barrera física o bloqueo para el esterilizante y/o los productos detectables. Esta barrera física también puede actuar para recoger las partes rotas del recipiente 120 cuando el recipiente 120 está en el segundo estado fracturado para impedir el desplazamiento de las partes rotas al interior del volumen a cuestionar, donde las partes rotas podrían bloquear, refractar, reflejar o interferir con el proceso de detección (p. ej., los procesos de detección óptica).

30 Además, en algunas realizaciones, el líquido 122, bien antes o bien después de entrar en comunicación de fluidos con las esporas 115, puede incluir uno o más inhibidores, u otros componentes, que pueden interferir con un ensayo o proceso de detección precisos. En algunas realizaciones, los ejemplos de inhibidores pueden incluir al menos uno de colorantes, reactivos indicadores, otros materiales o sustancias que pueden inhibir una reacción (p. ej., una reacción enzimática) necesaria para la detección de la viabilidad de las esporas (p. ej., sales, etc.), otros materiales o sustancias que pueden interferir el proceso de detección, o combinaciones de los mismos. En dichas realizaciones, el sustrato 119 se puede configurar para absorber y/o concentrar selectivamente uno o más inhibidores del líquido 122, o al menos del volumen del líquido 122 que se va a cuestionar.

45 Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede estar presente más de un reactivo indicador en el líquido 122, tanto antes de ponerse en contacto con las esporas 115 o como resultado de la puesta en contacto de las esporas 115. En dichas realizaciones, cuando un primer reactivo indicador (p. ej., usado en la detección por fluorescencia) puede ser necesario para detectar la viabilidad de las esporas, un segundo reactivo indicador (p. ej., un indicador de pH) puede interferir realmente con la detección del primer reactivo indicador. Únicamente a modo de ejemplo, en las realizaciones en las que el segundo reactivo indicador es un indicador de pH (p. ej., uno o más de púrpura de bromocresol, rojo de metilo o una combinación de los mismos), el indicador de pH puede plantear un conflicto o interferir con la lectura de fluorescencia del primer reactivo indicador, por ejemplo, en realizaciones en las que el indicador de pH emite radiación electromagnética a una longitud de onda que es similar a la banda espectral de la fluorescencia del primer reactivo indicador (p. ej., cuando el indicador de pH presenta un cambio de color). En estas realizaciones, el sustrato 119 se puede configurar (p. ej., formarse de un material adecuado) para absorber y/o concentrar selectivamente el segundo reactivo indicador cuando se pone en contacto con el líquido 122 para reducir la concentración del segundo reactivo indicador en el líquido 122, o al menos en el volumen del líquido 122 que se va a cuestionar.

60 Además, en algunas realizaciones (p. ej., en realizaciones en las que la pared 118 está inclinada y el sustrato 119 está situado adyacente a la pared 118), el sustrato 119 puede estar angulado o inclinado, por ejemplo, orientado en un ángulo distinto de cero y no recto con respecto a la dirección longitudinal  $D_L$  del bastidor 102. Dicha angulación o inclinación del sustrato 119 puede facilitar el desplazamiento del líquido 122 desde la primera cámara 109 hasta la segunda cámara 111 tras la esterilización y una vez que el recipiente 120 se haya roto para liberar el líquido 122.

65 En algunas realizaciones, el sustrato 119 puede estar formado por una variedad de materiales para realizar una o más de las funciones anteriores. Entre los ejemplos de materiales sustrato se pueden incluir, aunque no de forma limitativa, algodón, lana de vidrio, tela, polipropileno no tejido, rayón no tejido, mezcla de polipropileno/rayón no tejido, nailon no tejido, fibra de vidrio no tejida u otras fibras no tejidas, papeles de filtro, películas hidrófobas e hidrófilas microporosas,

5 fibras de vidrio, espumas poliméricas de celda abiertas y películas de plástico semipermeable (p. ej., películas rellenas de partículas, membranas con separación de fases térmicamente inducida (TIPS), etc.), y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en realizaciones en las que el sustrato 119 se puede usar para concentrar selectivamente uno o más reactivos del indicador (p. ej., púrpura de bromocresol (BCP)), el sustrato 119 se puede formar de un nailon cargado (tal como las membranas de transferencia cargadas de resonado comercializadas por GE Osmonics (con la designación comercial "MAGNAPROBE" (p. ej., 0,45 micrómetros, n.º de catálogo NP0HY00010, n.º de material 1226566)).

10 Un ejemplo de un método y sistema que puede emplear el sustrato 119 se describe también en la solicitud de patente en trámite US-61/408.887 presentada el 1 de noviembre de 2010, titulada "Method of Detecting a Biological Activity".

15 En algunas realizaciones, al menos una parte de uno o más de la inserción 130, la pared 118, y/o el sustrato 119, o una apertura de los mismos, puede proporcionar comunicación de fluidos entre la primera cámara 109 (p. ej., en la parte superior 116) y la segunda cámara 111 (p. ej., en la parte inferior 114), y/o puede controlar la comunicación de fluidos entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 (p. ej., controlando la extensión de la conexión de fluidos entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111).

20 El indicador 100 de esterilización biológico puede incluir una primera ruta 160 del fluido que se puede colocar para acoplar de forma fluida la primera cámara 109 y la segunda cámara 111, y que puede permitir a un esterilizante (p. ej., durante la esterilización, cuando el recipiente 120 está en un primer estado sin fracturar) y/o el líquido 122 (p. ej., después de la esterilización y durante la activación, cuando el recipiente 120 está en un segundo estado fracturado) alcanzar las esporas 115. En la realización ilustrada, la primera ruta de fluido 160 puede estar generalmente definida por uno o más de los siguientes: (1) la inserción 130, p. ej., mediante una apertura 177 descrita a continuación, una apertura formada en la inserción 130, y/o cualquier espacio abierto alrededor de la inserción 130, tal como entre la inserción 130 (p. ej., una parte delantera de la misma) y el bastidor 102; (2) la pared 118, p. ej., la apertura 117 definida por la pared 118; (3) el sustrato 119, p. ej., la apertura 121 formada en la misma, o cualesquiera espacios abiertos alrededor del sustrato 119, tal como entre el sustrato 119 (p. ej., una parte delantera del mismo) y el bastidor 102; (4) el bastidor 102, p. ej., cualesquiera aperturas o espacios formados en la misma; y combinaciones de los mismos. Como resultado, la primera ruta 160 de fluido está generalmente representada por la realización ilustrada con una flecha en las Figs. 7 y 10.

30 El indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además una segunda ruta 162 de fluido situada para acoplar de forma fluida la segunda cámara 111 con otra cámara o parte del indicador 100 de esterilización biológico, tal como la primera cámara 109. La segunda ruta 162 de fluido puede estar posicionada adicionalmente para permitir que el gas que estaba inicialmente presente en la segunda cámara 111 se desplace y salga por la segunda cámara 111, por ejemplo, cuando el esterilizante y/o el líquido 122 se desplazan al interior de la segunda cámara 111. Así, la segunda ruta 162 de fluido, que se describe con mayor detalle a continuación, puede servir como un venteo interno del indicador 100 de esterilización biológico.

35 En algunas realizaciones, el sustrato 119 puede proporcionar una barrera física o bloqueo entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 que puede permitir al menos uno de los siguientes: controlar la velocidad de administración del esterilizante/velocidad de destrucción a la que el esterilizante se administra dentro de la segunda cámara 111; controlar la difusión de las esporas 115 y/o productos detectables desde la segunda cámara 111; controlar la velocidad de suministro del líquido 122 a la segunda cámara 111 (y a las esporas 115) cuando el recipiente 120 está en el segundo estado fracturado; o una combinación de los mismos.

40 Porque, en algunas realizaciones, el sustrato 119 puede proporcionar una barrera física para suministrar el líquido 122 a la segunda cámara 111 durante la activación (es decir, cuando el recipiente 120 está en el segundo estado), la apertura 121 en el sustrato 119 y/o el ángulo del sustrato 119 se puede controlar para conseguir una velocidad de administración de líquido deseada. Además, o de forma alternativa, la segunda ruta 162 de fluido puede proporcionar un venteo para cualquier gas o aire que queda atrapado en la segunda cámara 111 para facilitar el desplazamiento del líquido 122 a través o pasado el sustrato 119 y al interior de la segunda cámara 111 cuando se desea.

45 Además, o de forma alternativa, el bastidor 102 se puede configurar (p. ej., formarse de un material adecuado y/o configurarse con ranuras microestructuradas u otras modificaciones superficiales físicas) para facilitar el desplazamiento del líquido 122 a la segunda cámara 111 cuando se desee.

50 En algunas realizaciones, el líquido 122 puede incluir un medio nutriente para las esporas, tal como un medio de germinación que estimule la germinación de las esporas supervivientes. En algunas realizaciones, el líquido 122 puede incluir agua (u otro disolvente) que se puede combinar con los nutrientes para formar un medio nutriente. Los nutrientes adecuados pueden incluir los nutrientes necesarios para estimular la germinación y/o el crecimiento de las esporas supervivientes, y se puede proporcionar en forma seca (p. ej., forma pulverulenta, forma de comprimido, forma de comprimidos ovalados, forma de cápsula, una película o revestimiento, atrapada en un gránulo u otros soportes, otra forma o configuración adecuada, o una combinación de los mismos) en el depósito 103, por ejemplo, en una región del indicador 100 de esterilización biológico cerca de las esporas 115.

El medio nutriente, por lo general, se puede seleccionar para inducir la germinación y la proliferación inicial de las esporas, si son viables. El medio nutriente puede incluir uno o más azúcares, incluidos, aunque no de forma limitativa, glucosa, fructosa, celobiosa, o similares, o una combinación de los mismos. El medio nutriente también puede incluir una sal, incluida, aunque no de forma limitativa, cloruro de potasio, cloruro de calcio, o similares, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el nutriente puede incluir además al menos un aminoácido, incluido, aunque no de forma limitativa, al menos uno de metionina, fenilalanina, y triptófano.

En algunas realizaciones, el medio nutriente puede incluir moléculas indicadoras, por ejemplo, moléculas indicadoras que tienen propiedades ópticas que cambian en respuesta a la germinación o el crecimiento de las esporas. Las moléculas indicadoras adecuadas pueden incluir, aunque no de forma limitativa, moléculas indicadoras de pH, sustratos enzimáticos, colorantes de unión a ADN, colorantes de unión a ARN, otras moléculas indicadoras adecuadas, o una combinación de los mismos.

Como se muestra en las Figs. 4-10, el indicador 100 de esterilización biológica puede incluir además una inserción 130. En algunas realizaciones, la inserción 130 puede estar adaptada para sujetar o llevar el recipiente 120, de forma que el recipiente 120 se mantenga intacto en una ubicación separada de las esporas 115 durante la esterilización. Esto es, en algunas realizaciones, la inserción 130 puede incluir (o funcionar como) un soporte 132 (véase la Fig. 4) del recipiente 120, especialmente, antes de que el recipiente 120 se rompa durante la etapa de activación (es decir, el escalón en el que el líquido 122 se libera desde el recipiente 120 y se suministra a las esporas 115, lo que puede suceder después de un proceso de esterilización). En algunas realizaciones, la inserción 130 puede estar adaptada además para permitir que el recipiente 120 se desplace un poco en el bastidor 102, p. ej., longitudinalmente con respecto al bastidor 102. La inserción 130 de la realización ilustrada se describe con mayor detalle a continuación. Ejemplos de otras inserciones y vehículos adecuados se describen en la publicación de solicitud PCT copendiente WO 2011/011189.

En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además un soporte 135 de esporas, como se muestra en las Figs. 4-7 y 9. Sin embargo, en algunas realizaciones, la inserción 130 se puede modificar para incluir una parte adaptada para alojar las esporas 115. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la inserción 130 y el soporte 135 de esporas pueden estar formados íntegramente como una inserción que comprende una primera parte adaptada para sujetar y eventualmente fracturar el recipiente 120, cuando se desea, y una segunda parte adaptada para alojar las esporas 115 en una región del indicador 100 de esterilización biológico que está separada del recipiente 120 durante la esterilización (es decir, antes de la fractura).

Como se muestra en las Figs. 4-7 y 9, el soporte 135 de esporas puede incluir un depósito 136 de esporas (que también se puede denominar como depresión, valle, pocillo, rebaje, o similar), en el que las esporas 115 se pueden colocar, bien directamente o sobre un sustrato. En las realizaciones que utilizan un medio nutriente que está situado para mezclarse con el líquido 122 cuando se libera desde el recipiente 120, el medio nutriente se puede situar cerca o en el depósito 136 de esporas, y el medio nutriente se puede mezclar con (p. ej., disolverse en) el agua cuando el agua se libera desde el recipiente 120. A modo de ejemplo únicamente, en las realizaciones en las que el medio nutritivo se proporciona en forma seca, la forma seca puede estar presente dentro del depósito 103, el depósito 136 de esporas, sobre un sustrato para las esporas, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se puede emplear una combinación de medio nutriente líquido y seco.

En algunas realizaciones, el depósito 136 de esporas tiene un volumen de al menos aproximadamente 1 microlitro, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 5 microlitros, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 10 microlitros. En algunas realizaciones, el depósito 136 de esporas tiene un volumen no superior a aproximadamente 250 microlitros, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 175 microlitros, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 100 microlitros.

Como se muestra en las Figs. 7 y 9, en algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además una arista o saliente 165 que puede estar acoplado o formado íntegramente con una pared 108 del bastidor 102, que puede situarse para mantener el soporte 135 de esporas en una ubicación deseada en el bastidor 102 y/o en un ángulo u orientación deseado, por ejemplo, con respecto a los sistemas de detección (p. ej., sistemas de detección óptica) del aparato 12 de lectura.

Como se muestra en las Figs. 4-7 y 9, la segunda parte 106 del bastidor 102 se puede adaptar para acoplarse con la primera parte 104. Por ejemplo, como se muestra, la segunda parte 106 puede estar adaptada para acoplarse a la parte superior 116 (p. ej., el primer extremo 101) de la primera parte 104 del bastidor 102. En algunas realizaciones, como se muestra en las Figs. 4-7, la segunda parte 106 puede estar en la forma de un tapón que puede estar dimensionado para recibir al menos una parte de la primera parte 104 del bastidor 102.

Como se muestra en las Figs. 4-5 y 7-8, durante la esterilización y antes de la activación, la segunda parte 106 puede estar en una primera posición "inactivada" 148 con respecto a la primera parte 104, y el recipiente 120 puede estar en un primer estado intacto. Como se muestra en la Fig. 9, la segunda parte 106 del bastidor 102 puede desplazarse a una segunda posición "activada" 150 (p. ej., cuando la segunda parte 106 está completamente presionada) con respecto a la primera parte 104, y el recipiente 120 puede estar en un segundo estado fracturado. Por ejemplo, después de la esterilización, el indicador 100 de esterilización biológico se puede activar desplazando

la segunda parte 106 desde la primera posición 148 a la segunda posición 150 (es decir, una cantidad suficiente) para ocasionar la fracturación del recipiente 120 y para liberar el líquido 122 desde el recipiente 120, para dejar que el líquido 122 esté en comunicación de fluidos con las esporas 115. El indicador 100 de esterilización biológico se puede activar antes de colocar el indicador 100 de esterilización biológico en un pocillo de un aparato de lectura, tras  
 5 colocar el indicador 100 de esterilización biológico en el pocillo, o cuando el indicador 100 de esterilización biológico está colocado en el pocillo (es decir, el indicador 100 de esterilización biológico se puede deslizar en su lugar en el aparato de lectura, y la segunda parte 106 puede continuar presionada hasta que esté en su segunda posición 150, p. ej., en la que la parte inferior del pocillo proporciona resistencia suficiente para desplazar la segunda parte 106 a su segunda posición 150). La segunda posición 150 puede estar situada más cerca del extremo cerrado 105 de la  
 10 primera parte 104 del indicador 100 de esterilización biológico que la primera posición 148.

Como se muestra en la realización ilustrada, en algunas realizaciones, la primera parte 104 del bastidor 102 puede incluir un escalón, saliente, o transición 152 plana a redonda. El escalón 152 se muestra expuesto cuando la segunda parte 106 está en su primera posición 148 y oculto o tapado cuando la segunda parte 106 está en su segunda posición 150. Como tal, el escalón 152 se puede detectar para determinar si la segunda parte 106 está en la primera posición 148 (es decir, el indicador 100 de esterilización biológico está inactivado), o está en la segunda posición 150 (es decir, el indicador 100 de esterilización biológico está activado). El uso de estas características del indicador 100 de esterilización biológico para determinar un estado del indicador 100 de esterilización biológico, por ejemplo, para confirmar si el indicador 100 de esterilización biológico ha sido activado, se describe con mayor detalle en la solicitud en trámite US-61/409.042. La posición longitudinal del escalón 152 se muestra únicamente a modo de ejemplo; sin embargo, debe entenderse que, en su lugar, el escalón 152 puede estar situado en una posición longitudinal diferente (p. ej., más cerca del extremo cerrado 105 del indicador 100 de esterilización biológico) o, en algunas realizaciones, la transición plana a redonda puede ser gradual, cónica, o en forma de rampa.

Se puede utilizar una variedad de medios de acoplamiento entre la primera parte 104 y la segunda parte 106 del bastidor 102 para permitir que la primera parte 104 y la segunda parte 106 estén acopladas de forma desmontable entre sí, incluidos, aunque no de forma limitativa, la gravedad (p. ej., un componente puede colocarse sobre otro componente, o una parte correspondiente del mismo), filetes roscados, encaje por presión (denominado también a veces como “encaje por rozamiento” o “encaje de interferencia”), cierre a presión, imanes, adhesivos, termosellado, otros medios de acoplamiento desmontables adecuados, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico no tiene que volver a abrirse y la primera parte 104 y la segunda parte 106 no tienen que estar acopladas de forma desmontable entre sí, sino que en su lugar, pueden estar acopladas entre sí de forma permanente o semipermanente. Dichos medios de acoplamiento permanentes o semipermanentes pueden incluir, aunque no de forma limitativa, adhesivos, pegatinas, grapas, tornillos, clavos, ribetes, abrazaderas, pliegues, soldadura (p. ej., soldadura sónica (p. ej., ultrasónica)), cualquier técnica de unión térmica (p. ej., calor y/o presión aplicados a uno o ambos componentes a acoplar), cierres de presión, encaje a presión, termosellado, otros medios de acoplamiento permanentes o semipermanentes adecuados, y combinaciones de los mismos. Un experto en la técnica reconocerá que parte de los medios de acoplamiento permanentes o semipermanentes también pueden estar adaptados para desacoplarse, y viceversa, y se clasifican de esta forma a modo de ejemplo únicamente.

Como se muestra en las Figs. 7 y 9, la segunda parte 106 se puede desplazar entre una primera posición longitudinal 148 con respecto a la primera parte 104 y una segunda posición longitudinal 150 con respecto a la primera parte 104; sin embargo, deberá entenderse que el indicador 100 de esterilización biológico podría en su lugar configurarse de forma diferente, de forma que la primera y segunda posiciones 148 y 150 no sean necesariamente posiciones longitudinales con respecto a una o ambas de la primera parte 104 y la segunda parte 106 del bastidor 102.

La segunda parte 106 puede incluir además un sello 156 (p. ej., un saliente, una protuberancia, una solapa, un reborde, junta tórica, o similar, o combinaciones de los mismos) que se pueda colocar en contacto con el primer extremo 101 de la primera parte 104, y especialmente, un extremo 157 superior abierto de la primera parte 104 para cerrar o sellar (p. ej., sellar herméticamente) el indicador 100 de esterilización biológico una vez que la segunda parte 106 se ha desplazado a la segunda posición 150 y el líquido 122 se ha liberado desde el recipiente 120 (es decir, cuando el recipiente 120 está en un segundo estado fracturado). Esto es, las esporas 115 pueden quedar separadas del ambiente por un sello hermético cuando el recipiente 120 está en el segundo estado. El sello 156 puede tomar una variedad de formas y se muestra en las Figs. 7 y 9 como ejemplo formando un anillo o cavidad interior que junto con la pared 110 de la segunda parte 106 está dimensionada para recibir el extremo superior 157 de la primera parte 104 del bastidor 102 para sellar el indicador 100 de esterilización biológico.

En algunas realizaciones, uno o ambos del sello 156 y el extremo superior 157 pueden incluir además una estructura (p. ej., una protuberancia) configurada para encajar con el otro extremo superior 157 y el sello 156, respectivamente, para acoplar la segunda parte 106 del bastidor 102 a la primera parte 104 del bastidor 102.

Además, en algunas realizaciones, la segunda parte 106 del bastidor 102 se puede acoplar a la primera parte 104 del bastidor 102 para sellar el indicador 100 de esterilización biológico del ambiente después de la activación. Dicho sellado puede inhibir la contaminación, evaporación, o estropeamiento del líquido 122 una vez que se ha liberado desde el recipiente 120, y/o puede inhibir la contaminación del interior del indicador 100 de esterilización biológico.

La inserción 130 se describirá ahora con mayor detalle.

Como se muestra en las Figs. 4-5 y 7, durante la esterilización y antes de la activación, la segunda parte 106 puede estar en una primera posición 148 con respecto a la primera parte 104. En la primera posición 148, el recipiente 120 puede mantenerse intacto en una posición separada de la parte inferior 114, la segunda cámara 111, o las esporas 115, y el líquido 122 se puede contener dentro del recipiente 120.

Como se muestra en la Fig. 9, después de la esterilización, el indicador 100 de esterilización biológico se puede activar para liberar el líquido 122 desde el recipiente 120 para desplazar el líquido 122 a la segunda cámara 111. Esto es, la segunda parte 106 del bastidor 102 puede desplazarse hasta una segunda posición 150 con respecto a la primera parte 104. Cuando la segunda parte 106 se desplaza desde la primera posición 148 a la segunda posición 150, el sello 156 de la segunda parte 106 del bastidor 102 puede encajar con el extremo superior 157 de la primera parte 104 para sellar el depósito 103 del indicador 100 de esterilización biológico del ambiente. En dichas realizaciones, la segunda parte 106 puede encajar reversiblemente la primera parte 104 en la segunda posición 150, y en algunas realizaciones, la segunda parte 106 puede encajar irreversiblemente la primera parte 104. Sin embargo, se deberá entender que las estructuras y medios de acoplamiento de la primera parte 104 y la segunda parte 106 se muestran en la realización ilustrada únicamente a modo de ejemplo, y que en su lugar se puede utilizar cualquiera de los medios de acoplamiento anteriormente descritos entre la primera parte 104 y la segunda parte 106 del bastidor 102.

La inserción 130 puede estar adaptada para sujetar o llevar el recipiente 120, de forma que el recipiente 120 se mantenga intacto en una ubicación separada de las esporas 115 durante la esterilización. Esto es, como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, la inserción 130 puede incluir (o funcionar como) un soporte 132 del recipiente 120, especialmente, antes de que el recipiente 120 se rompa durante la etapa de activación (es decir, el escalón en el que el líquido 122 se libera desde el recipiente 120 y se suministra a las esporas 115, lo que sucede de forma típica después de un proceso de esterilización).

Además, la inserción 130 se puede adaptar para sujetar el recipiente 120 intacto en una posición en el bastidor 102 que mantiene al menos una separación mínima (p. ej., una superficie del área seccional transversal mínima de espacio) entre el recipiente 120 y el bastidor 102 y/o entre el recipiente 120 y cualesquiera otros componentes o estructuras del bastidor 102 (p. ej., al menos una parte de la inserción 130, tal como el soporte 132, etc.), por ejemplo, para mantener una ruta 164 del esterilizante prácticamente constante en el indicador 100 de esterilización biológico. En algunas realizaciones, la inserción 130 se puede adaptar para sujetar el recipiente 120 intacto en una ubicación prácticamente consistentemente en el bastidor 102.

En algunas realizaciones, como se muestra en la Fig. 6, al menos una parte del bastidor 102 puede incluir una parte cónica 146 en la que el bastidor 102 (p. ej., la pared 108 y/o una superficie interna de la misma) generalmente se ahúsan en la dirección longitudinal  $D_L$  del bastidor 102. Como resultado, la superficie del área seccional transversal del bastidor 102 puede disminuir generalmente a lo largo de la dirección longitudinal  $D_L$ .

En algunos casos, sin proporcionar los medios para mantener al menos una separación mínima alrededor del recipiente 120 (p. ej., entre el recipiente 120 y la estructura circundante) puede haber la posibilidad de que el recipiente 120 pueda quedar situado en el bastidor 102 (p. ej., en la parte cónica 146) de forma que obstruya o bloquee la ruta 164 del esterilizante. Sin embargo, el indicador 100 de esterilización biológico de la presente descripción está diseñado para inhibir que esto suceda. Por ejemplo, en la realización ilustrada, la inserción 130 (y especialmente, el soporte 132) se puede configurar para sujetar el recipiente 120 fuera de la parte cónica 146 del bastidor 102, de forma que se mantenga al menos una superficie del área seccional transversal mínima alrededor del recipiente 120 en cualquier orientación del indicador 100 de esterilización biológico antes de la activación. Por ejemplo, en la realización ilustrada en las Figs. 4-8, incluso si el indicador 100 de esterilización biológico está apuntado verticalmente hacia abajo, el recipiente 120 puede dejar de estar en contacto con la inserción 130, pero no en orientación, se mueve el recipiente 120 más cerca a la parte cónica 146, o las esporas 115 hasta la activación del indicador 100 de esterilización biológico. Además, hasta la activación, se puede mantener al menos una separación mínima (y especialmente, una superficie del área seccional transversal de esta separación) entre el recipiente 120 y el bastidor 102 y/o la inserción 130 para proporcionar una ruta 164 del esterilizante prácticamente constante, por ejemplo, alrededor del recipiente 120, a través de la primera ruta 160 de fluido y al interior de la segunda cámara 111.

En algunas realizaciones, el dimensionamiento y la colocación relativos de los componentes del indicador 100 de esterilización biológico se pueden configurar de forma que, antes de la activación, el recipiente 120 se mantenga intacto en una ubicación prácticamente coherente en el indicador 100 de esterilización biológico. Dicha configuración puede proporcionar una ruta 164 del esterilizante prácticamente constante y puede mantener el recipiente 120 en una posición tal que el recipiente 120 no pueda moverse sustancialmente, si es que puede, en el indicador 100 de esterilización biológico antes de la activación.

En algunas realizaciones, al menos una parte de la inserción 130 se puede adaptar para permitir que el recipiente 120 se desplace en el bastidor 102, p. ej., longitudinalmente con respecto al bastidor 102, entre una primera posición (longitudinal) en la que el recipiente 120 está intacto y una segunda posición (longitudinal) en la que al menos una parte

del recipiente 120 está fracturada. A modo de ejemplo, únicamente, la inserción 130 puede incluir uno o más salientes o brazos 158 (dos proyecciones 158 separadas alrededor del recipiente 120 se muestran solamente como ejemplo) adaptados para sujetar y soportar el recipiente 120 antes de la activación y dejar que el recipiente 120 se desplace en el bastidor 102 durante la activación, por ejemplo, cuando la segunda parte 106 se desplaza con respecto a la primera parte 104 del bastidor 102. Las proyecciones 158 también pueden estar adaptadas (p. ej., conformadas y/o colocadas) para fracturar el recipiente 120 de una forma deseada cuando el indicador de esterilización biológico se activa. Como resultado, la inserción 130 puede funcionar algunas veces para sujetar el recipiente 120 intacto antes de la activación, y puede funcionar para romper el recipiente 120 durante la activación. Como resultado, la inserción 130, o una parte de la misma, puede denominarse a veces como “soporte” (p. ej., el soporte 132) y/o como “rompedor”.

Únicamente a modo de ejemplo, las proyecciones 158 se muestran en las Figs. 4 y 6-10 como acopladas a una base o soporte 127 adaptado para estar en contacto con la pared 118 de separación. Por ejemplo, la base 127 se puede dimensionar para alojarse en el depósito 103 y dimensionarse para asentarse en la parte superior, estar en contacto o cooperar de otra forma o acoplarse con la pared 118 de separación. Dicho acoplamiento con una estructura interna del indicador 100 de esterilización biológico puede proporcionar la resistencia y fuerza necesarias para romper el recipiente 120 cuando se desee. En algunas realizaciones, sin embargo, la inserción 130 no incluye la base 127, y las proyecciones 158 pueden estar acopladas o conformar una parte del bastidor 102. En algunas realizaciones, la inserción 130 está íntegramente formada con, o proporcionada por, el bastidor 102.

Como se muestra, la inserción 130 puede incluir además una pared lateral 131 que conecta con las proyecciones 158 y está conformada para acomodar una superficie interior del bastidor 102 y/o una superficie exterior del recipiente 120. Dicha pared lateral 131 puede proporcionar soporte y rigidez a las proyecciones 158 para ayudar a romper fiablemente el recipiente 120 de una manera coherente. La pared lateral 131 puede tener también una forma y dimensiones para guiar el recipiente 120 de la manera deseada a medida que se desplaza en el bastidor 102 durante la activación, por ejemplo, para poner las proyecciones 158 en contacto en la forma deseada para fracturar el recipiente 120 de forma fiable. La pared lateral 131 y/o la pared 108 del bastidor 102 (o una superficie interior de la misma) también se puede conformar para definir al menos una parte de la segunda ruta 162 de fluido del indicador 100 de esterilización biológico, por ejemplo, entre una superficie interior de la inserción 130 y una superficie interior del bastidor 102. Por ejemplo, en algunas realizaciones, como se muestra en las Figs. 4-5, 8 y 9, la pared lateral 131 de la inserción 130 puede incluir un canal (o ranura, cavidad, o similares) 169 configurado para formar al menos una parte de la segunda ruta 162 de fluido.

La segunda ruta 162 de fluido puede funcionar como un “venteo interno” o un “canal de venteo” dentro del indicador 100 de esterilización biológico para permitir escapar el gas (p. ej., gas desplazado, tal como el aire que ha quedado atrapado en la segunda cámara 111 (p. ej., cerca del extremo cerrado 105 del indicador 100 de esterilización biológico) de la segunda cámara 111 del indicador 100 de esterilización biológico. En algunas realizaciones, la segunda ruta 162 de fluido puede proporcionar un escape, o venteo interno, para un gas presente en la segunda cámara 111 durante la activación para facilitar el desplazamiento del líquido 122 al interior de la segunda cámara 111 desde la primera cámara 109 a medida que se libera del recipiente 120. De forma adicional o alternativa, en algunas realizaciones, la segunda ruta 162 de fluido puede proporcionar un escape, o venteo interno, para un gas presente en la segunda cámara 111 durante la esterilización para facilitar el desplazamiento de un esterilizante al interior de la segunda cámara 111 del indicador 100 de esterilización biológico y a las esporas 115, con una penetración más eficaz del esterilizante al interior de la segunda cámara 111.

Únicamente a modo de ejemplo, como se muestra en las Figs. 5 y 10, la segunda ruta 162 de fluido puede estar al menos parcialmente definida tanto por una parte de la inserción 130 (p. ej., el canal 169) como por un canal (o ranura, cavidad, o similar) 163 formado en la pared 108 de bastidor 102 (p. ej., en una superficie interior de la pared 108). Sin embargo, deberá entenderse que, en algunas realizaciones, la segunda ruta 162 de fluido puede estar formada completamente por el bastidor 102 o por diferentes combinaciones de otros componentes del indicador 100 de esterilización biológico de tal forma que la segunda ruta 162 de fluido proporciona conexión de fluidos entre la segunda cámara interna 111 y otra parte interna del indicador 100 de esterilización biológico. Por ejemplo, la segunda ruta 162 de fluido no tiene que estar formada a la vez por el bastidor 102 y la inserción 130, sino que puede estar formada por uno de estos componentes, u otros componentes. Además, como se muestra en las Figs. 5 y 10, el canal 163 que define al menos una parte de la segunda ruta 162 de fluido se moldea en una superficie exterior y una superficie interior del bastidor 102, de tal manera que el canal 163 sea visible dentro y fuera del bastidor 102. Sin embargo, la superficie exterior del bastidor 102 no tiene que incluir dicha forma y, en su lugar, en algunas realizaciones, la superficie exterior del bastidor 102 puede permanecer prácticamente uniforme o inalterada, y la superficie interior del bastidor 102 (p. ej., una pared 108 de bastidor 102) puede incluir el canal 163.

Además, en algunas realizaciones, ni la inserción 130 ni el bastidor 102 incluye el canal 169 o el canal 163, respectivamente, sino en su lugar, la inserción 130 y el bastidor 102 están conformados y dimensionados de forma que se proporciona un espacio o hueco entre la inserción 130 y el bastidor 102 que está en comunicación de fluidos con la segunda cámara 111, y dicho espacio o hueco funciona como la segunda ruta 162 de fluido.

Como se muestra adicionalmente en las Figs. 7 y 9, en algunas realizaciones, la primera ruta 160 de fluido y/o la segunda ruta 162 de fluido pueden estar al menos parcialmente definidas por una o más paredes 118, el sustrato



119, la inserción 130, y el bastidor 102. Además, al menos una de la primera ruta 160 de fluido y la segunda ruta 162 de fluido se pueden definir al menos parcialmente mediante el soporte 135 de esporas, o una parte del mismo.

5 En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir los siguientes componentes dispuestos en el siguiente orden cuando el recipiente 120 está en un primer estado sin fracturar: el extremo cerrado 105 del bastidor 102 del indicador 100 de esterilización biológico, la segunda cámara 111, el sustrato 119, la inserción 130, la primera cámara 109, el recipiente 120, el extremo abierto 101 del bastidor 102 (o la segunda parte 106 del bastidor 102).

10 Como se muestra en la realización ilustrada, la segunda ruta 162 de fluido permite que la segunda cámara 111 se ventile hacia otra parte del indicador 100 de esterilización biológico, tal como la primera cámara 109. En algunas realizaciones, la segunda ruta 162 de fluido puede salir de la segunda cámara 111 en una posición situada por encima (p. ej., verticalmente encima) de la posición en la que la primera ruta 160 de fluido entra en la segunda cámara 111, especialmente, en realizaciones en las que la segunda ruta 162 de fluido ventila la segunda cámara 111 de retorno a la primera cámara 109. Dicho de otro modo, en algunas realizaciones, la segunda ruta 162 de fluido puede extenderse desde la segunda cámara 111 hasta una posición (p. ej., un cuarto nivel L<sub>4</sub>, descrito a continuación) en el indicador 100 de esterilización biológico que está por encima de la posición (p. ej., un primer nivel L<sub>1</sub> o un segundo nivel L<sub>2</sub>, descrito a continuación) en la cual la primera ruta 160 de fluido entra en la segunda cámara 111. Además, en algunas realizaciones, la posición en la que la segunda ruta 162 de fluido entra en la primera cámara 109 puede estar situada por encima (p. ej., verticalmente por encima) de la posición en la cual la primera ruta 160 de fluido entra en la segunda cámara 111.

20 En algunas realizaciones, la primera ruta 160 de fluido se puede colocar para acoplar de forma fluida la segunda cámara 111 con una parte proximal del indicador 100 de esterilización biológico (p. ej., una parte de la primera cámara 109 que está situada proximal o adyacente a la segunda cámara 111, p. ej., en el primer nivel L<sub>1</sub> y/o el segundo nivel L<sub>2</sub>), y la segunda ruta 162 de fluido se puede situar para acoplar de forma fluida la segunda cámara 111 con un parte distal del indicador 100 de esterilización biológico (es decir, una parte de la primera cámara 109 que se sitúa más allá de la segunda cámara 111, p. ej., a un tercer nivel L<sub>3</sub>, descrito más adelante, y/o el cuarto nivel L<sub>4</sub>). Como resultado, la posición en la que la segunda ruta 162 de fluido entra en la primera cámara 109 puede colocarse más lejos de la segunda cámara 111 que la posición a la cual la primera ruta 160 de fluido entra en la segunda cámara 111.

30 Más específicamente y únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las Figs. 7 y 9, en algunas realizaciones, el fluido puede entrar en la segunda cámara 111 en diversas posiciones, tales como al primer nivel, altura, o posición (p. ej., posición longitudinal) L<sub>1</sub> situada por lo general en la parte delantera de la inserción 130, el sustrato 119, el bastidor 102, y/o la segunda cámara 111, así como en el segundo nivel, altura, o posición (p. ej., posición longitudinal) L<sub>2</sub> situada aproximadamente al nivel de la abertura 121 en el sustrato 119. Como se ha descrito anteriormente, debe entenderse que las diversas aberturas y espacios entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 que permiten que el fluido se desplace al interior de la segunda cámara 111 pueden denominarse en su conjunto como la primera ruta 160 de fluido. Como se ilustra además en la Fig. 7, en algunas realizaciones, el gas (p. ej., el gas desplazado) puede salir de la segunda cámara 111 a través de la segunda ruta 162 de fluido (es decir, a medida que el fluido se desplaza al interior de la segunda cámara 111 mediante la primera ruta 160 de fluido) al tercer nivel, altura, o posición (p. ej., posición longitudinal) L<sub>3</sub> situada generalmente en la parte posterior de la inserción 130, el sustrato 119, el bastidor 102, y/o la segunda cámara 111.

45 En la orientación verticalmente ascendente del indicador 100 de esterilización biológico mostrado en las Figs. 7 y 9, el tercer nivel L<sub>3</sub> está situado en o por encima tanto del primer nivel L<sub>1</sub> como del segundo nivel L<sub>2</sub>. Además, en algunas realizaciones, el tercer nivel L<sub>3</sub> puede seguir estando situado en o por encima del primer nivel L<sub>1</sub> y del segundo nivel L<sub>2</sub> durante el funcionamiento del indicador 100 de esterilización biológico (p. ej., cuando está asentado en un pocillo de un aparato de lectura, durante la esterilización, y/o durante la activación). Esto es, en algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede inclinarse durante el funcionamiento (p. ej., hacia la izquierda de la Fig. 7 o 9, hacia la derecha de la Fig. 4 o 6, hacia el interior de la página de la Fig. 4 o 6, y/o hacia el exterior de la página de la Fig. 7 o 9).

50 Los niveles primero, segundo y tercero L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, y L<sub>3</sub> se muestran únicamente a modo de ejemplo; sin embargo, debe entenderse que la ubicación exacta en la cual la primera ruta 160 de fluido entra en la segunda cámara 111 y/o la ubicación exacta en la cual la segunda ruta 162 de fluido sale de la segunda cámara 111 puede ser diferente a la que se ilustra en las Figs. 7 y 9.

55 Como se muestra en las Figs. 7 y 9, la segunda ruta 162 de fluido se define al menos parcialmente por el canal 169 de la inserción 130 y/o el canal 163 del bastidor 102, que generalmente se denominará "canal" en el resto de la descripción, que puede interpretarse para referirse a al menos una parte del canal 163 y/o el canal 169 de la realización ilustrada. En la realización ilustrada, el canal tiene una entrada que puede describirse como situada en cualquier punto de la segunda cámara 111, o en el tercer nivel L<sub>3</sub>, y una salida que se coloca generalmente en el cuarto nivel, altura, o posición (p. ej., posición longitudinal) L<sub>4</sub>. Como se muestra en las Figs. 7 y 9, la posición de salida del canal (es decir, el cuarto nivel L<sub>4</sub>) está situada generalmente por encima de la posición en la cual la primera ruta 160 de fluido conecta con la segunda cámara 111 (es decir, el primer nivel L<sub>1</sub> y/o el segundo nivel L<sub>2</sub>), por ejemplo, durante el funcionamiento del indicador 100 de esterilización biológica.

65 Dicho de otra forma, la primera ruta 160 de fluido puede situarse para acoplar de forma fluida el segundo extremo 113 (inferior) de la primera cámara 109 con el primer extremo 124 (superior) de la segunda cámara 111. La

segunda ruta 162 de fluido, por otro lado, puede colocarse para acoplar de forma fluida la segunda cámara 111 (p. ej., el primer extremo 124 (superior) de la segunda cámara 111) a una parte superior (p. ej., el primer extremo 112 (superior)) 109 de la primera cámara.

5 Además, en algunas realizaciones, la posición o el nivel al cual la segunda ruta 162 de fluido (o canal) se conecta con la segunda cámara 111 puede describirse como situada en parte de la segunda cámara 111 que es la última que se llena con el líquido 122 cuando el recipiente 120 está en su segundo estado fracturado.

10 En algunas realizaciones, cuando el recipiente está en el segundo estado 120 fracturado, y la segunda cámara 111 está al menos parcialmente llena de líquido 122, el líquido 122 puede tener un nivel, altura o posición (p. ej., posición longitudinal) L, y la segunda ruta 162 de fluido puede extenderse entre una posición por debajo del nivel L y una posición por encima del nivel L. Como resultado, a medida que la segunda cámara 111 se llena con el líquido 122 cuando el recipiente está en el segundo estado, la segunda cámara 111 puede ventilarse continuamente mediante la segunda ruta 162 de fluido.

15 En algunas realizaciones, la primera ruta 160 de fluido puede actuar como la primera o principal ruta de comunicación de fluidos entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111, y la segunda ruta 162 de fluido puede servir como ruta de comunicación de fluidos auxiliar o secundaria entre la segunda cámara 111 y la primera cámara 109 (p. ej., cuando la segunda ruta 162 de fluido sale a la primera cámara 109 y no a otra parte del indicador 100 de esterilización biológico). En algunas realizaciones, el espacio, volumen y/o área común de la segunda ruta 162 de fluido puede ser sustancialmente inferior a la de la primera ruta 160 de fluido. En algunas realizaciones, al menos una parte de la primera ruta 160 de fluido y la segunda ruta 162 de fluido se pueden describir como sustancialmente aisladas entre sí o como sustancialmente paralelas y no intersecantes. En algunas realizaciones, cada una de la primera ruta 160 de fluido y la segunda ruta 162 de fluido puede extenderse sustancialmente en sentido longitudinal (p. ej., sustancialmente paralelas a la dirección longitudinal D<sub>L</sub>) entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111.

25 Es decir, por lo general, el indicador 100 de esterilización biológico que incluye (1) una primera ruta de fluido, tal como la primera ruta 160 de fluido, configurada para recibir al menos una mayoría del desplazamiento del fluido desde la primera cámara 109 hasta la segunda cámara 111, y (2) una segunda ruta de fluido, tal como la segunda ruta 162 de fluido, configurada para ventilar gas desde la segunda cámara 111 tendría ventajas respecto a un indicador 100 de esterilización biológico que incluye únicamente tanto una cámara interna, como únicamente una ruta de fluido que conecta la primera cámara 109 y la segunda cámara 111, de modo que el gas tiene que salir de la segunda cámara 111 a través de la misma ruta de fluido que el líquido que entra en la segunda cámara 111.

35 Al configurar la primera ruta 160 de fluido y la segunda ruta 162 de fluido como se muestra en la realización ilustrada, en algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede eliminar al menos parcialmente cualquier efecto de bloqueo del aire que se pueda producir como resultado de intentar desplazar un esterilizante y/o el líquido 122 al interior de la segunda cámara 111. Además, en algunas realizaciones, la segunda ruta 162 de fluido puede permitir que el indicador 100 de esterilización biológico se active, y que el líquido 122 se desplace al interior de la segunda cámara 111 por gravedad, mientras el indicador 100 de esterilización biológico queda en la misma orientación (p. ej., orientación sustancialmente vertical ascendente, como se muestra en las Figs. 4-5, 7 y 9), sin necesidad de que el indicador 100 de esterilización biológico apunte hacia abajo, u otra reorientación, para desplazar el líquido 122 al interior de la segunda cámara 111.

45 Con referencia continuada a la inserción 130, los salientes 158 de la inserción 130 se ilustran como relativamente rígidos o inmóviles. Esto es, en algunas realizaciones, es posible que las proyecciones 158 no estén adaptadas para prácticamente flexar, distorsionarse, deformarse u orientarse hacia el recipiente 120 a medida que se desplaza en el bastidor 102. En su lugar, en algunas realizaciones, como se muestra en las Figs. 4-7 y 9, cada una de las proyecciones 158 puede configurarse para tener un extremo superior 159 en cuya parte superior se puede colocar el recipiente 120 y mantenerse intacto antes de la activación. Como se muestra en la Figs. 4-5 y 7, en algunas realizaciones, las proyecciones 158 se pueden colocar para fracturar el recipiente 120 en su extremo radial, por ejemplo, cuando se utiliza un recipiente 120 ovalado o en forma de cápsula.

50 Una ventaja potencial de disponer las proyecciones 158 formando al menos una parte del soporte 132 es que la parte inferior del recipiente 120 puede quedar sin restricciones cuando el recipiente 120 se fractura, de forma que el líquido 122 se puede liberar desde el recipiente 120 y desplazarse hacia las esporas 115 con relativa facilidad y fiabilidad.

55 En dichas realizaciones, la inserción 130 se puede usar para fracturar el recipiente 120 en una dirección que sea prácticamente perpendicular a un lado plano del recipiente 120, por ejemplo, cuando se utiliza un recipiente 120 ovalado o en forma de cápsula. En dichas realizaciones, la fracturación del recipiente 120 a lo largo de su lado se puede conseguir a la vez que se mantienen algunos espacios abiertos alrededor del extremo inferior del recipiente 120 para facilitar el desplazamiento del líquido 122 desde el recipiente 120 hasta la proximidad de las esporas 115 cuando el recipiente 120 está fracturado.

60 Como se ha indicado anteriormente, las proyecciones 158 se pueden adaptar para fracturar el recipiente 120 a medida que el recipiente 120 se desplaza con respecto al bastidor 102 (p. ej., a lo largo de la dirección

65

longitudinal  $D_L$ ), por ejemplo, en respuesta a la segunda parte 106 del bastidor 102 que se desplaza con respecto a la primera parte 104 del bastidor 102 (p. ej., desde la primera posición 148 a la segunda posición 150).

En algunas realizaciones, las proyecciones 158 pueden incluir uno o más bordes (p. ej., bordes cónicos) o puntas o bien se configuran de otra forma para concentrar la fuerza de aplastamiento para aumentar la presión sobre el recipiente 120 en las regiones adyacentes a las proyecciones 158, y para facilitar la fractura del recipiente 120 más fácilmente y en una o más regiones deseadas. En algunas realizaciones, dicha concentración de fuerza puede reducir el esfuerzo o fuerza total necesaria para desplazar la segunda parte 106 con respecto a la primera parte 104 y para fracturar el recipiente 120 (o una parte del mismo).

Como se muestra en las Figs. 4-7 y 9, las proyecciones 158 están íntegramente formadas con la base 127 de la inserción 130; sin embargo, deberá entenderse que las proyecciones 158 pueden en su lugar estar íntegramente formadas con la pared 108 del bastidor 102. Además, en algunas realizaciones, las proyecciones 158 se pueden acoplar con el bastidor 102, o las proyecciones 158 y la base 127 se puede proporcionar mediante inserciones separadas. En dichas realizaciones, cada una de las proyecciones 158 puede ser una inserción separada, o se pueden proporcionar múltiples proyecciones 158 mediante una o más inserciones. Además, la inserción 130 se puede configurar para contactar la pared 118 para inhibir el desplazamiento de la primera parte la inserción 130 en la proximidad de las esporas 115 (p. ej., la parte inferior 114 del bastidor 102).

Además, en algunas realizaciones, como se muestra en las Figs. 4-7 y 9, las proyecciones 158 pueden extenderse una distancia a lo largo de la dirección longitudinal  $D_L$ , y la longitud y/o el espesor (p. ej., que puede variar a lo largo de la longitud) de las proyecciones 158 se puede adaptar para controlar la fractura del recipiente 120 en una posición deseada del bastidor 102 y de una forma deseada. La configuración de las proyecciones 158 se muestra en las Figs. 4-10 únicamente a modo de ejemplo.

En general, cada una de las proyecciones 158 se muestra a modo de ejemplo únicamente con un espesor creciente (p. ej., orientadas hacia el interior del recipiente 120 o centro del bastidor 102) a lo largo de la dirección longitudinal  $D_L$  hacia las esporas 115. Dicha configuración puede disminuir la superficie del área seccional transversal que está disponible para el recipiente 120, a medida que el recipiente 120 se desplaza hacia las esporas 115, por ejemplo, en respuesta a la segunda parte 106 que se desplaza hasta la segunda posición 150.

Adicionalmente, el indicador 100 de esterilización biológico se muestra en las Figs. 3-10 incluidas dos proyecciones 158 y una pared lateral 131 únicamente a modo de ejemplo, pero debería entenderse que se puede emplear una proyección 158 o tantas como sea estructuralmente posible, y otras configuraciones. Además, las proyecciones 158 pueden estar conformadas y dimensionadas según se desee, dependiendo de la forma y dimensiones del bastidor 102, de la forma y dimensiones del recipiente 120, de la forma y dimensiones de la inserción 130, y/o de la manera y posición deseada para fracturar el recipiente 120.

Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, al menos una parte del bastidor 102 puede estar ahusada (véase, p. ej., la parte cónica 146 en la Fig. 6). Como resultado, la superficie del área seccional transversal del bastidor 102 puede disminuir generalmente a lo largo de la dirección longitudinal  $D_L$ . Sin embargo, se deberá entender que las dimensiones internas del bastidor 102 pueden disminuir generalmente en la parte cónica a lo largo de la dirección longitudinal  $D_L$  sin alterar las dimensiones exteriores del bastidor 102. En algunas realizaciones, las dimensiones exteriores del bastidor 102 pueden ser uniformes a lo largo de su longitud, incluso aunque la parte interior del bastidor 102 esté ahusada a lo largo de su longitud. En algunas realizaciones, la una o más proyecciones 158 solas pueden variar en espesor (es decir, hacia el recipiente 120, p. ej., en una dirección radial) a lo largo de la dirección longitudinal  $D_L$ , de forma que la superficie del área seccional transversal disponible para el recipiente 120 disminuya generalmente a medida que el recipiente 120 se desplace en el bastidor 102 durante la activación, incluso aunque las dimensiones del bastidor 102 no cambien (p. ej., incluso si el bastidor 102 no incluye ninguna parte cónica 146, tanto interna como externamente).

Como se muestra en las Figs. 4-10, el extremo superior 159 de cada una de las proyecciones 158 incluye una superficie redondeada, curvada o arqueada, que puede facilitar el desplazamiento del recipiente 120 desde la primera posición 148 en la que el recipiente 120 se asienta al menos parcialmente encima del extremo superior 159 de la proyección 158 hasta una posición en la que el recipiente 120 está forzado, al menos parcialmente, al interior de la región del área seccional transversal más pequeña entre las proyecciones 158 (o entre la pared 108 del bastidor 102 y una o más proyecciones 158). Además, el extremo superior 159 redondeado puede inhibir la rotura prematura del recipiente 120, lo que puede inhibir la activación prematura del indicador 100 de esterilización biológico (es decir, la liberación prematura del líquido 122).

En algunas realizaciones, como se muestra en la Fig. 6, la inserción 130 se puede dimensionar y conformar para permitir que el recipiente 120 se mantenga por encima de las proyecciones 158 y fuera de la región adyacente a cualquier parte de una superficie orientada hacia el interior de una o más de las proyecciones 158 para inhibir la activación prematura o accidental del indicador 100 de esterilización biológico. Dicha configuración puede inhibir también la rotura inadvertida debido a un choque o expansión del material (p. ej., debido a la exposición a calor durante un proceso de esterilización).

- El soporte 132, que puede estar formado al menos parcialmente por los extremos superiores 159 de las proyecciones 158, puede configurarse para sostener una parte inferior del recipiente 120, y las proyecciones 158 se pueden colocar para fracturar el recipiente 120 en una posición cerca de la parte inferior del recipiente 120 cuando se coloca en el bastidor 102. Dicha configuración puede permitir que el recipiente 120 se rompa cerca de su parte inferior y pueda facilitar la retirada del líquido 122 desde el recipiente 120, lo que puede potenciar la disponibilidad del líquido 122 a las esporas 115, y puede potenciar la fiabilidad de liberar el líquido 122 en comunicación de fluidos con las esporas 115 (p. ej., con el depósito 136 de esporas). Dicha configuración se muestra, solamente como ejemplo, sin embargo, y se deberá entender que las proyecciones 158 se pueden configurar y colocar para fracturar el recipiente 120 en cualquier forma deseada.
- Algunas realizaciones de la presente descripción proporcionan una rotura óptima y segura de un recipiente frangible 120 con relativamente poca fuerza, potenciando a la vez la transferencia de líquido 122 a la región de esporas (p. ej., la segunda cámara 111 del bastidor 102) del indicador 100 de esterilización biológico, y/o potenciando el confinamiento del líquido 122 en la región de las esporas del indicador 100 de esterilización biológico. Además, algunas realizaciones de la presente descripción operan para impulsar un líquido hasta una zona determinada del indicador 100 de esterilización biológico, tal como una cámara de detección (p. ej., la segunda cámara 111) del indicador 100 de esterilización biológico.
- En la realización ilustrada en las Figs. 4-10, la inserción 130 se ilustra incluyendo dos proyecciones 158 que están separadas aproximadamente igual entre sí alrededor del recipiente 120 y/o alrededor de la pared lateral 131. Sin embargo, en algunas realizaciones, la pared lateral 131 puede incluir una proyección sólida 158 (p. ej., prácticamente anular o semianular) que se extiende radialmente hacia el interior desde la pared lateral 131. Adicionalmente, en algunas realizaciones, la pared lateral 131 se puede extender más allá alrededor de la superficie interior del bastidor 102 de lo que se ilustra. Sin embargo, el uso de una o más proyecciones 158 más estrechas (p. ej., en una dimensión angular), tal como la mostrada en las Figs. 4-10, puede proporcionar una ruta 164 del esterilizante prácticamente constante o prácticamente sin obstáculos alrededor del recipiente 120.
- Dependiendo de si la inserción 130 incluye una o más proyecciones 158 o paredes laterales 131, la inserción 130 puede configurarse para sujetar el recipiente 120 en el bastidor 102 en una ubicación coherente para proporcionar una ruta 164 del esterilizante prácticamente constante durante la esterilización. Por ejemplo, en lugar de permitir que el recipiente 120 se desplace o gire alrededor (p. ej., radial y/o longitudinalmente) en el bastidor 102 antes de la activación (p. ej., durante la esterilización), la inserción 130 puede sujetar el recipiente 120 en una posición prácticamente coherente, lo que puede permitir que un esterilizante recorra una ruta prácticamente coherente y relativamente sin obstáculos entre una superficie exterior del recipiente 120 y una superficie interior del bastidor 102, con pocas o ningunas oportunidades de obstaculización inadvertida.
- Como se muestra en la realización ilustrada, la inserción 130 puede incluir además una o más proyecciones 161 colocadas prácticamente en horizontal o perpendicular con respecto a la dirección longitudinal  $D_L$  de un indicador de esterilización biológico (p. ej., cuando la inserción 130 está colocada en un indicador de esterilización biológico). Las proyecciones 161 pueden denominarse como “segundas proyecciones” o “proyecciones horizontales”, mientras que las proyecciones 158 usadas para sujetar y/o romper el recipiente 120 se pueden denominar como “primeras proyecciones” o “proyecciones verticales”. Las segundas proyecciones 161 no están inclinadas hacia abajo como la base 127. Como resultado, las segundas proyecciones 161 se pueden utilizar con varios fines. Por ejemplo, las segundas proyecciones 161 pueden estabilizar la inserción 130 (p. ej., ayudar a sujetar la inserción 130 en una posición deseada en el bastidor 102 del indicador 100 de esterilización biológico) bajo la fuerza de fractura del recipiente 120. Además, las segundas proyecciones 161 pueden funcionar para retener y/o recoger las partes fracturadas del recipiente 120 una vez que éste haya sido fracturado para inhibir el movimiento de dichas partes hacia la proximidad de las esporas del indicador de esterilización biológico, lo que podría afectar negativamente al crecimiento de las esporas y/o a la detección del crecimiento de las esporas. Se pueden emplear otras formas y configuraciones de las segundas proyecciones 161 que sigan permitiendo el movimiento de fluido hacia las esporas 115 inhibiendo a la vez el movimiento de sólidos hacia las esporas 115.
- En algunas realizaciones, la inserción 130 (p. ej., la base 127) se puede adaptar para uno o más de facilitar o permitir el movimiento del fluido (p. ej., el desplazamiento del líquido 122) al interior de la segunda cámara 111 (es decir, la parte inferior 114) del bastidor 102; minimizando el desplazamiento de las fracciones o partes (p. ej., sólidos) del recipiente fracturado 120 al interior de la segunda cámara 111 del bastidor 102, esto es, recoger y/o contener partes del recipiente fracturado 120; y/o minimizar la difusión de las esporas 115 y/o señales producidas por la segunda cámara 111 del bastidor 102. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la base 127 se puede configurar para funcionar como rejilla o filtro. En algunas realizaciones, el crecimiento de las esporas de determina por moléculas/indicadores fluorescentes (p. ej., fluoróforos) u otros marcadores. En algunas realizaciones, si el nivel de líquido después de la activación en el indicador 100 de esterilización biológico está por encima de la ubicación de las esporas 115, dichas moléculas o marcadores, o las esporas 115 mismas, pueden moverse o difundirse desde o lejos del depósito 136 de esporas y, potencialmente, fuera de la segunda cámara 111 del bastidor 102. Como resultado, partes del indicador 100 de esterilización biológico (p. ej., la inserción 130) se pueden configurar para inhibir la difusión indeseable de diferentes indicadores, moléculas, y/o marcadores fuera de la segunda cámara 111 del indicador 100 de esterilización biológico. En algunas realizaciones, como se ha descrito anteriormente, el sustrato 119 puede inhibir también dicha difusión indeseable.
- En la realización ilustrada en las Figs. 4-7, la base 127 de la inserción 130 tiene generalmente forma de U o de herradura e incluye una apertura central 177 (véase la Fig. 5) que facilita el desplazamiento del esterilizante hacia

las esporas 115 durante la esterilización y el desplazamiento del líquido 122 hacia las esporas 115 durante la activación. La forma de herradura de la base 127 puede aumentar la apertura entre la parte superior 116 (es decir, la primera cámara 109) y la parte inferior 114 (es decir, la segunda cámara 111) del bastidor 102; sin embargo, esta forma se muestra a modo de ejemplo solamente, y se pueden utilizar otras formas.

En algunas realizaciones, la inserción 130 se puede describir incluyendo una o más proyecciones 127 que se extienden verticalmente hacia abajo adaptadas para entrar en contacto o acoplarse de otra forma a la pared 118 u otra estructura interna del indicador 100 de esterilización biológico para proporcionar una base o soporte para la inserción 130, para inhibir el movimiento de la inserción 130 y el recipiente 120 respecto al bastidor 102 antes de la activación, y/o para proporcionar resistencia o fuerza para ayudar a romper el recipiente 120 durante la activación. Como resultado, en algunas realizaciones, la base 127 puede denominarse en su lugar como "terceras proyecciones" 127.

Como se muestra en la realización ilustrada, en algunas realizaciones, la inserción 130 se puede configurar para encontrarse totalmente en la primera cámara 109 del indicador 100 de esterilización biológico, de forma que la inserción 130 no se extiende al interior de la segunda cámara 111 donde podría interferir potencialmente con los procesos de cuestionamiento o detección. Adicionalmente, la inserción 130 se puede configurar para inhibir el movimiento de otras partes del indicador 100 de esterilización biológico (p. ej., el recipiente fracturado 120) al interior de la segunda cámara 111.

La inserción 130 de la realización ilustrada es generalmente simétrica respecto a una línea de simetría longitudinal central, de forma que hay dos primeras proyecciones idénticas 158, dos segundas proyecciones idénticas 161, y dos terceras proyecciones idénticas 127. Sin embargo, la inserción 130 no tiene que incluir ninguna línea de simetría, y las primeras proyecciones 158 no tienen que ser iguales entre sí, las segundas proyecciones 161 no tienen que ser iguales entre sí, y las terceras proyecciones 127 no tienen que ser iguales entre sí. La inserción 130, y las diferentes proyecciones 158, 161 y 127 se pueden dimensionar y colocar para controlar la ruta 164 del esterilizante, por ejemplo, para adaptar la tasa de destrucción/supervivencia del indicador 100 de esterilización biológico, para inhibir la fractura inadvertida del recipiente 120, para facilitar el desplazamiento del recipiente 120 en el bastidor 102, para engranar o encajar el bastidor 102, y/o para controlar la rotura del recipiente 120.

Únicamente a modo de ejemplo, la inserción 130 ilustrada se muestra como un dispositivo unitario que incluye al menos lo siguiente: medios para sujetar el recipiente 120 antes de la activación, para fracturar el recipiente 120 durante la activación; para permitir el movimiento del recipiente 120 en el bastidor 102; para proporcionar una ruta 164 del esterilizante prácticamente constante, para recoger y/o retener partes del recipiente fracturado 120 tras la activación (o inhibir al menos parcialmente el movimiento de las partes del recipiente fracturado 120 al interior de la segunda cámara 111 del bastidor 102); y/o para minimizar la difusión de las esporas 115 y/o señales procedentes de la segunda cámara 111 hacia la primera cámara 109 del bastidor 102 tras la activación. Sin embargo, se deberá entender que, en algunas realizaciones, la inserción 130 puede incluir múltiples partes que pueden no ser parte de un solo dispositivo unitario, y cada una de las partes se puede adaptar para realizar una o más de las funciones anteriores.

La inserción 130 se denomina una "inserción" porque, en la realización ilustrada, el dispositivo que realiza las funciones anteriores es un dispositivo que se puede insertar dentro del depósito 103 (y, especialmente, la primera cámara 109) del bastidor 102. Sin embargo, se deberá entender que, en su lugar, la inserción 130 se puede proporcionar mediante el bastidor 102 o por otro componente del indicador 100 de esterilización biológico y no tiene que ser necesariamente insertable en el interior del bastidor 102. El término "inserción" se describirá a lo largo de la presente memoria descriptiva por simplicidad, pero se debe entender que no se pretende que un término de este tipo sea limitante, y se apreciará que otras estructuras equivalentes que realicen una o más de las funciones anteriores se pueden usar en su lugar, o en combinación, con la inserción insertable 130. Adicionalmente, en la realización ilustrada, la inserción 130 se puede tanto insertar como extraerse del bastidor 102, y especialmente, dentro y fuera de la primera parte 104 (y la primera cámara 109) del bastidor 102. Sin embargo, se deberá entender que incluso si la inserción 130 es insertable en el interior del bastidor 102, la inserción 130 no tiene que ser extraíble del bastidor 102, sino en su lugar, se puede acoplar de forma fija a el bastidor 102 de una forma que inhiba la retirada de la inserción 130 del bastidor 102 tras colocar la inserción 130 en una ubicación deseada.

En algunas realizaciones, al menos una parte del bastidor 102, por ejemplo, la parte inferior 114 del bastidor 102, puede ser transparente a una longitud de onda de radiación electromagnética, o intervalo de longitudes de onda (p. ej., transparente a la luz visible cuando se utilizan métodos de detección óptica con luz visible), lo que pueden facilitar la detección del crecimiento de las esporas. Esto es, en algunas realizaciones, como se muestra en las Figs. 6, 7 y 9, al menos una parte del bastidor 102 puede incluir o formar una ventana 167 de detección.

Además, en algunas realizaciones, como se muestra en la Fig. 6, al menos una parte del bastidor 102, por ejemplo, la parte inferior 114 puede incluir una o más paredes planas 168. Dichas paredes planas 168 pueden facilitar la detección (p. ej., la detección óptica) del crecimiento de las esporas. Además, como se ha mostrado y descrito anteriormente, la pared 108 de la primera parte 104 del bastidor 102 puede incluir una o más regiones escalonadas o ahusadas, tales como el escalón 152, el escalón 123, y una pared ahusada, o escalón, 170. La pared cónica 170 puede funcionar para reducir el espesor y tamaño totales de la parte inferior, o parte de detección, 114 del bastidor 102, de forma que las dimensiones exteriores del bastidor 102 se reducen junto con las dimensiones internas. Dicha reducción en el tamaño y/o espesor de la

parte inferior 114 del indicador 100 de esterilización biológico puede facilitar la detección. Además, tener una o más características, tales como los escalones y/o las paredes cónicas 123, 152, 170 puede permitir que el indicador 100 de esterilización biológico se acople a un lector o dispositivo de detección únicamente en una orientación, de forma que el indicador 100 de esterilización biológico está “enclavado” con respecto a un aparato de lectura, lo que puede minimizar errores por parte del usuario y mejorar la fiabilidad de un proceso de detección. En algunas realizaciones, una o más partes del indicador 100 de esterilización biológico pueden estar enclavadas con respecto a un aparato de lectura.

El indicador de esterilización biológico de la presente descripción generalmente mantiene el líquido 122 y las esporas 115 separados pero en una proximidad relativa (p. ej., dentro del indicador 100 de esterilización biológico autocontenido) durante la esterilización, de forma que el líquido 122 y las esporas 115 se puedan combinar fácilmente tras la exposición a un proceso de esterilización. El líquido 122 y las esporas 115 se pueden incubar durante un proceso de detección (p. ej., el aparato 12 de lectura puede incubar el indicador 100 de esterilización biológico), o el indicador 100 de esterilización biológico se puede incubar antes de un proceso de detección. En algunas realizaciones, cuando las esporas se incuban con el líquido 122, se puede usar una temperatura de incubación por encima de la temperatura ambiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la temperatura de incubación es de al menos aproximadamente 37 °C, en algunas realizaciones, la temperatura de incubación es al menos aproximadamente 50 °C (p. ej., 56 °C) y, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 60 °C. En algunas realizaciones, la temperatura de incubación no es superior a aproximadamente 60 °C, en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 50 °C, y en algunas realizaciones, no superior a aproximadamente 40 °C.

Un proceso de detección se puede adaptar para detectar un cambio detectable en las esporas 115 (p. ej., del interior del depósito 136 de esporas) o el líquido 122 que rodea las esporas 115. Esto es, un proceso de detección se puede adaptar para detectar una variedad de características, que incluyen, aunque no de forma limitativa, radiación electromagnética (p. ej., en las bandas ultravioleta, visible, y/o infrarroja), fluorescente, luminiscente, dispersión de luz, propiedades electrónicas (p. ej., conductancia, impedancia, o similares, o combinaciones de las mismas), turbidez, absorción, espectroscopia Raman, elipsometría, o similares, o una combinación de los mismos. La detección de dichas características se puede llevar a cabo por uno o más de un fluorímetro, un espectrofotómetro, colorímetro o similar, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, tales como en realizaciones que miden fluorescencia, luz visible, etc., el cambio detectable se mide mediante la detección en una determinada longitud de onda concreta.

Las esporas y/o el líquido 122 se pueden adaptar (p. ej., etiquetar) para producir una o más de las características anteriores como resultado de una reacción bioquímica que sea un signo de la viabilidad de las esporas. Como resultado, ningún cambio detectable (p. ej., cuando se compara con una lectura inicial o de fondo) puede significar un proceso de esterilización eficaz, mientras que un cambio detectable puede significar un proceso de esterilización ineficaz. En algunas realizaciones, el cambio detectable puede incluir una velocidad a la que cambia una o más de las características anteriores (p. ej., aumento en la fluorescencia, disminución en la turbidez, etc.).

En algunas realizaciones, la viabilidad de las esporas se puede determinar aprovechando la actividad enzimática. Como se describe en Matner y col., patente US-5.073.488, titulada “Rapid Method for Determining Efficacy of a Sterilization Cycle and Rapid Read-out Biological Indicator”, las enzimas se pueden identificar para un tipo especial de espora en el que la enzima tiene características especialmente útiles que se pueden aprovechar para determinar la eficacia de un proceso de esterilización. Dichas características pueden incluir lo siguiente: (1) la enzima, cuando se somete a condiciones de esterilización que serían suficientes para disminuir una población de  $1 \times 10^6$  microorganismos de ensayo en aproximadamente 6 unidades logarítmicas (es decir, hasta una población de aproximadamente cero cuando se mide por falta de proliferación de los microorganismos de ensayo), tiene una actividad residual que es igual a la del “fondo” según se determina mediante reacción con un sistema enzima-sustrato; y (2) la enzima, cuando se somete a condiciones de esterilización suficientes solamente para disminuir la población de  $1 \times 10^6$  microorganismos de ensayo en al menos 1 unidad logarítmica, pero en menos de 6 unidades logarítmicas, tiene una actividad enzimática superior a la del “fondo” según se determina mediante reacción con un sistema enzima-sustrato. El sistema enzima-sustrato puede incluir una sustancia o mezcla de sustancias, sobre las que actúa la enzima para producir un producto modificado por la enzima detectable, tal como es evidente mediante un cambio detectable.

En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico se puede analizar de una forma monolateral, donde el indicador 100 de esterilización biológico incluye solamente una ventana de detección (p. ej., ventana 167 de detección de la Fig. 6) que está situada, por ejemplo, cerca de las esporas 115. En algunas realizaciones, sin embargo, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir más de una ventana de detección (p. ej., una ventana formada por todo o parte de ambas paredes paralelas 168 de la parte inferior 114 del bastidor 102), de forma que el indicador 100 de esterilización biológico se puede analizar mediante más de una ventana de detección. En realizaciones que utilizan múltiples ventanas de detección, las ventanas de detección se pueden colocar paralelas (análogamente a un modo monolateral), o las ventanas de detección se pueden orientar en un ángulo (p. ej. 90 grados, 180 grados, etc.) entre sí.

En general, las esporas 115 están situadas dentro del depósito 136 de esporas que está en comunicación de fluidos con el depósito 103. En algunas realizaciones, el depósito 136 de esporas forma una parte del depósito 103 (p. ej., una parte de la segunda cámara 111). Como se muestra en la Fig. 7, el depósito 103 está en comunicación de fluidos con el ambiente (p. ej., mediante la abertura 107) durante la esterilización para permitir al esterilizante entrar en el depósito 103 durante un proceso de esterilización para esterilizar las esporas 115. El recipiente 120 se puede

configurar para contener el líquido 122 durante la esterilización para inhibir que el líquido 122 esté en comunicación de fluidos con las esporas 115, el depósito 103, y el esterilizante durante la esterilización.

Se describirán ahora con mayor detalle las esporas 115 y/o el depósito 136 de esporas.

En algunas realizaciones, las esporas 115 se pueden colocar directamente en la parte inferior 114 del bastidor 102, o las esporas 115 se pueden colocar en un depósito de esporas, tal como el depósito 136 de esporas (p. ej., proporcionado por el soporte 135 de esporas). Aunque las esporas 115 se pueden colocar directamente en la parte inferior 114 del bastidor 102 o en un depósito de esporas, las esporas 115 se pueden proporcionar en una variedad de maneras. En algunas realizaciones, las esporas 115 pueden estar en suspensión de esporas que se introducen en una ubicación deseada del indicador 100 de esterilización biológico y se secan. En algunas realizaciones, las esporas 115 se pueden proporcionar sobre un sustrato (no mostrado) que se puede colocar y/o fijar en una ubicación deseada del indicador 100 de esterilización biológico. Algunas realizaciones pueden incluir una combinación de las esporas 115 proporcionadas en una forma desecada y esporas 115 proporcionadas sobre un sustrato.

En algunas realizaciones, el sustrato se puede colocar para soportar las esporas 115 y/o para ayudar a mantener las esporas 115 en un sitio deseado. Dicho sustrato puede incluir una variedad de materiales entre los que se incluyen, aunque no de forma limitativa, papel, un polímero (p. ej., cualquiera de los polímeros indicados anteriormente con respecto al bastidor 102), un adhesivo (p. ej., acrilato, caucho natural o sintético, silicona, silicona poliurea, isocianato, epoxi, o combinaciones de los mismos), una tela tejida, una tela no tejida, un material microporoso (p. ej., un material polimérico microporoso), un material reflectante (p. ej., una lámina metálica), un vidrio, una porcelana, una cerámica, un material formador de gel (p. ej., goma guar), o combinaciones de los mismos. Además, o de forma alternativa, dicho sustrato puede incluir o estar acoplado a un revestimiento hidrófilo con el fin de facilitar la puesta en contacto estrecho entre el líquido 122 con las esporas 115 (p. ej., cuando el líquido 122 utilizado es acuoso). Además, o de forma alternativa, dicho revestimiento hidrófilo se puede aplicar a cualquier ruta del fluido situada para acoplar de forma fluida el líquido 122 y las esporas 115. En algunas realizaciones, además de, o en lugar de un revestimiento hidrófilo, un revestimiento hidrófobo se puede aplicar a otras partes del bastidor 102 (p. ej., la parte inferior 114 del bastidor 102) y/o el depósito 136 de esporas, de forma que el líquido 122 se desplaza preferiblemente en contacto con las esporas 115.

Algunas realizaciones del indicador 100 de esterilización biológico no incluyen el soporte 135 de esporas. En su lugar, el depósito 136 de esporas se proporciona en la parte inferior 114 de la propia carcasa 102, y las esporas 115 se pueden colocar en la parte inferior 114, adsorberse en una superficie interior o pared de la parte inferior 114, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las esporas 115 se pueden proporcionar sobre un sustrato que se coloca en la parte inferior 114 del bastidor 102.

En algunas realizaciones, las esporas 115 se pueden colocar en un locus de esporas o en una pluralidad de loci de esporas, todos ellos se pueden colocar bien el depósito 103, en la parte inferior 114 del bastidor 102, y/o en el depósito 136 de esporas. En algunas realizaciones, disponer de múltiples loci de esporas puede maximizar la exposición de las esporas al esterilizante y al líquido 122, puede mejorar la fabricación (p. ej., la colocación de las esporas se puede facilitar introduciendo cada locus de esporas en una depresión dentro del indicador 100 de esterilización biológico), y puede mejorar las características de detección (p. ej., porque es posible que las esporas en medio de un locus de esporas más grande no se detecten con facilidad). En realizaciones que utilizan una pluralidad de loci de esporas, cada locus de esporas puede incluir un número de esporas conocido diferente, y/o cada locus de esporas puede incluir esporas diferentes, de forma que se puede analizar una pluralidad de tipos de esporas. Al emplear múltiples tipos de esporas, el indicador 100 de esterilización biológico se puede usar en una variedad de procesos de esterilización, y un locus de esporas específico se puede analizar en un proceso de esterilización determinado, o los múltiples tipos de esporas se pueden usar adicionalmente para analizar la eficacia, o confianza, de un proceso de esterilización.

Además, en algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir una pluralidad de depósitos 136 de esporas, y cada depósito 136 de esporas puede incluir uno o más loci de esporas 115. En algunas realizaciones que utilizan una pluralidad de depósitos 136 de esporas, la pluralidad de depósitos 136 de esporas se puede colocar en comunicación de fluidos con el depósito 103.

En algunas realizaciones, las esporas 115 pueden estar cubiertas con una cubierta (no se muestra) adaptada para encajar en o sobre las esporas 115 y/o el depósito 136 de esporas. Dicha cubierta puede ayudar a mantener las esporas dentro de la región deseada del indicador 100 de esterilización biológico durante la fabricación, esterilización y/o el uso. La cubierta, si se utiliza, puede estar formada por un material que no impida sustancialmente el proceso de detección, y/o que sea al menos parcialmente transparente a las longitudes de onda de la radiación electromagnética de interés. Además, dependiendo del material que conforme la cubierta, en algunas realizaciones, la cubierta puede facilitar la absorción del líquido 122 (p. ej., el medio nutriente) a lo largo de las esporas 115. En algunas realizaciones, la cubierta también puede incluir características para facilitar el flujo de fluido al interior del depósito 136 de esporas (o a las esporas 115), tales como canales capilares, fibras microporosas hidrófilas, o membranas, o similares, o una combinación de los mismos. Además, en algunas realizaciones, la cubierta puede aislar una señal, o potenciar la señal, lo que pueden facilitar la detección. Dicha cubierta se puede usar cuando las esporas 115 están colocadas dentro del depósito 136 de esporas o directamente en la parte inferior 114 del bastidor 102. Además, dicha cubierta se puede emplear en realizaciones que utilizan una pluralidad de loci de esporas. La cubierta puede incluir una variedad de materiales entre los que se incluyen, aunque no de

forma limitativa, papel, un polímero (p. ej., cualquiera de los polímeros indicados anteriormente con respecto al bastidor 102), un adhesivo (p. ej., acrilato, caucho natural o sintético, silicona, silicona poliurea, isocianato, epoxi, o combinaciones de los mismos), una tela tejida, una tela no tejida, un material microporoso (p. ej., un material polimérico microporoso), un vidrio, una porcelana, una cerámica, un material formador de gel (p. ej., goma guar), o combinaciones de los mismos.

5 En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además una superficie interior modificada, tal como una superficie reflectora, una superficie de color blanco, una superficie de color negro, u otra modificación de la superficie apta para optimizar las propiedades ópticas de la superficie. Una superficie reflectora (p. ej., proporcionada por una lámina metálica) se puede colocar para reflejar una señal enviada al interior del depósito 136 de esporas desde un dispositivo de ensayo o detección y/o para reflejar cualquier señal generada dentro del depósito 136 de esporas de vuelta hacia el dispositivo de ensayo. Como resultado, la superficie reflectora puede funcionar para mejorar (p. ej., mejorar la intensidad de) una señal procedente del indicador 100 de esterilización biológico. Dicha superficie reflectora se puede proporcionar mediante una superficie interior del bastidor 102; un material acoplado a la superficie interior del depósito 136 de esporas; o similares; o la superficie reflectora puede constituir una parte de o estar acoplada a un sustrato de esporas; o una combinación de los mismos.

20 Análogamente, en algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además una superficie de color blanco y/o negro colocada para aumentar y/o disminuir una señal concreta enviada al interior del depósito 136 de esporas desde un dispositivo de análisis y/o para aumentar y/o disminuir una señal concreta generada dentro del depósito 136 de esporas. A modo de ejemplo, únicamente, se puede usar una superficie de color blanco para potenciar una señal, y se puede usar una superficie de color negro para reducir una señal (p. ej., ruido).

25 En algunas realizaciones, las esporas 115 se pueden colocar sobre una superficie funcionalizada para estimular la inmovilización de las esporas 115 sobre la superficie deseada. Por ejemplo, dicha superficie funcionalizada se puede proporcionar como una superficie interior del bastidor 102, una superficie interior del depósito 136 de esporas, puede formar una parte o estar acoplada a un sustrato de esporas, o similar, o una combinación de los mismos.

30 En algunas realizaciones, las esporas 115 se colocan (p. ej., aplicadas mediante revestimiento u otro método de aplicación) sobre una superficie microestructurada o microreplicada (p. ej., dichas superficies microestructuradas son las descritas en Halverson y col., publicación PCT n.º WO 2007/070310, Hanschen y col., EE. UU. publicación n.º US-2003/0235677, y Graham y col., publicación PCT n.º WO 2004/000569). Por ejemplo, dicha superficie microestructurada se puede proporcionar como una superficie interior del bastidor 102, se puede proporcionar como una superficie interior del depósito 136 de esporas, puede formar una parte o estar acoplada a un sustrato de esporas, o similar, o una combinación de los mismos.

40 En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además un material formador de gel situado para combinarse con las esporas 115 y el líquido 122 cuando el líquido 122 se libera desde el recipiente 120. Por ejemplo, el material formador de gel se puede colocar cerca de las esporas 115 (p. ej., en el depósito 136 de esporas), en la parte inferior 114 del bastidor 102, puede conformar una parte o estar acoplado a un sustrato de esporas, o similares, o una combinación de los mismos. Dicho material formador de gel puede formar un gel (p. ej., un hidrogel) o una matriz que comprende las esporas y los nutrientes cuando el líquido 122 entra en contacto con las esporas. Un material formador de gel (p. ej., goma guar) puede ser especialmente útil porque tiene la capacidad para formar un gel tras la hidratación, puede ayudar a localizar una señal (p. ej., fluorescente), puede anclar las esporas 115 en su sitio, puede ayudar a minimizar la difusión de las esporas 115 y/o una señal desde el depósito 136 de esporas, y/o puede mejorar la detección.

50 En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico puede incluir además un absorbente o un material de tipo mecha. Por ejemplo, el material de tipo mecha se puede colocar cerca de las esporas 115 (p. ej., en el depósito 136 de esporas), puede formar al menos una parte de o estar acoplado a un sustrato de esporas, o similares, o una combinación de los mismos. Dicho material de tipo mecha puede incluir una almohadilla porosa de tipo mecha, una almohadilla absorbente, o similares, o una combinación de las mismas, para facilitar la puesta en contacto estrecho del líquido 122 con las esporas.

55 En algunas realizaciones, el recipiente frangible 120 se puede configurarse para facilitar la fractura del recipiente frangible 120 de una forma deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una parte inferior del recipiente frangible 120 puede estar formada por un material más delgado y/o débil, de manera que la parte inferior preferiblemente se fractura sobre otra parte del recipiente frangible 120. Además, en algunas realizaciones, el recipiente frangible 120 puede incluir una variedad de rasgos colocados para facilitar la fractura del recipiente frangible 120 de una forma deseada que incluye, aunque no de forma limitativa, una zona fina y/o debilitada, una línea de debilidad, una perforación, o similares, o combinaciones de los mismos.

60 El recipiente frangible 120 puede tener un primer estado cerrado en cual el líquido 122 está contenido dentro del recipiente frangible 120 y un segundo estado abierto en el que el recipiente frangible 120 se ha roto y el líquido 122 se ha liberado al interior del depósito 103 y/o el depósito 136 de esporas, y en comunicación de fluidos con las esporas 115.

65



En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico se puede activar (p. ej., la segunda parte 106 se puede desplazar a la segunda posición 150) manualmente. En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico se puede activar por el aparato de lectura (p. ej., si el indicador 100 de esterilización biológico se introduce en el aparato de lectura). En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico se puede activar con un dispositivo (p. ej., un dispositivo de activación) independiente de dicho aparato de lectura, por ejemplo, introduciendo el indicador 100 de esterilización biológico en el dispositivo antes de introducir el indicador 100 de esterilización biológico en un pocillo de un aparato de lectura. En algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico se puede activar mediante una combinación de dos o más del aparato de lectura, un dispositivo independiente del aparato de lectura, y activación manual.

Uno o ambos del indicador 100 de esterilización biológico y otro dispositivo, tal como un aparato de lectura, se puede configurar además para inhibir la fractura prematura o accidental del recipiente frangible 120. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico, dispositivo de activación, o aparato de lectura puede incluir un pestillo o mecanismo de bloqueo que se coloca para impedir que la segunda parte 106 del bastidor 102 se desplace a la segunda posición 150 hasta que se desee. En dichas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico no se puede activar hasta que el pestillo se mueve, retira o desbloquea. Además, o de forma alternativa, en algunas realizaciones, el indicador 100 de esterilización biológico, dispositivo de activación, y/o aparato de lectura puede incluir un pestillo o mecanismo de bloqueo que se coloca para impedir que la segunda parte 106 del bastidor 102 se desplace desde la segunda posición 150 de nuevo a la primera posición 148 después de la activación.

En algunas realizaciones, como se muestra en la realización ilustrada, al menos una parte del bastidor puede ser plana (p. ej., las paredes paralelas 168), y puede ser prácticamente plana con respecto al depósito 136 de esporas, y una o ambas de las paredes paralelas 168 o una parte de las mismas (p. ej., la ventana 167 de detección) puede estar dimensionada de tal forma que al menos una dimensión de la pared 168 (o ventana 167 de detección) corresponda sustancialmente con al menos una dimensión del depósito 136 de esporas y/o el locus de esporas 115. Dicho de otra forma, la pared 168 o parte de la misma (p. ej., la ventana 167 de detección) puede incluir una superficie del área seccional transversal que tiene prácticamente el mismo tamaño que el área seccional transversal del depósito 136 de esporas y/o el locus de esporas 115. Dicha correspondencia de tamaño entre la pared 168/ventana 167 de detección y el depósito 136 de esporas y/o el locus de esporas 115 puede maximizar la señal detectada durante un proceso de detección o análisis. De forma alternativa o adicional, la pared 168 o ventana 167 de detección se puede dimensionar para corresponder con el depósito 103 (p. ej., al menos una dimensión o las superficies del área seccional transversal pueden dimensionarse para corresponder). Dicha correspondencia de tamaño entre las zonas de detección puede mejorar el análisis y la detección de las esporas.

El indicador 100 de esterilización biológico ilustrado en las Figs. 4-10, al menos la parte del indicador 100 de esterilización biológico donde las esporas 115 están colocadas, es relativamente fino (es decir, la "dimensión z" está minimizada), de forma que una ruta óptica desde las esporas a la pared 168 (o ventana 167 de detección) está minimizada y/o cualquier efecto de sustancias interferentes del líquido 122 (o medio nutriente) está minimizado.

Durante el uso, el indicador 100 de esterilización biológico se puede colocar junto con un lote de esterilizante para un proceso de esterilización. Durante la esterilización, un esterilizante está en comunicación de fluidos con el depósito 103 (es decir, la primera cámara 109 y la segunda cámara 111), el depósito 136 de esporas, y las esporas 115 principalmente a través de la ruta 164 del esterilizante, de forma que el esterilizante puede alcanzar las esporas para producir esporas esterilizadas. Como se ha descrito anteriormente, la cooperación entre la primera ruta 160 de fluido y la segunda ruta 162 de fluido puede facilitar el desplazamiento del esterilizante 111 al interior de la segunda cámara y, en particular, al interior del extremo cerrado 105 del indicador 100 de esterilización biológico. Además, durante la esterilización, el recipiente frangible 120 está en un estado cerrado, mantenido al menos parcialmente intacto por el soporte 132 de la inserción 130. Cuando el recipiente frangible 120 está en un estado cerrado, el líquido 122 está protegido del esterilizante y no está en comunicación de fluidos con el depósito 103 (especialmente, el segundo depósito 111 formado al menos parcialmente por la parte inferior 114 del bastidor 102), el depósito 136 de esporas, las esporas 115, o la ruta 164 del esterilizante.

La esterilización puede incluir además desplazar un esterilizante de la primera cámara 109 a la segunda cámara 111 a través de la primera ruta 160 de fluido cuando el recipiente 120 está en el primer estado, y mover el gas desplazado (p. ej., el aire atrapado) fuera de la segunda cámara 111 a través de la segunda ruta 162 de fluido en respuesta a, o para facilitar, el desplazamiento del esterilizante desde la primera cámara 109 hasta la segunda cámara 111.

Tras la esterilización, la eficacia del proceso de esterilización puede determinarse usando el indicador 100 de esterilización biológico. La segunda parte 106 del bastidor 102 se puede desbloquear, si previamente estaba bloqueada en la primera posición 148 y desplazarse desde la primera posición 148 (véase la Fig. 6) a la segunda posición 150 (véase la Fig. 7) para producir la activación del indicador 100 de esterilización biológico. Dicho desplazamiento de la segunda parte 106 puede hacer que el recipiente frangible 120 se desplace en el bastidor 102, por ejemplo, a lo largo de la dirección longitudinal  $D_L$  desde una posición sobre los extremos superiores 159 de las proyecciones 158 hasta una posición en el interior de las proyecciones 158, lo que puede hacer que el recipiente frangible 120 se fracture. La fractura del recipiente frangible 120 puede cambiar el recipiente frangible 120 desde su estado cerrado a su estado abierto y liberar el líquido 122 al interior del depósito 103, y en comunicación de fluidos con el depósito 136 de esporas y las esporas 115. El líquido 122 puede ser tanto un medio nutriente (p. ej., medio de germinación) para las esporas, o

el líquido 122 puede ponerse en contacto con un medio nutriente en forma desecada (p. ej., en forma pulverulenta o de comprimido) para formar un medio nutriente, tal como formar una mezcla que incluye las esporas esterilizadas y medio nutriente. La mezcla se puede incubar posteriormente antes o durante un proceso de detección o análisis, y el indicador 100 de esterilización biológico se puede cuestionar en busca de signos de crecimiento de esporas.

5 La activación puede incluir además desplazar el líquido 122 desde la primera cámara 109 hasta la segunda cámara 111 a través de la primera ruta 160 de fluido cuando el recipiente 120 está en el segundo estado, y mover el gas desplazado (p. ej., el aire atrapado) fuera de la segunda cámara 111 mediante la segunda ruta 162 de fluido en respuesta a, o para facilitar, el desplazamiento del líquido 122 desde la primera cámara 109 hasta la  
10 segunda cámara 111 mediante la primera ruta 160 de fluido.

15 Para detectar un cambio detectable en las esporas 115, el indicador 100 de esterilización biológico se puede analizar inmediatamente después de que el líquido 122 y las esporas 115 se hayan combinado para conseguir una lectura inicial. Después de esto, se puede detectar cualquier cambio detectable diferente de la lectura inicial. El indicador 100 de esterilización biológico se puede vigilar y medir de forma continua o intermitente. En algunas realizaciones, una parte, o la totalidad, de la etapa de incubación se puede llevar a cabo antes de medir el cambio detectable. En algunas realizaciones, la incubación se puede llevar a cabo a una temperatura (p. ej., a 37 °C, a 50-60 °C, etc.), y la medición del cambio detectable se puede llevar a cabo a una temperatura diferente (p. ej., a temperatura ambiente, 25 °C, o a 37 °C).

20 El tiempo de lectura del indicador 100 de esterilización biológico (es decir, el momento de determinar la eficacia del proceso de esterilización) puede ser, en algunas realizaciones, inferior a 8 horas, en algunas realizaciones, inferior a 1 hora, en algunas realizaciones, inferior a 30 minutos, en algunas realizaciones, inferior a 15 minutos, en algunas realizaciones, inferior a 5 minutos, y en algunas realizaciones, inferior a 1 minuto.

#### 25 Realizaciones

La realización 1 es un método para detectar una actividad biológica, que comprende:  
proporcionar

30 una muestra que puede comprender una fuente de una o más de actividades biológicas predeterminadas;  
un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia, en donde el primer reactivo indicador puede ser convertido por una primera actividad biológica predeterminada a un primer derivado biológico;  
un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por una actividad biológica predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión; y  
35 un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador de una mezcla acuosa;  
formar una primera mezcla acuosa que comprende la muestra, el primer reactivo indicador, y el segundo reactivo indicador;  
poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar una segunda mezcla acuosa en la que una concentración del primer reactivo indicador es inferior a la concentración del primer reactivo  
40 indicador en la primera mezcla acuosa; y  
detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico;  
en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de las longitudes de onda presentes en el segundo espectro de emisión.

45 La realización 2 es el método de la realización 1, en donde detectar la presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico comprende detectar la presencia o ausencia de fluorescencia en la segunda mezcla acuosa.

La realización 3 es el método de la realización 1 o de la realización 2, que además comprende observar el sustrato para detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico.

50 La realización 4 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde una concentración del primer reactivo indicador en la primera mezcla acuosa es suficiente para impedir la detección de una cantidad de otro modo detectable del segundo derivado biológico.

55 La realización 5 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, que además comprende proporcionar un nutriente para facilitar el crecimiento de una célula biológica, en donde la formación de la primera mezcla acuosa comprende formar una mezcla que incluye el nutriente.

60 La realización 6 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, que además comprende exponer la actividad biológica a un esterilizante.

La realización 7 es el método de la realización 6, en donde el esterilizante se selecciona del grupo que consiste en vapor, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno, formaldehído y ozono.

65 La realización 8 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, que además comprende exponer la actividad biológica a un cambio de temperatura durante un período de tiempo.

- La realización 9 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el primer reactivo indicador comprende un cromóforo, en donde detectar el primer derivado biológico comprende detectar un color
- 5 La realización 10 es el método de la realización 9, en donde el primer reactivo indicador comprende un indicador cromogénico.
- La realización 11 es el método de la realización 9 o la realización 10, en donde el primer reactivo indicador comprende un indicador de pH o un sustrato enzimático.
- 10 La realización 12 es el método de la realización 11, en donde el primer reactivo indicador se selecciona de un grupo que consiste en púrpura de bromocresol, verde de bromocresol, rojo Congo y naranja de metilo.
- La realización 13 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el segundo reactivo indicador comprende un compuesto fluorogénico.
- 15 La realización 14 es el método de la realización 13, en donde el compuesto fluorogénico comprende un sustrato enzimático fluorogénico.
- 20 La realización 15 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde detectar la presencia o ausencia del segundo derivado biológico además comprende la medición de una cantidad del segundo derivado biológico.
- La realización 16 es el método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde detectar la presencia o ausencia del primer derivado biológico además comprende la medición de una cantidad del primer derivado biológico.
- 25 La realización 17 es el método de la realización 16, en donde la medición de la cantidad del primer derivado biológico comprende comparar una cantidad de color medida en una parte de la segunda mezcla acuosa que no está asociada con el sustrato a un patrón de color.
- 30 La realización 18 es el método de cualquiera de las realizaciones anteriores, que además comprende: proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico; y usar el instrumento para detectar el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico.
- La realización 19 es el método de cualquiera de las realizaciones anteriores, que además comprende: proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador y el segundo derivado biológico; y usar el instrumento para detectar el primer reactivo indicador y el segundo derivado biológico.
- 35 La realización 20 es un método para detectar una actividad biológica, que comprende: proporcionar un indicador de esterilización biológico que comprende;
- 40 un bastidor que comprende una primera y una segunda cámaras;
- un recipiente que contiene un primer líquido acuoso, el recipiente dispuesto en una primera cámara, en donde al menos una parte del recipiente es frangible, el líquido comprende un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia y un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por una segunda actividad biológica predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, en donde el primer reactivo indicador puede ser convertido por una primera actividad biológica predeterminada a un primer derivado biológico, en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de longitudes de onda del segundo espectro de emisión;
- 45 una fuente de la segunda actividad biológica predeterminada dispuesta en una segunda cámara; y
- un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador del primer líquido acuoso, el sustrato dispuesto en el bastidor;
- 50 poner el primer líquido acuoso en comunicación de fluidos con el sustrato para formar un segundo líquido acuoso en el que la concentración del primer reactivo indicador es inferior a la concentración del primer reactivo indicador en el primer líquido acuoso; y
- detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico en la segunda mezcla acuosa.
- 55 La realización 21 es el método de la realización 20, en donde el primer líquido acuoso en comunicación de fluidos con el sustrato comprende fracturar al menos una parte del recipiente frangible.
- La realización 22 es el método de la realización 21, en donde el indicador de esterilización biológico además comprende un interruptor dispuesto en el bastidor y en donde fracturar el recipiente frangible comprende presionar el recipiente y el interruptor entre sí.
- 60 La realización 23 es el método de cualquiera de las realizaciones 20 o 21, en donde el bastidor del indicador de esterilización biológico incluye:
- 65 una primera parte, y

una segunda parte adaptada para acoplarse a la primera parte, siendo la segunda parte móvil con respecto a la primera parte, cuando se acopla a la primera parte, entre una primera posición y una segunda posición; en donde el método además comprende mover la segunda parte del bastidor desde la primera posición a la segunda posición.

5 La realización 24 es el método de la realización 23, en donde el bastidor incluye una dirección longitudinal, y en donde mover la segunda parte del bastidor incluye mover la segunda parte del bastidor en la dirección longitudinal.

10 La realización 25 es el método de la realización 23, que además comprende mover el recipiente en el bastidor en respuesta al movimiento de la segunda parte del bastidor de la primera posición a la segunda posición.

La realización 26 es el método de la realización 25, en donde el movimiento del recipiente en el bastidor da lugar a que el recipiente se fracture.

15 La realización 27 es un sistema para detectar una actividad biológica predeterminada, que comprende:  
 un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia, en donde el primer reactivo indicador puede ser convertido por una primera actividad biológica predeterminada a un primer derivado biológico;  
 20 un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por una actividad biológica predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión;  
 un recipiente configurado para contener un medio líquido;  
 un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador de una mezcla acuosa; y  
 un instrumento configurado para recibir el recipiente y detectar el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico  
 25 en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de las longitudes de onda presentes en el segundo espectro de emisión.

La realización 28 es el sistema de la realización 27 que además comprende un procesador.

30 La realización 29 es el sistema de la realización 27 o de la realización 28, en donde el instrumento está configurado además para regular la temperatura del medio líquido.

La realización 30 es el sistema de cualquiera de las realizaciones 27 a 29, en donde el instrumento está configurado para detectar tanto el primer reactivo indicador como el segundo derivado biológico.

35 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

**Ejemplos**

Ejemplo de referencia 1 - Espectro de absorbancia del púrpura de bromocresol (BCP).

40 Este ejemplo de referencia muestra el espectro de absorbancia del púrpura de bromocresol.

45 El púrpura de bromocresol obtenido de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, (número de catálogo B-5880), se disolvió en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,3, a una concentración de 0,004. La solución se introdujo en una cubeta de cuarzo, y se realizó un barrido del espectro de absorbancia UV-visible usando el adaptador para cubeta de 1 cm proporcionado con el lector de placas TECAN INFINITE M200 (Tecan US, Durham, NC). Los parámetros del barrido se presentan en la Tabla 1.

50 Los resultados se muestran en el gráfico ilustrado en la Fig. 2. Se pueden observar picos de absorbancia a longitudes de onda de aproximadamente 300 nm, aproximadamente 380 nm, y aproximadamente 600 nm.

*Tabla 1. Parámetros de barrido para el espectro de absorbancia.*

Modo	Lectura máxima de fluorescencia
Longitud de onda de emisión inicial	380 nm
Longitud de onda de emisión final	650 nm
Tamaño del paso de longitud de onda de emisión	2 nm
Número de barridos de emisión	136
Longitud de onda de excitación	350 nm
Ancho de banda (Em)	280...850: 20 nm
Ancho de banda (Ex) (Intervalo 1)	230...295: 5 nm
Ancho de banda (Ex) (Intervalo 2)	296...850: 9 nm
Ganancia	80 Manual

Número de lecturas	10
Tiempo de integración	20 ms
Tiempo de retardo	0 ms
Tiempo de espera	0 ms

Ejemplo de referencia 2 Espectro de emisión de la 7-hidroxi-4-metilcumarina (4-metilumbeliferona).

Este ejemplo de referencia muestra el espectro de emisión de la 4-metilumbeliferona.

5

La 4-metilumbeliferona (4MU), número de catálogo m1381, obtenida de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, se disolvió en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,3, a una concentración de 0,004 mg/ml. La solución se introdujo en una cubeta de cuarzo, y se registró el espectro de emisión usando el adaptador para cubeta de 1 cm proporcionado con el lector de placas TECAN INFINITE M200. Los parámetros del barrido se presentan en la Tabla 2.

10

Los resultados se muestran en el gráfico ilustrado en la Fig. 2. Se puede observar un pico de emisión a una longitud de onda de aproximadamente 450 nm.

*Tabla 2. Parámetros de barrido para el espectro de emisión de la 4-metilumbeliferona.*

15

Modo	Absorbancia
Longitud de onda de inicial	250 nm
Longitud de onda final	800 nm
Tamaño del paso de longitud de onda	2 nm
Número de barridos	276
Ancho de banda (Intervalo 1)	230...295: 5 nm
Ancho de banda (Intervalo 2)	296...1000: 9 nm
Ganancia	80 Manual
Número de lecturas	10
Tiempo de espera	0 ms
Parte de la placa	B1-B1

Ejemplo de referencia 3 - Efecto del BCP sobre la detección de 4MU

20

Este ejemplo de referencia muestra el efecto del BCP en la detección de fluorescencia de la 4MU cuando ambos compuestos están presentes en la misma solución.

25

Una solución madre de 4-metilumbeliferona (4MU), preparada como se describe en el Ejemplo 2, se diluyó en serie en la solución salina tamponada con fosfato hasta las concentraciones mostradas en la Tabla 3. Se preparó una solución madre de púrpura de bromocresol (BCP) en solución salina tamponada con fosfato, como se describe en el Ejemplo 1. La púrpura de bromocresol (0,03 mg/ml, concentración final) se mezcló con las correspondientes soluciones de 4MU mostradas en la Tabla 3. Alícuotas por triplicado (100 microlitros/pocillo) de cada solución correspondiente se cargaron en una placa de 96 pocillos, y la fluorescencia de cada pocillo se midió con un lector de placas TECAN INFINITE M200. La longitud de onda de excitación fue 350 nm y la detección fue a 420 nm. Los resultados, relacionados como unidades relativas de fluorescencia (URF), se muestran en la Tabla 3. Los datos muestran que, para todas y cada una de las concentraciones de 4MU analizadas, la presencia de púrpura de bromocresol en la solución dio como resultado una disminución en la fluorescencia medible.

30

*Tabla 3 - Detección por fluorescencia de 4MU en presencia o ausencia de BCP*

Concentración de 4MU (mg/ml)	4MU sin BCP URF	4MU con BCP URF
0,004	9725	5761
0,0004	927	582
0,00004	128	94
0,000004	50	40
0	41	37

35

Los resultados son un promedio de tres réplicas. Todos los valores se indican en unidades relativas de fluorescencia (URF).

40

Ejemplo de referencia 4. - Adsorción de BCP desde un medio líquido

Este ejemplo de referencia muestra la adsorción de BCP desde un medio de crecimiento sobre un material de sustrato.

5 Se preparó una solución de medio de crecimiento de esporas que consistía en 17 g de una peptona bacteriológica, 0,17 g de L-alanina y 0,03 g del tinte indicador del pH púrpura de bromocresol, por litro de agua. El pH de la solución de medio nutriente se ajustó a 7,6 con hidróxido sódico 0,1 N.

10 A cada uno de 60 tubos de vidrio de borosilicato (12 ml, VWR n.º de cat. 53283-802) se añadió 1,0 ml del medio de crecimiento preparado y se tapó con cierres de tapón sin revestimiento (VWR n.º de cat. 66010-680).

15 Se evaluaron dos materiales sustrato diferentes: Nailon cargado GE (membrana de nailon cargada MAGNAPROBE de 0,45 micrómetros, número de pieza NP0HY00010, comercializado por GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN) y papel (papel de celulosa para cromatografía en Calidad 1 Chr Whatman, comercializado por Whatman Inc. USA, Piscataway, NJ).

20 Veinte tiras de cada uno de los dos materiales sustrato se recortaron al tamaño, 4 mm x 10 mm. Todas las tiras se preesterilizaron introduciéndolas en una Propper CHEX-ALL II Instant Sealing Pouch (Propper, Manufacturing Inc., Long Island City, NY) y esterilizándolas durante 30 minutos con un ciclo de vapor líquido a 121 °C en un esterilizador AMSCO (Steris, Mentor, OH).

Las tiras de sustrato esterilizadas se retiraron asépticamente de la bolsa y se transfirieron a los tubos de vidrio, cinco tiras del sustrato de nailon en cada uno de 20 tubos y cinco tiras del sustrato de papel en cada uno de 20 tubos diferentes.

25 Se recogieron tiras de esporas desmontadas 1292 ATTEST Rapid Readout Biological Indicators Steam Sterilizers (3M, St. Paul, MN), que contenían esporas de *G. stearothermophilus*, (ATCC 7953). Las tiras de esporas se recortaron en cuadrados iguales, cada uno aproximadamente de 6,4 mm x 6,4 mm, y se añadieron a tubos de vidrio según la Tabla 4 y como se describe adicionalmente a continuación. Un trozo (6,4 mm x 6,4 mm) de una tira de esporas 1292 ATTEST se añadió a cada uno de 10 tubos de vidrio, conteniendo cada uno 5 trozos del sustrato de nailon y medio de cultivo. Un trozo de la tira de esporas se añadió a cada uno de 10 tubos de vidrio, conteniendo cada tubo 5 trozos del papel Whatman y medio de cultivo. Un trozo de tira de esporas se añadió a cada uno de 10 tubos de vidrio, conteniendo cada tubo solamente medio de crecimiento, sin sustrato. No se añadió ningún trozo de tira de esporas a los 30 tubos restantes: 10 tubos contenían 5 trozos de sustrato de nailon, 10 tubos contenían 5 trozos de sustrato de papel, y 10 tubos no contenían sustrato.

Tabla 4 Preparación de muestras para el Ejemplo 4

Muestra	Número de tubos	Medio de crecimiento	5 tiras de sustrato	Tira de esporas
1. Nailon + esporas	10	Sí	nailon	Sí
2. Nailon sin esporas	10	Sí	nailon	Ninguno
3. Papel + esporas	10	Sí	papel	Sí
4. Papel sin esporas	10	Sí	papel	Ninguno
5. Control - Sin sustrato + esporas	10	Sí	ninguno	Sí
6. Control - Sin sustrato sin esporas	10	Sí	ninguno	Ninguno

40 Se seleccionaron dos tubos de cada una de las muestras anteriores para las siguientes observaciones y análisis en el punto temporal de 1 minuto. El color del sustrato de nailon o papel mientras estaba en el tubo se comparó con el color del medio de crecimiento líquido circundante para determinar si el sustrato estaba más oscuro o más claro que el medio. Se observó el color de los materiales sustrato, y se registró al extraerlo de los tubos de vidrio que contenían medio de crecimiento.

45 Las tiras de sustrato de nailon y papel se extrajeron de los tubos y se introdujeron en un KIMWIPE (Kimberly-Clark) antes de tomar las lecturas de densitometría usando un densitómetro X-Rite 530P (X-Rite, Grand Rapids MI). La configuración de densidad óptica del densitómetro X-Rite 530P se configuró a "color" para proporcionar los resultados del filtro V. El densitómetro X-Rite se configuró a "comparar" para los resultados de  $\Delta E$  de los sustratos, seleccionando Pantone 2665U y 102U. La fórmula CIE76 se usó para calcular el  $\Delta E$  para cada Pantone. El valor  $\Delta E$  es la distancia en el espacio de color  $L^*A^*B$  entre un punto medido y un valor de referencia, un color Pantone. Un  $\Delta E$  menor indica que el color medido está próximo al valor de referencia. Un valor para  $\Delta E$  de aproximadamente 2,5 es aproximadamente el umbral mínimo para que el ojo humano diferencie un color. Los dos valores de referencia usados fueron Pantone 2665U (púrpura claro) y Pantone 102U (amarillo brillante). Nótese que, puesto que estos dos valores no están diametralmente opuestos en la "rueda de color", un aumento en  $\Delta E$  a 2665U no indica necesariamente una disminución exacta de  $\Delta E$  a 102U. En otras palabras,  $\Delta E$  a 2665U, solo indica si algo se volvió o no más "púrpura", no si algo se volvió o no más "amarillo".

Se observó también el color del medio en cada tubo y se registró (Tabla 5). Por triplicado, se extrajo una cantidad de 200 µl de medio de cada tubo y se introdujo en una placa de 96 pocillos (placa de cultivo de 96 pocillos COSTAR CLS-3603-48EA de color negro para cultivo de tejidos con el fondo transparente) y se midió la densidad óptica a 590 nm y 430 nm con un espectrofotómetro SYNERGY 4 con el software Gen 5. Las mediciones de DO se tomaron usando un Monochromater, (BioTek, Winooski, VT).

Los tubos restantes se incubaron a 56 °C. En cada uno de los siguientes tiempos: 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas de incubación; se retiraron de la incubadora 2 tubos de cada muestra, se inspeccionaron visualmente y se midieron instrumentalmente como se ha descrito anteriormente.

Tabla 5 Observaciones de color del medio

Muestra	1 min	30 min	1 h	4 h	24 h
1. Nailon + esporas	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Amarillo
3. Papel + esporas	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Amarillo
5. Control - Sin sustrato + esporas	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Amarillo
2. Nailon sin esporas	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura
4. Papel sin esporas	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura
6. Control - Sin sustrato sin esporas	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura	Púrpura

El medio de todos los viales siguió de color púrpura después de la lectura de 4 horas. Dichas muestras sin esporas siguieron de color púrpura después de 24 horas. Todas las muestras con esporas cambiaron a un color visualmente amarillo a las 24 horas debido al crecimiento de las células, que produce una disminución en el pH del medio, indicado por el tinte indicador del pH BCP.

En cada intervalo de tiempo, antes de retirar el sustrato del medio, el color del sustrato se comparó con el del medio (ver Tabla 6). Si había alguna diferencia entre los dos colores, la diferencia se documentó. En todos los casos, cuando el sustrato de nailon se usó como sustrato, el sustrato apareció con un tono de color más oscuro que el medio circundante. En todos los casos, cuando el papel se usó como sustrato, el sustrato apareció con un tono de color más claro que el medio circundante. Estos resultados muestran que el sustrato de nailon es superior al sustrato de papel para recibir y concentrar el reactivo indicador.

Tabla 6 Color del sustrato vs. color del medio

Muestra	1 minuto	0,5 horas	1 hora	4 horas	24 horas
1. Nailon + esporas	Más oscuro	Más oscuro	Más oscuro	Más oscuro	Amarillo más oscuro
2. Nailon sin esporas	Más oscuro	Más oscuro	Más oscuro	Más oscuro	Más oscuro
3. Papel + esporas	Más claro	Más claro	Más claro	Más claro	Amarillo más claro
4. Papel sin esporas	Más claro	Más claro	Más claro	Más claro	Más claro

En la mayoría de los casos “Más oscuro” significó que el sustrato era visiblemente de color púrpura más oscuro que el medio, con la excepción del nailon con esporas a las 24 h, que era de un color amarillo más oscuro. En la mayoría de los casos “Más claro” significó que el sustrato era visiblemente de color púrpura más claro que el medio, con la excepción del papel con esporas a las 24 h, que era de un color amarillo más claro.

Para las muestras con esporas, las mediciones de DO a 590 nm a 24 horas no mostrarán diferencias en la intensidad de color amarillo. Por lo tanto, solamente se evaluaron los valores de DO tomados a 430 nm a 24 horas.

Tabla 7 Densidad óptica promedio del medio a 430 nm a 24 horas

Muestra	24 h
1. Nailon + esporas	0,271
3. Papel + esporas	0,827
5. Control - sin sustrato + esporas	0,835

Las lecturas a 24 horas a 430 nm de las muestras de medio con esporas en presencia de sustrato de papel y la muestra de medio sin sustrato (Control) con esporas, tienen valores similares de DO de 0,827 y 0,835 respectivamente, como se muestra en la Tabla 7. Sin embargo, la muestra de medios con esporas en presencia de nailon tenía una DO de solo 0,271; que es 0,5 unidades de DO menos que el control o la muestra con el sustrato de papel. Esto muestra que la intensidad del color amarillo del medio en presencia de nailon se redujo debido a que el sustrato de nailon recibe y concentra el reactivo indicador.

Tabla 8 Densidad óptica promedio del medio a 590 nm

Muestra	1 min	30 min	1 h	4 h	24 h
1. Nailon con esporas	1,124	1,122	0,698	1,063	***
3. Papel con esporas	1,404	1,786	1,440	1,697	***
5. Control - Sin sustrato con esporas	1,402	1,801	1,463	1,776	***
2. Nailon sin esporas	1,158	1,136	0,653	1,102	1,122
4. Papel sin esporas	1,435	1,716	1,468	1,863	1,708*
6. Control - Sin sustrato sin esporas	1,345	1,797	1,465	1,828	1,812

Todos los valores representan n= 6 (3 lecturas x 2 tubos).

\* n=5 lecturas: 3 lecturas para el tubo 1 y 2 lecturas para el tubo 2.

5 \*\*\* Las muestras son de color amarillo y, por tanto, la DO a 590 nm no mide con precisión el color del medio.

La absorbancia del control sin sustrato (con o sin esporas) a 1 minuto se consideró la medición inicial de la DP de base para el medio. La Tabla 8 muestra que incluso a 1 minuto, la DO a 590 nm de la muestra de medio, con esporas, en presencia de nailon, (1,124) fue inferior a la DO de la muestra de medio en presencia del papel con esporas (1,404) o el Control con esporas (1,402). Esta diferencia indica que la intensidad del color púrpura del medio ya se había reducido debido a la capacidad del sustrato de nailon para recibir y concentrar el reactivo indicador de BCP rápidamente. A 24 horas, la DO a 590 nm de la muestra de medio sin esporas en presencia de nailon fue de 1,122, que es mucho menor que la DO del medio en presencia de papel (1,708) o la DO de la muestra de Control sin esporas, 1,812.

15 Tabla 9 Color Pantone del sustrato a 24 horas

1. Sustrato de nailon + esporas	Amarillo	Pantone 102U
2. Sustrato de nailon sin esporas	Púrpura	Pantone 1345U
3. Sustrato de papel + esporas	Amarillo	Pantone 100U
4. Sustrato de papel sin esporas	Púrpura	Pantone 256U
Color púrpura inicial del medio	Púrpura	Pantone 2665U
Color del medio amarillo	Amarillo	Pantone 102U

Tabla 10 Lectura de densitometría promedio del sustrato usando un filtro V

Muestra	0 min	1 min	0,5 h	1 h	4 h	24 h
1. Nailon + esporas	0,05	0,17	0,30	0,22	0,26	***
2. Nailon sin esporas	0,05	0,20	0,24	0,28	0,26	0,26
3. Papel + esporas	0,11	0,12	0,26	0,16	0,12	***
4. Papel sin esporas	0,11	0,11	0,15	0,14	0,11	0,18

20 \*\*\* Las muestras de sustrato con esporas a 24 horas son de color amarillo y el filtro V no mide con precisión el color del sustrato.

Tabla 11 Lectura de densitometría promedio del sustrato:  $\Delta E$  del Pantone 2665U (Púrpura)

Muestra	0 min	1 min	0,5 h	1 h	4 h	24 h
1. Nailon + esporas	68,18	64,48	63,57	64,36	56,42	***
2. Nailon sin esporas	68,18	66,37	58,47	74,45	54,62	57,49
3. Papel + esporas	66,23	68,18	61,27	67,06	66,96	***
4. Papel sin esporas	66,23	68,70	65,29	63,69	67,45	59,31

25 \*\*\* Las muestras de sustrato con esporas a 24 horas son de color amarillo y el filtro V no mide con precisión el color del sustrato.

Tabla 12 Lectura de densitometría promedio del sustrato:  $\Delta E$  del Pantone 102U (Amarillo)

Muestra	0 min	24 h
Sustrato de nailon + Esporas	83,78	56,83
Sustrato de papel + Esporas	83,67	76,15

30 Las tablas anteriores muestran las lecturas de densitometría de los sustratos después de su exposición al medio (con y sin esporas) durante períodos de tiempo variables. La lectura a tiempo 0 para cada sustrato es la lectura de densitometría inicial antes de que la muestra de sustrato se introduzca en el medio. Al evaluar los sustratos de color púrpura, el filtro V y el  $\Delta E$  (Pantone 2665U) mostraron el mayor contraste. Las lecturas de densitometría promedio con



el filtro V para el sustrato de nylon, como se muestra en la Tabla 10, aumentaron y siguieron siendo elevadas durante la totalidad del experimento (siendo la única excepción que el sustrato era de color amarillo en el punto temporal de 24 horas para la muestra “con esporas”). Por el contrario, las lecturas de densitometría para el sustrato de papel siguieron siendo prácticamente constantes para todos los puntos temporales. Del mismo modo, el valor  $\Delta E$  del sustrato de nylon (Pantone 2665U) mostrado en la Tabla 11 disminuyó en general durante la totalidad del experimento (siendo la única excepción que el sustrato era de color amarillo en el punto temporal de 24 horas para la muestra “con esporas”). Esto indicó que el sustrato de nailon estaba recibiendo y concentrando el reactivo indicador BCP. Aunque, por el contrario, el valor  $\Delta E$  (Pantone 2665U) del sustrato de papel permaneció bastante constante.

La Tabla 12 ilustra que, para el punto temporal de 24 horas, el valor  $\Delta E$  (Pantone 102U) para el sustrato de nailon fue considerablemente inferior que el valor E (Pantone 102U) para el sustrato de papel, lo que indica que el sustrato de nailon estaba más cerca del color Pantone 102U (amarillo más brillante) que el sustrato de papel.

Ejemplo de referencia 5 Adsorción en sustrato de nailon de BCP procedente de un medio líquido después de dos incubaciones de 24 h

Este ejemplo de referencia muestra la adsorción de BCP desde un medio de crecimiento líquido sobre un sustrato de nailon.

El mismo medio y componentes usados en el Ejemplo 4 se usaron en el Ejemplo 5. A cada uno de 4 tubos de vidrio se añadió 1,0 ml del medio de crecimiento preparado. Se añadió a cada tubo de vidrio un trozo de una tira de esporas 1292 ATTEST cortada a aproximadamente 6,4 mm x 6,4 mm. Los tubos se introdujeron en un incubador a 56 °C durante 24 horas para estimular el crecimiento de las células de *G. stearothermophilus*. Después de las 24 horas de incubación, se añadieron (5) tiras (cortada cada una de ellas a 4 mm x 10 mm) del sustrato de nailon a dos (2) de los tubos. Los tubos se introdujeron en un incubador a 56 °C durante 24 horas más. Después del segundo periodo de incubación de 24 horas (24 horas después de la adición del sustrato de nailon) de los tubos, se llevaron a cabo los siguientes análisis. Los trozos de sustrato de nailon se extrajeron de los tubos, se introdujeron en un KIMWIPE y se tomaron las lecturas de densitometría de las tiras de sustrato. De cada tubo se tomaron tres alícuotas de 200  $\mu$ L y se pusieron en una placa de 96 pocillos. Se midió la densidad óptica a 430 nm de los medios.

*Tabla 13 DO promedio del medio a 430 nm a 48 horas; 24 horas después del sustrato de nailon*

Muestra	DO promedio
Medio que contiene sustrato de nailon + esporas	0,365
Medio de control - sin sustrato + esporas	1,241

n=12 (3 lecturas de cada uno de los 4 tubos)

n=3 (1 lectura del tubo de control)

La Tabla 13 muestra la disminución en la DO a 430 nm del medio 24 horas después de añadir el sustrato de nailon a los tubos, comparada con el control, donde no se añadió sustrato. La diferencia en la medición de DO entre las dos muestras indica la diferencia en la cantidad de amarillo presente en el medio de la muestra. Esto muestra que la intensidad del color amarillo del medio en presencia de nailon se redujo debido a que el sustrato de nailon recibe y concentra el reactivo indicador.

*Tabla 14 Lectura de densitometría promedio del sustrato:  $\Delta E$  del Pantone 102U (Amarillo)*

Muestra	Promedio $\Delta E$ (102U)
Sustrato de nailon + esporas después de 24 h en el medio	37,86
Sustrato de nailon antes del medio	83,78

n=10 (5 tiras de sustrato de nailon x 2 tubos)

La Tabla 14 muestra el valor de  $\Delta E$  (102U) del sustrato de nailon 24 horas después de haberse añadido a un tubo de medio con esporas que ya se había incubado durante 24 horas. Esto se comparó con el sustrato de nailon que no se había introducido en el medio. La diferencia en las mediciones de  $\Delta E$  entre las dos muestras indica que el sustrato expuesto al medio (amarillo) con crecimiento está más cercano en color al pantone 102U (amarillo brillante) que el sustrato no expuesto al medio.

Ejemplo de referencia 6 -Absorción de BCP desde un medio líquido por varios sustratos

Este ejemplo de referencia muestra la adsorción de BCP desde un medio de crecimiento líquido sobre diversos materiales de sustrato.

Se preparó una solución de medio de crecimiento de esporas que consistía en 17 gramos de una peptona C bacteriológica, 0,17 gramos de L-alanina y 0,03 gramos del tinte indicador del pH púrpura de bromocresol (BCP), por litro de agua. El pH de la solución de medio nutriente se ajustó a 7,6 con hidróxido sódico 0,1 N.

5 A cada uno de los tubos de vidrio de borosilicato (12 ml, VWR n.º de cat. 53283-802) se añadió 1,0 ml del medio de crecimiento preparado y se tapó con cierres de tapón sin revestimiento (VWR n.º de cat. 66010-680).

10 Se evaluaron cuatro materiales sustrato diferentes: (1) Nailon cargado GE (membrana de nailon cargada MAGNAPROBE de 0,45 micrómetros, número de pieza NPOHY00010, comercializada por GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN); (2) Membrana de nailon BIO-RAD de alta resistencia cargada positivamente con grupos amina cuaternaria (ZETA-PROBE GT Genomics, n.º de Cat. 162-0196, comercializada por BIO-RAD LifeSciences, Hercules, CA); (3) nitrocelulosa 0,2 µM (n.º de Cat. LC-2000, comercializada por Invitrogen Corporation Carlsbad, CA), y (4) membrana de difluoruro de polivinilideno 0,2 µM (PVDF) (n.º de Cat. LC-2002, comercializada por Invitrogen Corporation Carlsbad, CA). Varias tiras de cada uno de los materiales sustrato se recortaron al tamaño: 4 mm x 10 mm, suficiente para una (1) tira en cada tubo de vidrio.

15 Todas las tiras se preesterilizaron introduciéndolas en una Propper CHEX-ALL II Instant Sealing Pouch (Propper, Manufacturing Inc., Long Island City, NY) y esterilizándolas durante 30 minutos con un ciclo de vapor líquido (a 121 °C) en un esterilizador AMSCO (Steris, Mentor, OH). A continuación, las tiras se transfirieron asépticamente a cada tubo. Se evaluaron dos tubos de cada sustrato, junto con dos tubos de control que no contenían sustrato.

20 Las siguientes observaciones y análisis se llevaron a cabo en los puntos temporales 0, 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas: (1) el color del material de sustrato en cada tubo se comparó con el color del medio circundante del mismo tubo. (más oscuro o más claro), (2) el material de sustrato se extrajo del tubo, se introdujo en un KIMWIPE para secar por soplado y seguidamente se tomaron las lecturas de densitometría con el filtro V como se ha descrito anteriormente, (3) se extrajeron 200 µl del medio de cada tubo y se transfirieron por triplicado a una placa de 96 pocillos (placa de cultivo de 96 pocillos COSTAR CLS-3603-48EA de color negro para cultivo de tejidos con el fondo transparente) y la densidad óptica del medio a 590 nm se midió con un espectrofotómetro SYNERGY 4 con el software Gen 5. Las mediciones de DO se tomaron usando un Monochromater, (BioTek, Winooski, VT).

30 Los tubos restantes se incubaron a 56 °C. En cada uno de los siguientes tiempos: 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas de incubación; se retiraron de la incubadora 2 tubos de cada muestra, se inspeccionaron visualmente y se midieron instrumentalmente como se describe anteriormente.

35 *Tabla 15. Color del sustrato vs. color del medio para diferentes sustratos*

Punto temporal	Nailon GE MAGNAPROBE	Nailon Bio-Rad ZETA-PROBE	Nitrocelulosa Invitrogen	PVDF Invitrogen
0 h	Más claro	Más claro	Más claro	Más claro
0,5 h	Más oscuro	Más oscuro	Más claro	Más claro
1 h	Más oscuro	Más oscuro	Más claro	Más claro
4 h	Más oscuro	Más oscuro	Más claro	Más claro
24 h	Más oscuro	Más oscuro	Más claro	Más claro

Más oscuro = el sustrato tenía un color púrpura visiblemente más oscuro que el medio  
 Más claro = el sustrato tenía un color púrpura visiblemente más claro que el medio

40 A cada lectura antes de retirar el sustrato del medio, el color del medio se comparó visualmente con el del sustrato. Se observó y se notificó la diferencia entre el color del sustrato y el color del medio en la Tabla 15. Después de 30 minutos en contacto con el medio, ambos materiales sustrato de nailon eran visiblemente más oscuros que el medio, y permanecieron más oscuros durante la totalidad del experimento.

45 *Tabla 16 Lectura de densitometría promedio de varios sustratos después del medio con BCP*

Punto temporal"	Nailon GE MAGNAPROBE	Nailon Bio-Rad ZETA-PROBE	Nitrocelulosa Invitrogen	PVDF Invitrogen
0 h	0,300	0,425	0,050	0,035
0,5 h	0,965	0,735	0,195	0,030
1 h	0,930	0,785	0,255	0,025
4 h	1,035	0,720	0,220	0,035
24 h	1,015	0,735	0,240	0,040

50 La Tabla 16 muestra las lecturas de densitometría de los materiales sustrato tras la exposición al medio durante períodos de tiempo variables. La lectura a tiempo 0 para cada sustrato es la lectura de densitometría inicial antes de un plazo de 30 segundos desde que el sustrato se introduce en el medio. En todos los casos, la densitometría de los sustratos de nailon aumentó en un plazo de 30 minutos y siguió siendo elevada durante la totalidad del experimento.

Tabla 17 DO a 590 nm de medio en presencia de varios materiales sustrato

Punto temporal	Nailon GE MAGNAPROBE	Nailon Bio-Rad ZETA-PROBE	Nitrocelulosa Invitrogen	PVDF Invitrogen	Control (solamente medio)
0 h	1,972	1,952	2,012	1,988	1,957
0,5 h	1,535	1,762	1,981	1,985	1,965
1 h	1,166	1,662	2,143	1,970	1,990
4 h	1,108	1,704	2,071	1,995	1,958
24 h	0,935	1,842	2,217	2,329	2,156

5 La Tabla 17 muestra la lectura de densidad óptica promedio del medio extraído del tubo que contenía cada material de sustrato en el tiempo especificado. Es notable que, para cada punto temporal, la DO del medio que estaba en presencia de cualquiera de los sustratos de nailon era menor que la lectura de DO para el medio que contenía tanto nitrocelulosa como PVDF. Adicionalmente, la nitrocelulosa o el PVDF muestran muy pocos cambios en la lectura de DO y son bastante similares a los valores de DO del Control.

10

#### Ejemplo de referencia 7 - Adsorción del sustrato de rojo de metilo (MR) de un medio líquido

Este ejemplo de referencia muestra la adsorción de BCP desde un medio de crecimiento líquido sobre diversos materiales de sustrato.

15

Se preparó una solución de medio de crecimiento de esporas que consistía en 17 gramos de una peptona bacteriológica, 0,17 gramos de L-alanina y 0,03 gramos del tinte indicador del pH rojo de metilo, por litro de agua. El pH de la solución de medio nutriente se ajustó a 4,2 con ácido clorhídrico 0,1 N.

20

A cada uno de los tubos de vidrio de borosilicato (12 ml, VWR n.º de cat. 53283-802) se añadió 1,0 ml del medio de crecimiento preparado y se tapó con cierres de tapón sin revestimiento (VWR n.º de cat. 66010-680).

25

Se evaluaron dos materiales sustrato diferentes: Nailon cargado GE (membrana de nailon cargada MAGNAPROBE de 0,45 micrómetros, número de pieza NPOHY00010, comercializado por GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN), y membrana de nailon BIO-RAD de alta resistencia cargada positivamente con grupos amina cuaternaria (Zeta-Probe GT Genomics, n.º de cat. 162-0196, comercializada por BIO-RAD LifeSciences, Hercules, CA). Varias tiras de cada material sustrato se recortaron al tamaño: 4 mm x 10 mm, suficiente para una (1) tira en cada tubo de vidrio.

30

Todas las tiras se preesterilizaron introduciéndolas en una Propper CHEX-ALL II Instant Sealing Pouch (Propper, Manufacturing Inc., Long Island City, NY) y esterilizándolas durante 30 minutos con un ciclo de vapor líquido (a 121 °C) en un esterilizador AMSCO (Steris, Mentor, OH). A continuación, las tiras se transfirieron asépticamente a cada tubo.

35

Las siguientes observaciones y análisis se llevaron a cabo para dos tubos de cada sustrato en los puntos temporales 0, 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas: (1) el material de sustrato se extrajo del tubo, se introdujo en un KIMWIPE para secar por soplado y seguidamente se tomaron las lecturas de densitometría con el filtro V como se ha descrito anteriormente, (2) el color del material de sustrato de cada tubo se comparó con el color del medio circundante del mismo tubo. (más oscuro o más claro).

40

Los tubos restantes se incubaron a 56 °C. En cada uno de los siguientes tiempos: 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas de incubación; se retiraron de la incubadora 2 tubos de cada muestra, se inspeccionaron visualmente y se midieron instrumentalmente como se describe anteriormente.

Tabla 18. Lecturas de densitometría promedio del sustrato tras el rojo de metilo, Filtro V

Punto temporal	Nailon GE MAGNAPROBE	Nailon Bio-Rad ZETA-PROBE
0 h	0,160	0,200
0,5 h	0,285	0,330
1 h	0,325	0,376
4 h	0,205	0,450
24 h		0,470

45

La tabla anterior muestra las lecturas de densitometría de los sustratos tras la exposición al medio durante períodos de tiempo variables. La lectura a tiempo 0 para cada sustrato es la lectura de densitometría inicial antes de un plazo de 30 segundos desde que el sustrato se introduce en el medio. En todos los casos, la densitometría de los sustratos de nailon aumentó en un plazo de 30 minutos y siguió siendo elevada durante la totalidad del experimento.

50

Tabla 19. Color del sustrato vs. color del medio tras el rojo de metilo

Punto temporal	Nailon GE MAGNAPROBE	Nailon Bio-Rad ZETA-PROBE
0 h	Más claro	Más claro
0,5 h	Más oscuro	Más oscuro
1 h	Más oscuro	Más oscuro
4 h	Más oscuro	Más oscuro
24 h	Más oscuro	Más oscuro

Más oscuro = el sustrato tenía un color visiblemente más oscuro que el medio

Más claro = el sustrato tenía un color visiblemente más claro que el medio

5 A cada lectura antes de retirar los materiales sustrato del medio, el color del medio se comparó con el del sustrato (ver Tabla 19). Se observó y se notificó la diferencia entre el color del sustrato y el color del medio. Después de 30 minutos en contacto con el medio, ambos materiales sustrato de nailon eran visiblemente más oscuros que el medio, y permanecieron más oscuros durante la totalidad del experimento.

#### 10 Ejemplo de referencia 8 Inhibición de la detección de naranja de acridina (AO) con BCP y rojo de metilo

Este ejemplo de referencia muestra el efecto del BCP y del rojo de metilo en la detección de fluorescencia del naranja de acridina cuando uno de los indicadores de pH (es decir, BCP o MR) está presente en una solución con naranja de acridina.

15 Se preparó una solución de medio de crecimiento de esporas que consistía en 17 gramos de una peptona C bacteriológica y 0,17 gramos de L-alanina. Se añadió un volumen de 200 µl del medio de crecimiento a cada pocillo en dos (2) placas de 96 pocillos.

20 Se preparó una dilución en serie de soluciones del indicador de pH tanto para el rojo de metilo (RM) como para el púrpura de bromocresol (BCP) desde 4,8 g/l y diluyendo hasta 0,75 g/l. Se preparó una dilución en serie de naranja de acridina desde 1:50 y diluyendo hasta 1:800

25 En la placa n.º 1, se añadieron 20 µl de la dilución adecuada de BCP a cada hilera de la placa, y se añadieron 20 µl de la dilución adecuada de naranja de acridina (NA) a cada columna de la placa n.º 1. En la placa n.º 2, se añadieron 20 µl de la dilución adecuada de rojo de metilo a cada hilera de la placa, y se añadieron 20 µl de la dilución adecuada de naranja de acridina (NA) a cada columna de la placa n.º 2. Véase la Tabla 20 para la configuración de la placa n.º 1 y la placa n.º 2.

Tabla 20 Configuración de la placa n.º 1 de 96 pocillos con BCP y de la placa n.º 2 con RM

Columna: Dilución inicial de la hilera de NA: Concentración inicial de BCP o RM	A 1:50 AO	B 1:100 AO	C 1:200 AO	D 1:400 AO	E 1:800 AO	F sin AO
Hilera 1: 4,8 g/l de BCP o RM	-	-	-	-	-	-
Hilera 2: 2,4 g/l de BCP o RM	-	-	-	-	-	-
Hilera 3: 1,2 g/l de BCP o RM	-	-	-	-	-	-
Hilera 4: 0,6 g/l de BCP o RM	-	-	-	-	-	-
Hilera 5: 0,3 g/l de BCP o RM	-	-	-	-	-	-
Hilera 6: 0,15 g/l de BCP o RM	-	-	-	-	-	-
Hilera 7: 0,075 g/l de BCP o RM	-	-	-	-	-	-
Hilera 8: Sin indicador de pH	-	-	-	-	-	-

35 Las placas n.º 1 y n.º 2 se introdujeron en el espectrofotómetro SYNERGY 4 y las lecturas de absorbancia se tomaron a 590 nm. Adicionalmente, se tomaron también lecturas de excitación/emisión de fluorescencia a 435 nm/530 nm (Ver Tablas 21A-B).

Tabla 21A: Inhibición de la detección de naranja de acridina por BCP

Hilera [BCP] inicial	1:50 AO		1:100 AO		1:200 AO	
	590 nm	435/530 nm	590 nm	435/530 nm	590 nm	435/530 nm
4,8 g/l de BCP	**	94,5	**	111,0	**	88,0
2,4 g/l de BCP	3,709	173,0	**	176,5	3,991	163,0
1,2 g/l de BCP	2,189	267,0	2,243	299,5	2,427	338,0
0,6 g/l de BCP	1,244	399,0	1,236	505,5	1,305	531,5
0,3 g/l de BCP	0,726	552,0	0,713	717,0	0,645	717,0

## ES 2 687 181 T3

0,15 g/l de BCP	0,401	635,0	0,408	821,0	0,400	904,5
0,075 g/l de BCP	0,264	670,5	0,274	912,0	0,241	958,0
0 BCP	0,139	758,5	0,128	1059,0	0,101	1114,5

\*\* Señal por encima del umbral de detección del instrumento

*Tabla 21B: Inhibición de la detección de naranja de acridina por BCP*

Hilera	1:400		1:800		Sin AO	
[BCP] inicial	590	435/530	590	435/530	590	435/530
4,8 g/l de BCP	**	73,5	**	45,5	**	7,5
2,4 g/l de BCP	**	105,5	**	80,5	**	16,0
1,2 g/l de BCP	2,194	255,5	2,488	184,0	2,190	29,5
0,6 g/l de BCP	1,325	445,0	1,318	289,0	1,223	48,5
0,3 g/l de BCP	0,684	607,0	0,653	418,0	0,696	67,5
0,15 g/l de BCP	0,389	746,5	0,373	486,5	0,402	84,5
0,075 g/l de BCP	0,269	838,0	0,234	535,0	0,278	97,0
0 BCP	0,117	941,0	0,098	635,5	0,123	116,0

5 \*\* Señal por encima del umbral de detección del instrumento

Para todas las concentraciones de naranja de acridina, a medida que la cantidad de púrpura de bromocresol en solución disminuye, la señal generada por el naranja de acridina aumenta. En otras palabras, la presencia de BCP enmascara la señal del naranja de acridina. Por ejemplo, para la hilera con una concentración inicial de BCP de 0,3 g/l, entre aproximadamente 27-36 % de la señal de fluorescencia del naranja de acridina se pierde, en comparación con la hilera con 0 BCP.

10

*Tabla 22A: Inhibición de detección con naranja de acridina con rojo de metilo*

Hilera	1:50 AO		1:100 AO		1:200 AO	
[RM] inicial	590 nm	435/530 nm	590 nm	435/530 nm	590 nm	435/530 nm
4,8 g/l de RM	**	364,0	**	473,5	**	540,5
2,4 g/l de RM	2,211	484,5	3,835	434,5	1,848	470,0
1,2 g/l de RM	2,466	462,0	1,102	672,5	0,889	579,0
0,6 g/l de RM	0,733	656,0	1,238	768,5	1,075	612,0
0,3 g/l de RM	0,571	722,0	0,412	996,0	1,693	882,0
0,15 g/l de RM	1,123	664,0	0,644	940,5	0,882	891,5
0,075 g/l de RM	0,588	694,0	0,377	1036,0	0,367	1066,5
0 RM	0,566	741,5	0,390	1048,5	0,303	1053,5

15 \*\* Señal por encima del umbral de detección del instrumento

*Tabla 22B: Inhibición de detección con naranja de acridina con rojo de metilo*

Hilera	1:400 AO		1:800 AO		Sin AO	
[RM] inicial	590 nm	435/530 nm	590 nm	435/530 nm	590 nm	435/530 nm
4,8 g/l de RM	0,517	390,0	**	329,0	**	27,0
2,4 g/l de RM	1,806	476,5	3,764	248,0	3,236	35,0
1,2 g/l de RM	3,938	401,5	2,821	327,0	2,488	48,5
0,6 g/l de RM	1,883	599,0	1,571	456,5	1,604	71,0
0,3 g/l de RM	0,892	733,0	1,398	478,5	0,879	81,5
0,15 g/l de RM	0,751	741,5	0,441	543,0	0,330	93,5
0,075 g/l de RM	0,292	891,5	0,293	622,0	0,245	109,0
0 RM	0,275	876,0	0,232	658,0	0,247	116,5

\*\* Señal por encima del umbral de detección del instrumento

20

Como BCP, el rojo de metilo también enmascara la señal del naranja de acridina. Cuanto mayor sea la concentración de rojo de metilo, menor será la señal de fluorescencia detectada del naranja de acridina. Por ejemplo, para la hilera con una concentración inicial de rojo de metilo 0,3 g/l, entre aproximadamente 3-27 % de la señal de fluorescencia del naranja de acridina se pierde, en comparación con la hilera sin rojo de metilo (ver Tablas 22A-B).

25

Ejemplos 1-3: Detección de una actividad biológica

Los indicadores biológicos 3M ATTEST 1291 Rapid Readout se obtienen de 3M Company, St. Paul, MN. La membrana de nailon cargada (membrana de nailon cargada MAGNAPROBE de 0,45 micrómetros, número de pieza NP0HY00010) se obtiene de GE Osmonics Labstore (Minnetonka, MN).

Se retiran los tapones de los indicadores biológicos y se retiran las ampollas de vidrio invirtiendo el tubo indicador biológico. Las ampollas se dejan a un lado para su uso posterior. La membrana de nailon se corta en tiras pequeñas (0,5 cm x 2 cm). Se coloca una tira (longitudinalmente) adyacente a la pared en la parte inferior de los tubos de indicador biológico y la ampolla de vidrio se sustituye en cada tubo. Las tapas se vuelven a colocar cuidadosamente en cada tubo.

Los indicadores biológicos modificados se exponen a vapor durante varios tiempos (que se muestran en la Tabla 23). La exposición al vapor se lleva a cabo en vapor por gravedad a 132 °C/270 °F en un H&W Steam Resistometer (comercializado por H&W Technology LLC, Rochester, NY). Después de la exposición al vapor, los indicadores biológicos se dejan enfriar y las ampollas se aplastan en los indicadores biológicos según las instrucciones del fabricante.

Las ampollas se ponen en un incubador a 56 °C y se retiran periódicamente (p. ej., después de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, y/o 72 horas) para observar el color del medio líquido, el color de la membrana de nailon, y la fluorescencia del medio líquido. La fluorescencia puede detectarse visualmente iluminando los tubos con una fuente de luz ultravioleta de mano o, alternativamente, los tubos (o el líquido de los mismos) pueden ponerse en un fluorímetro adecuado para medir la fluorescencia.

Los indicadores biológicos que están sometidos a poca o ninguna exposición al vapor (p. ej., 0-1 minutos de exposición al vapor) mostrarán la conversión del indicador de pH (púrpura de bromocresol) de púrpura a amarillo en el caldo y en la membrana de nailon. Estos indicadores biológicos también mostrarán una conversión sustancial del sustrato enzimático fluorogénico a un producto final fluorescente (4-metilumbeliferona).

Los indicadores biológicos que se someten a una exposición letal al vapor (p. ej., ≥ 15 minutos) mostrarán acumulación del púrpura de bromocresol en la membrana de nailon, pero no mostrarán una conversión sustancial del indicador de púrpura a amarillo. Estos indicadores biológicos no mostrarán una conversión sustancial del sustrato enzimático fluorogénico a un producto final fluorescente.

*Tabla 23. Sustrato en la primera posición - Fluorescencia*

Ejemplo núm.	Exposición al vapor (minutos)
1	0
2	1
3	15

Ejemplo preparatorio 1 - Preparación de un indicador de esterilización biológico (BI)

Para ilustrar la presente descripción, se prepararon varios indicadores de esterilización biológicos (BI), según las descripciones anteriormente proporcionadas y como se muestra en las Figs. 4-7. Se proporcionan a continuación detalles concretos de los BI utilizados en los ejemplos.

Como se muestra en las Figs. 4-7, el indicador 100 de esterilización biológico incluía un bastidor 102, que contenía una primera parte 104 (p. ej., un tubo hueco) y una segunda parte 106 (p. ej., un tapón) que estaban acopladas entre sí para proporcionar un indicador de esterilización biológico autocontenido. El tapón era de polipropileno moldeado, con unas dimensiones generales de aproximadamente 21 mm de longitud por 14 mm de diámetro. La primera parte 104 (tubo hueco) era de policarbonato moldeado, con las dimensiones generales de aproximadamente 52 mm de longitud y 12 mm de diámetro en la parte superior, con la forma mostrada en las Figs. 4-6. El volumen total de la primera parte 104 (p. ej., un tubo hueco) era aproximadamente de 3 ml.

Como se muestra en las Figs. 4-6, la segunda parte (tapón) 106 del bastidor 102 incluía 6 aperturas o aberturas 107, que proporcionaban comunicación de fluidos entre el interior del bastidor 102 (p. ej., el depósito 103) y el ambiente. Un material de papel de filtro (no mostrado en las Figs. 4-6) que actuó como barrera; se colocó en la ruta del esterilizante sobre las aperturas 107 y se mantuvo en su sitio con una etiqueta de papel que tenía un adhesivo sensible a la presión en la parte posterior. El material de papel de filtro era el mismo material presente en el tapón de los indicadores biológicos comerciales 3M ATTEST 1291 Rapid Readout para esterilizadores de vapor, comercializados por 3M Company de St. Paul, MN.

El indicador 100 de esterilización biológico incluía además un recipiente frangible 120 que contenía medio 122 de crecimiento líquido. El recipiente frangible 120 estaba hecho de vidrio de borosilicato y contenía el medio de crecimiento de las esporas. El medio consistía en un caldo de soja tríplico (TSB) que contenía un indicador de pH de púrpura de bromocresol, y un sustrato enzimático fluorescente de 4-metilumbeliferil-alfa-D-glucósido. La

ampolla tenía aproximadamente 40 mm de longitud por aproximadamente 4 mm de diámetro, y contenía aproximadamente 500 µl de medio líquido. El medio 122 de crecimiento líquido era el mismo medio usado en el producto actualmente comercializado por 3M Company de St. Paul, MN como indicadores biológicos comerciales 3M ATTEST 1291 Rapid Readout para esterilizadores de vapor.

5 Como se muestra en las Figs. 4-7, el recipiente 120 de medio líquido se mantuvo dentro del indicador 100 de esterilización biológico mediante una inserción 130. La inserción (también denominada disyuntor) 130 sirvió para sujetar el recipiente 120 en su sitio y funcionar para facilitar la rotura controlada del recipiente 120, que se produce durante una etapa de activación del BI, cuando la segunda parte 106 se empujó para romper el  
10 recipiente 120 de medio líquido. La inserción 130 era una estructura de policarbonato moldeada con una dimensión aproximada de 22 mm de longitud por 9 mm de anchura.

15 La segunda parte 106 tenía un saliente 156 de sellado situado para entrar en contacto con el primer extremo 101 de la primera parte 104, en el extremo 157 superior abierto de la primera parte 104 para sellar o precintar (p. ej., sellar herméticamente) el indicador 100 de esterilización biológico tras la activación.

20 El indicador 100 de esterilización biológico incluía además esporas 115 de *G. stearothermophilus* (ATCC 7953) colocadas en comunicación de fluidos con la primera parte 104. Las esporas 115 se depositaron en un depósito 136 de esporas de un soporte 135 de esporas de polipropileno (9 mm x 4 mm). Las esporas 115 se depositaron directamente sobre la superficie de polipropileno, y el depósito 136 de esporas tenía un volumen de aproximadamente 15 µl.

25 El bastidor 102 incluía una parte inferior 114 (que definía al menos parcialmente una primera cámara 109) y una parte superior 116 (que definía al menos parcialmente una segunda cámara 111), que estaban parcialmente separadas por una pared interna parcial o repisa 118, en la que se formó una abertura 117 que proporcionó comunicación de fluidos entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111. La segunda cámara 111 se adaptó para alojar las esporas 115. La primera cámara 109 se adaptó para alojar el recipiente frangible 120, especialmente antes de la activación. La pared 118 estaba angulada o inclinada, en un ángulo no cero y no recto con respecto a la dirección longitudinal del bastidor 102, como se muestra en las Figs. 4-7.

30 La segunda cámara 111, que también se puede denominar “cámara de crecimiento de las esporas” o “cámara de detección”, incluía un volumen a cuestionar respecto a la viabilidad de las esporas para determinar la eficacia de un proceso de esterilización.

35 El recipiente 120 de medio líquido se colocó y se mantuvo en la primera cámara 109 durante la esterilización y cuando el recipiente 120 estaba sin fracturar. Las esporas 115 se alojaron en la segunda cámara 111 y en comunicación de fluidos con el ambiente durante la esterilización. El esterilizante se desplazó al interior de la segunda cámara 111 (p. ej., mediante la primera cámara 109) durante la esterilización. Después, el medio líquido 122 se desplaza al interior de la segunda cámara 111 (p. ej., desde la primera cámara 109) durante la activación, cuando el recipiente 120 se fractura y el líquido 122 se libera al interior del bastidor 102.

40 La primera cámara 109 tenía un volumen de aproximadamente 2800 microlitros (vacío de todos los componentes internos). El área seccional transversal de la primera cámara 109, inmediatamente por encima de la pared 118 era de aproximadamente 50 mm<sup>2</sup>. La segunda cámara 111 tenía un volumen de aproximadamente 210 microlitros. El área seccional transversal de la segunda cámara 111, inmediatamente por debajo de la pared  
45 118, era de aproximadamente 20 mm<sup>2</sup>.

50 El indicador 100 de esterilización biológico incluía además un sustrato 119. El sustrato 119 tenía un tamaño aproximado de 9 mm x 8 mm, y estaba dimensionado para quedar encima de la pared 118. El sustrato 119 estaba colocado entre la primera cámara 109 y la segunda cámara 111 del indicador 100 de esterilización biológico. El sustrato 119 incluía una apertura 121 formada a su través de aproximadamente 3,2 mm (0,125 pulgadas) de diámetro, el orificio estaba aproximadamente centrado en el sustrato. El sustrato 119 estaba situado entre (p. ej., intercalado entre) la inserción 130 y la pared 118. El sustrato 119 estaba formado de un nailon cargado, y especialmente, era una membrana de transferencia cargada para resonado comercializada por GE Water & Process Technologies, Trevose, PA, con la designación comercial “MAGNAPROBE” (tamaño de poro de  
55 0,45 micrómetros, rodillo de 30 cm X 3 m, n.º de catálogo NP0HY00010, n.º de material 1226566).

60 El indicador 100 de esterilización biológico tenía una característica 162 de venteo como se muestra en la Fig. 7, situada para acoplar de forma fluida la segunda cámara 111 con la primera cámara 109. Además, como se muestra en la Fig. 7, el indicador 100 de esterilización biológico tenía una arista o saliente 165 que estaba formado íntegramente con una pared 108 del bastidor 102, que estaba situado para mantener el soporte 135 de esporas en una ubicación deseada del bastidor 102.

65 El bastidor 102 estaba ahusado (véase, p. ej., la parte ahusada 146 de la Fig. 6) de forma que el área de la sección transversal del bastidor 102 disminuía generalmente a lo largo de la dirección longitudinal D<sub>L</sub>.

Ejemplo 1 - Correlación de las lecturas de fluorescencia con el crecimiento después de 24 horas

Los indicadores biológicos (BI) con el diseño mostrado en las Figs. 4-7 y anteriormente descritos en el Ejemplo 1 preparatorio se construyeron con  $\sim 1 \times 10^7$  UFC de un cultivo de esporas de *G. stearothermophilus* ATCC 7953. Algunos de los BI (los resultados se muestran en las Tablas 26 y 27 y se tratan más adelante) se fabricaron sin el material de sustrato. El medio 122 de crecimiento líquido era el mismo que el usado en los indicadores biológicos comerciales 3M ATTEST 1292 Rapid Readout para esterilizadores de vapor, comercializados por 3M Company de St. Paul. A continuación, cada BI se sometió a un ciclo de esterilización con vapor de duraciones variables de 1 minuto, 1 minuto 45 segundos, 2 minutos, 2 minutos 15 segundos, 2 minutos 30 segundos, y 3 minutos a 132 °C/270 °F de vapor por gravedad en un H&W Steam Resistometer (comercializado por H&W **Technology LLC**, Rochester, NY). Tras la esterilización, los BI se dejaron enfriar y se activaron en un aparato de lectura 490 AUTOREADER, comercializado por 3M Company, St. Paul, MN, análogo al aparato de lectura 290 AUTOREADER, comercializado por 3M Company; algunas características del aparato de lectura 490 AUTOREADER se describen en las solicitudes en trámite US-61/409042 (n.º de expediente 66175US002) y 61/408997 (n.º de expediente 66176US002). Las lecturas fluorescentes a una excitación/emisión de 365/460 nm se tomaron cada 1 minuto durante 60 minutos. Si se detectó fluorescencia, se notificó como “SÍ”; si no se detectó fluorescencia, se notificó como “NF” (es decir, no fluorescencia). Además, después de 24 horas de incubación en el aparato de lectura, los BI se retiraron y se evaluaron para determinar el crecimiento, según un cambio de color (del indicador de pH) en el medio de púrpura a amarillo. Si se observó cambio de color, se notificó como “SÍ”; si no se observó cambio de color, se notificó como “NO”.

Los resultados mostrados en la Tabla 24 y la Tabla 25, siguientes, indican una buena correlación entre los resultados de fluorescencia y los resultados de confirmación del crecimiento a las 24 horas, cuando el sustrato se coloca en la primera ubicación de todos los BI expuestos a todas las duraciones de los ciclos de esterilización.

Los resultados mostrados en la Tabla 26 y la Tabla 27, siguientes, indican resultados incoherentes observados para los BI cuando no había sustrato presente, especialmente para los ciclos de tiempo de 2 minutos 15 segundos, 2 minutos 30 segundos y 3 minutos.

Tabla 24. Observaciones de fluorescencia

Duración del ciclo	Fluorescencia; n=5				
1:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
1:45	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:15	NF	SÍ	NF	SÍ	SÍ
2:30	NF	NF	NF	NF	NF
3:00	NF	NF	NF	NF	NF

Tabla 25. Observaciones de crecimiento (cambio de color, después de 24 h)

Duración del ciclo	Crecimiento después de 24 h; n=5				
1:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
1:45	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:15	NO	SÍ	NO	SÍ	SÍ
2:30	NO	NO	NO	NO	NO
3:00	NO	NO	NO	NO	NO

Tabla 26. Sin sustrato – Fluorescencia

Duración del ciclo	Fluorescencia; n=5				
1:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
1:45	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:15	SÍ	NF	NF	SÍ	SÍ
2:30	NF	NF	NF	NF	NF
3:00	NF	NF	NF	NF	NF



Tabla 27. Sin sustrato - Crecimiento después de 24 h

Duración del ciclo	Crecimiento después de 24 h; n=5				
1:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
1:45	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:00	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
2:15	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ
2:30	NO	NO	NO	NO	NO
3:00	NO	NO	NO	NO	NO

5 Entendiendo que los intervalos numéricos y los parámetros definidos en el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos definidos en los ejemplos específicos se han notificado tan precisamente como sea posible. Sin embargo, todos los valores numéricos incluyen inherentemente un rango necesariamente resultante de la desviación típica encontrada en las correspondientes medidas experimentales.

10 Todos los encabezados son para la conveniencia del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezado, a menos que así se especifique.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar una actividad enzimática, que comprende:

5                   Proporcionar

una muestra que puede comprender una fuente de una o más de actividades enzimáticas predeterminadas;  
 un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un primer espectro de absorbancia, en donde el primer reactivo indicador comprende un tinte indicador de pH o un tinte redox, en donde el primer reactivo indicador puede ser convertido por una primera actividad enzimática predeterminada a un primer derivado biológico;  
 un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por la primera actividad enzimática predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, en donde el segundo reactivo indicador comprende un sustrato enzimático fluorogénico;  
 un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador de una mezcla acuosa; en donde el sustrato comprende nailon cargado; y  
 un instrumento que detecta el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico, en donde el instrumento comprende una trayectoria óptica;

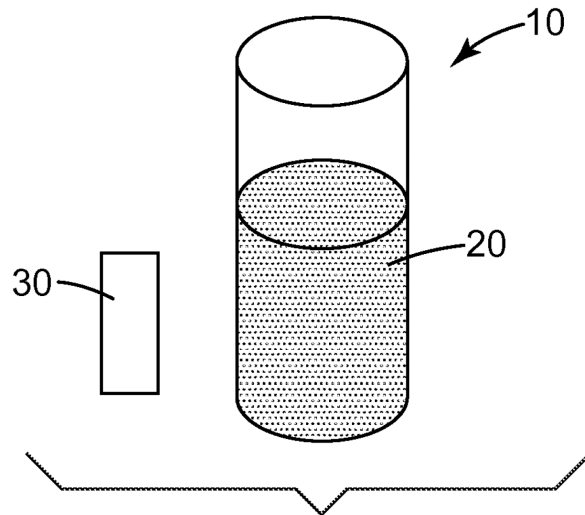
formar una primera mezcla acuosa que comprende la muestra, el primer reactivo indicador, y el segundo reactivo indicador;  
 poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar una segunda mezcla acuosa en la que una concentración del primer reactivo indicador es inferior a la concentración del primer reactivo indicador en la primera mezcla acuosa;  
 observar el sustrato para detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico; y  
 detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico, en donde detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico comprende usar el instrumento para detectar el segundo derivado biológico, en donde la trayectoria óptica no atraviesa ninguna parte del sustrato;  
 en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de las longitudes de onda presentes en el segundo espectro de emisión;  
 en donde detectar la presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico comprende detectar la presencia o ausencia de fluorescencia en la segunda mezcla acuosa.

- 2. El método de la reivindicación 1, que además comprende exponer la actividad enzimática a un esterilizante.
- 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende exponer la actividad enzimática a un cambio de temperatura durante un período de tiempo.
- 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer reactivo indicador comprende un cromóforo, en donde detectar el primer derivado biológico comprende detectar un color.
- 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el segundo reactivo indicador comprende un compuesto fluorogénico.
- 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde detectar la presencia o ausencia del segundo derivado biológico además comprende la medición de una cantidad del segundo derivado biológico.
- 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde detectar la presencia o ausencia del primer derivado biológico además comprende la medición de una cantidad del primer derivado biológico.
- 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende: proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador y el segundo derivado biológico; y usar el instrumento para detectar el primer reactivo indicador y el segundo derivado biológico.
- 9. Un método para detectar una actividad enzimática, que comprende:

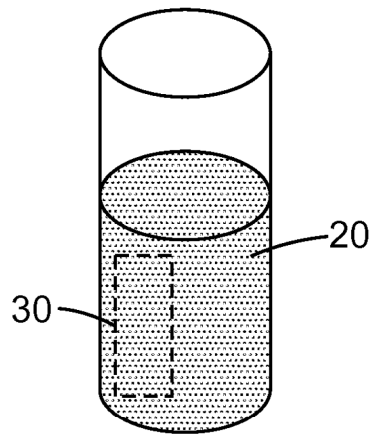
proporcionar un indicador de esterilización biológico que comprende;

un bastidor que comprende una primera y una segunda cámaras;  
 un recipiente que contiene un primer líquido acuoso, el recipiente dispuesto en una primera cámara, en donde al menos una parte del recipiente es frangible, comprendiendo el líquido un primer sistema indicador que comprende un primer reactivo indicador con un

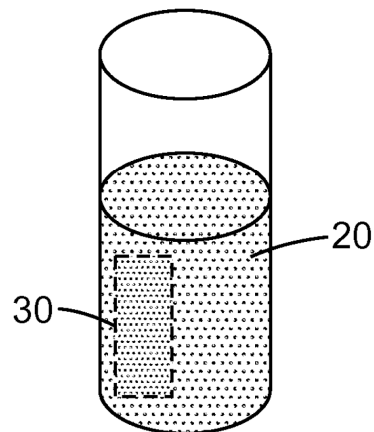
- 5 primer espectro de absorbancia y un segundo sistema indicador que comprende un segundo reactivo indicador que es convertido por una segunda actividad enzimática predeterminada a un segundo derivado biológico con un segundo espectro de emisión, en donde el primer reactivo indicador puede ser convertido por una primera actividad enzimática predeterminada a un primer derivado biológico, en donde el primer espectro de absorbancia incluye una absorbancia detectable en al menos una parte de longitudes de onda del segundo espectro de emisión;
- 10 en donde el primer reactivo indicador comprende un tinte indicador de pH o un tinte redox;  
en donde el segundo reactivo indicador comprende un sustrato enzimático fluorogénico
- 15 una fuente de la segunda actividad enzimática predeterminada dispuesta en una segunda cámara; y  
un sustrato que recibe y concentra el primer reactivo indicador del primer líquido acuoso, el sustrato dispuesto en el bastidor; en donde el sustrato comprende nailon cargado;
- 20 proporcionar un instrumento que detecta el primer reactivo indicador o el segundo derivado biológico, en donde el instrumento comprende una trayectoria óptica;  
formar una mezcla acuosa que comprende el primer líquido acuoso y la fuente de la segunda actividad enzimática predeterminada;  
poner la primera mezcla acuosa en comunicación de fluidos con el sustrato para formar un segundo líquido acuoso en el que la concentración del primer reactivo indicador es inferior a la  
25 concentración del primer reactivo indicador en el primer líquido acuoso;  
observar el sustrato para detectar el primer reactivo indicador o el primer derivado biológico; y  
detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del segundo derivado biológico en la segunda mezcla acuosa, en donde detectar una presencia o ausencia de fluorescencia del  
30 segundo derivado biológico comprende usar el instrumento para detectar el segundo derivado biológico, en donde la trayectoria óptica no atraviesa ninguna parte del sustrato.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el bastidor del indicador de esterilización biológico incluye:
- 35 una primera parte, y  
una segunda parte adaptada para acoplarse a la primera parte, siendo la segunda parte móvil con respecto a la primera parte, cuando se acopla a la primera parte, entre una primera posición y una segunda posición;  
en donde el método además comprende mover la segunda parte del bastidor desde la primera posición a la segunda posición;  
40 en donde mover la segunda parte del bastidor de la primera posición a la segunda posición libera el primer líquido acuoso del envase.



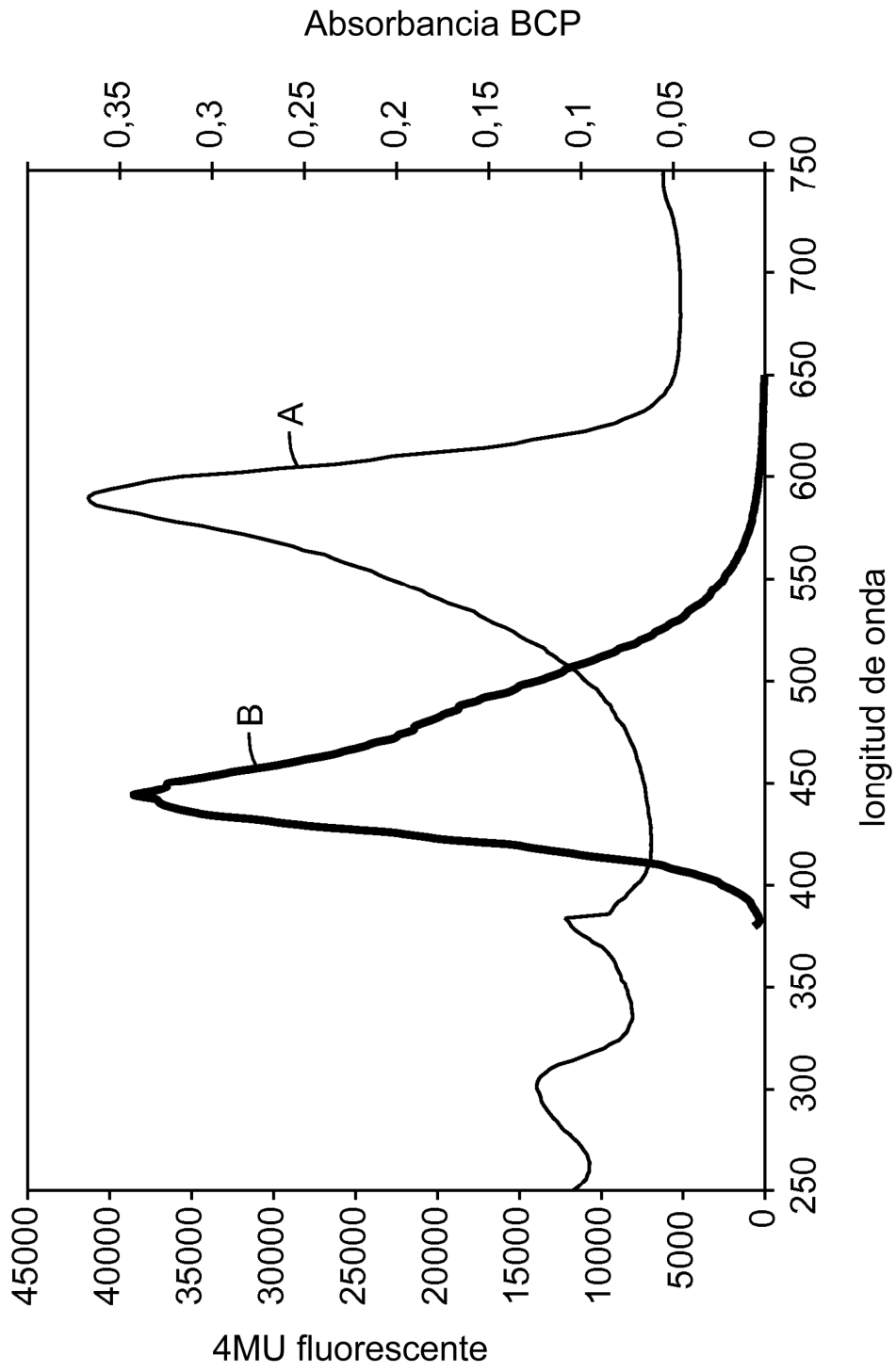
**FIG. 1A**



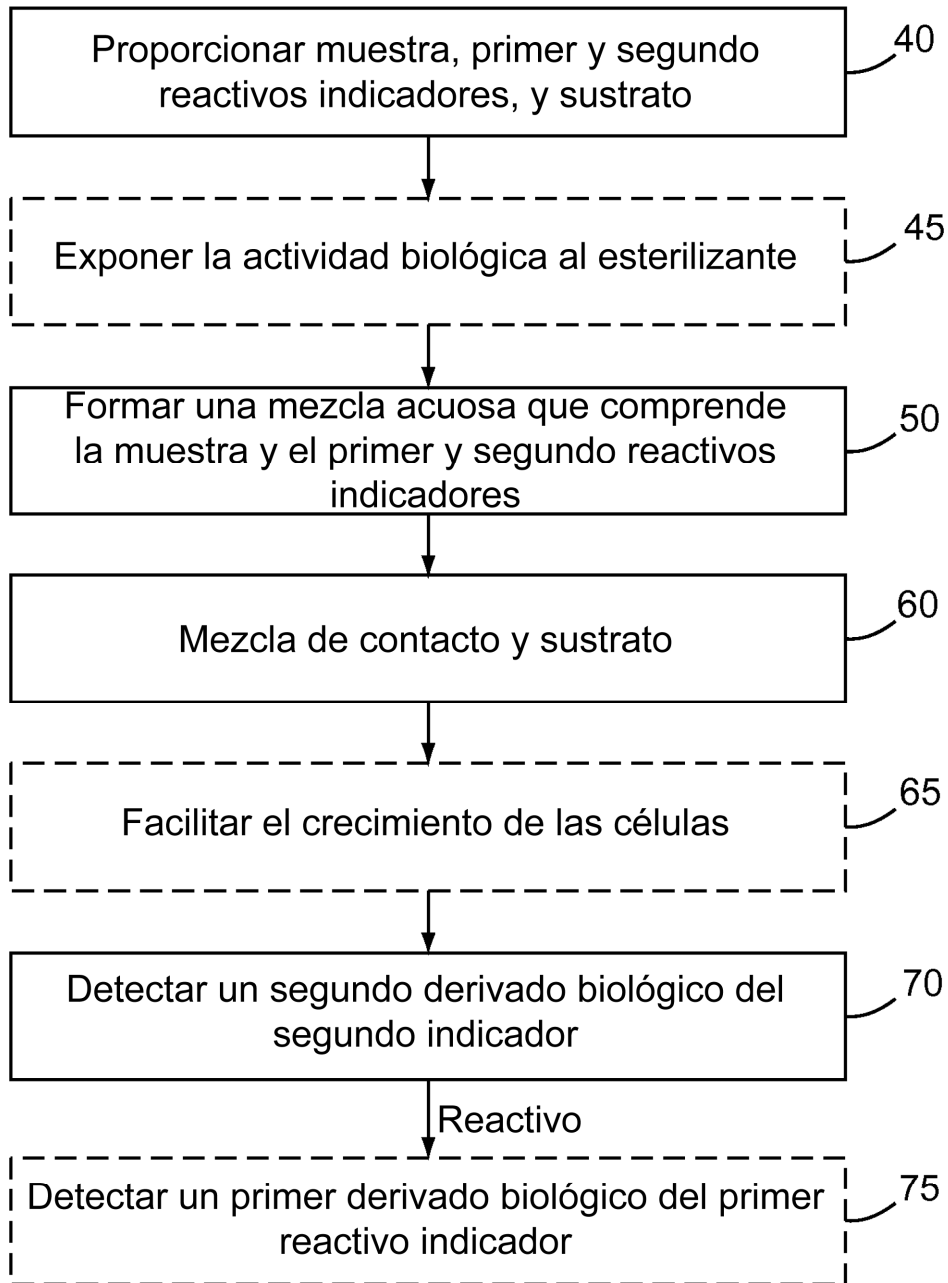
**FIG. 1B**



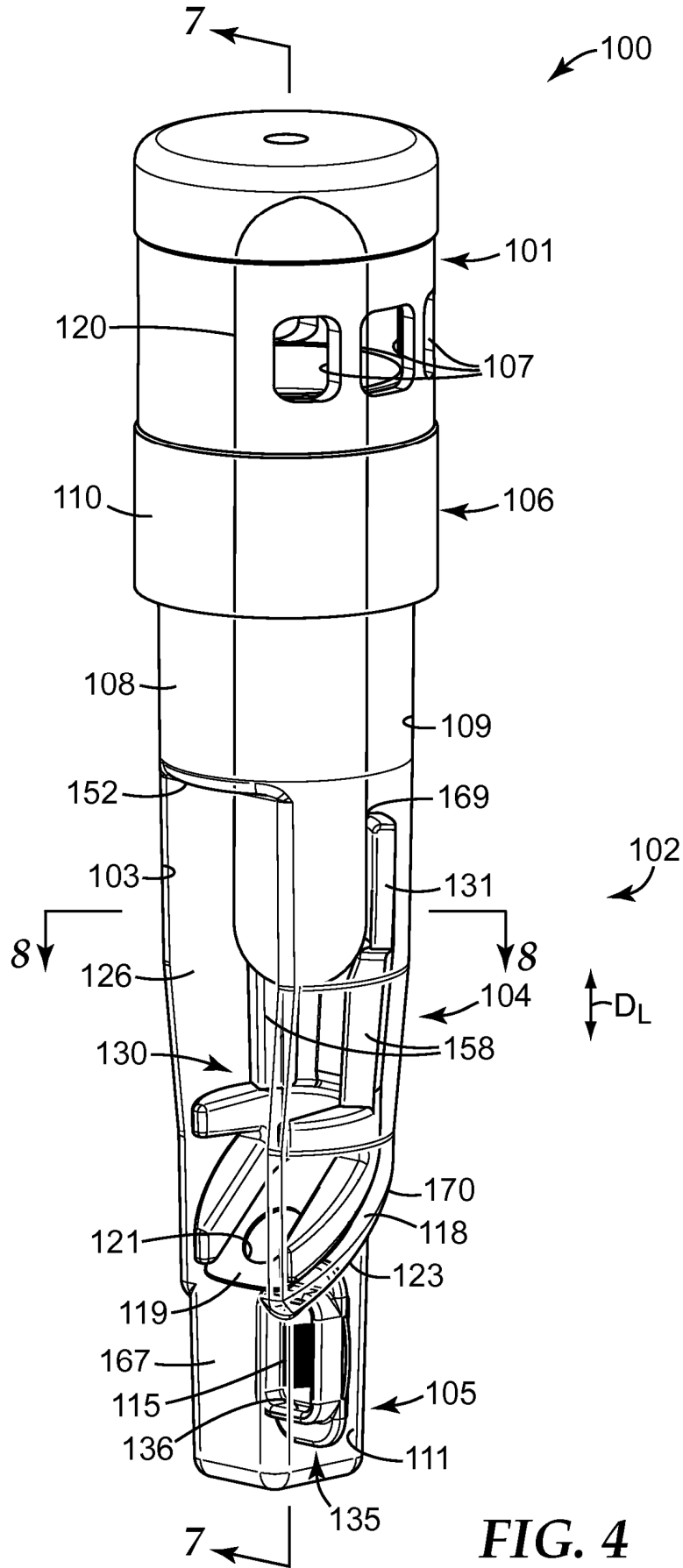
**FIG. 1C**

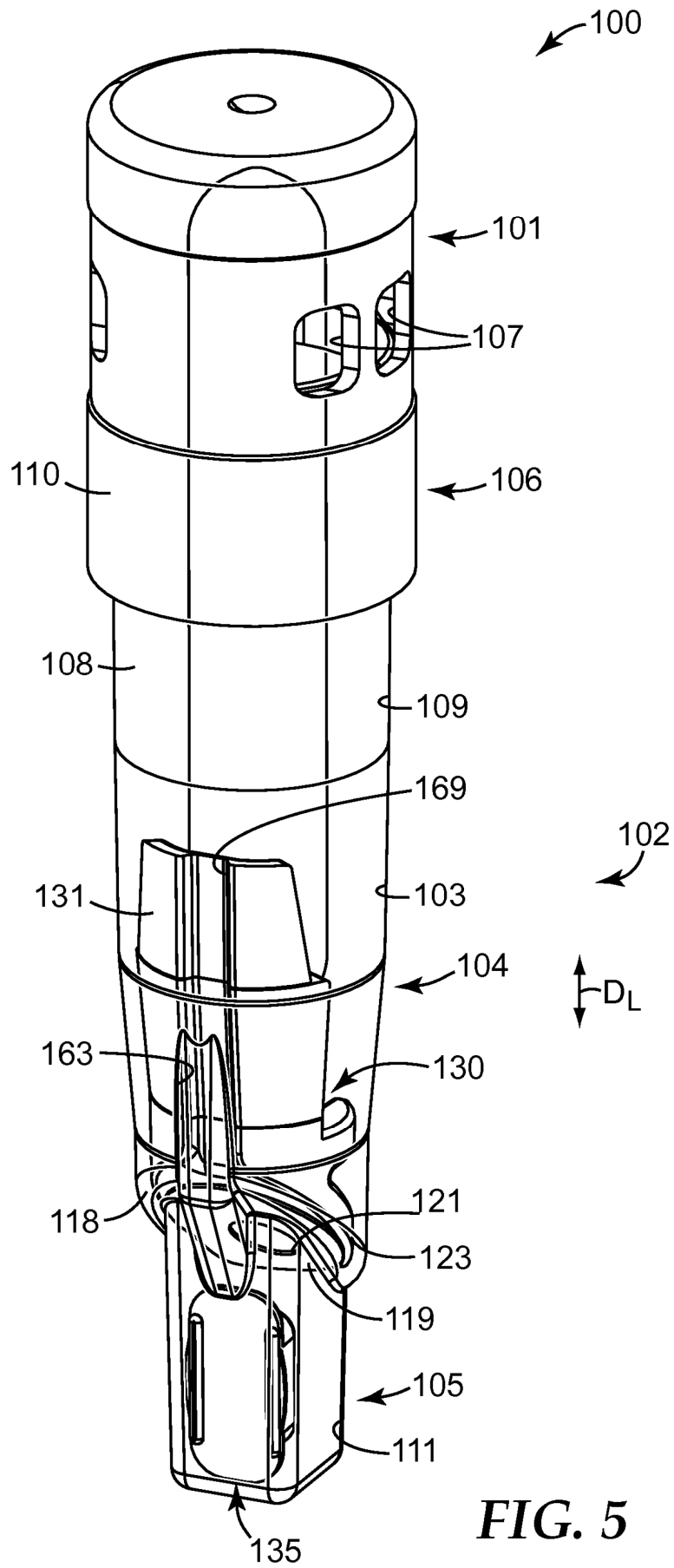


**FIG. 2**



**FIG. 3**







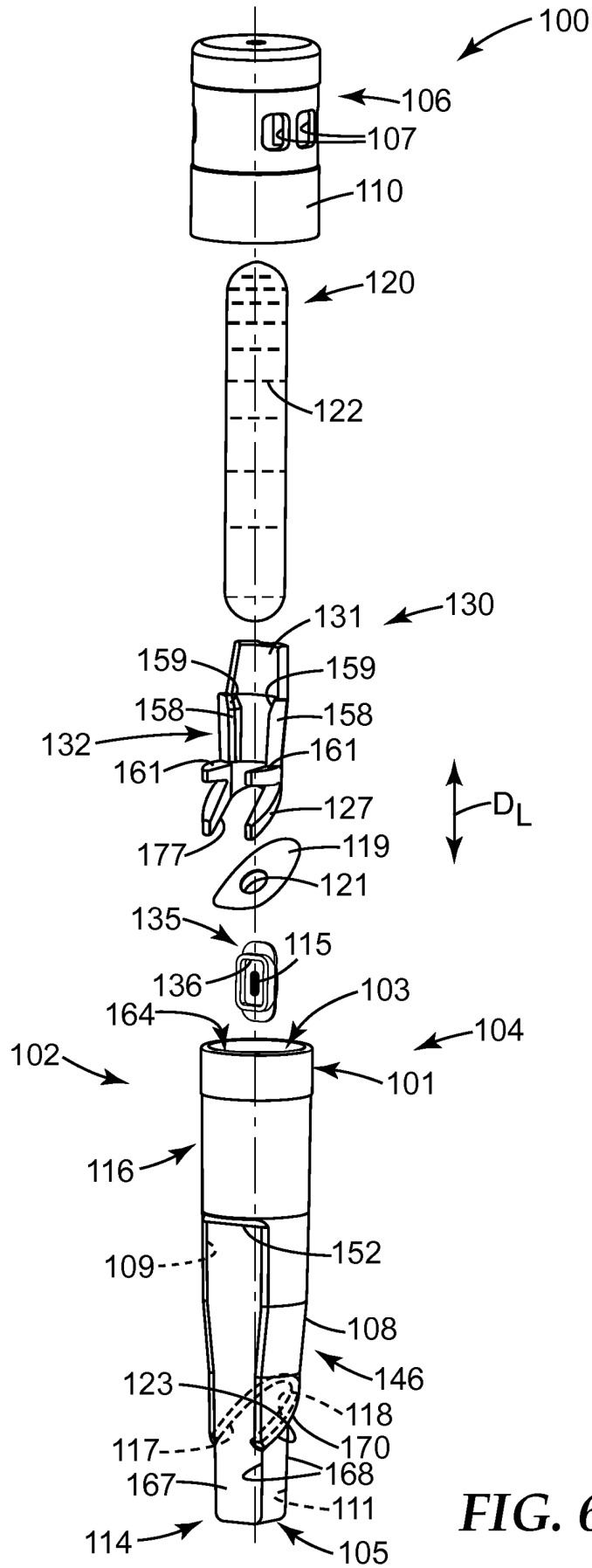
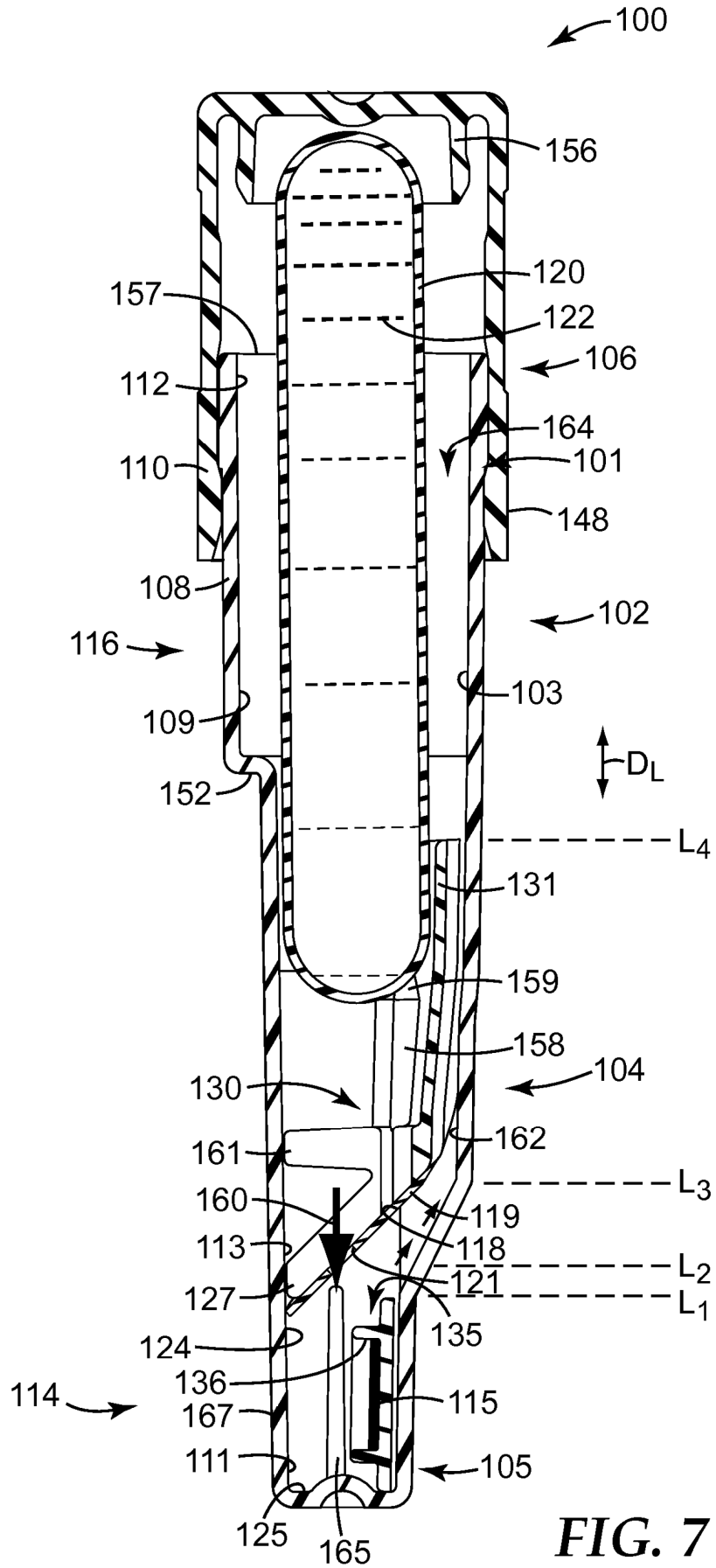
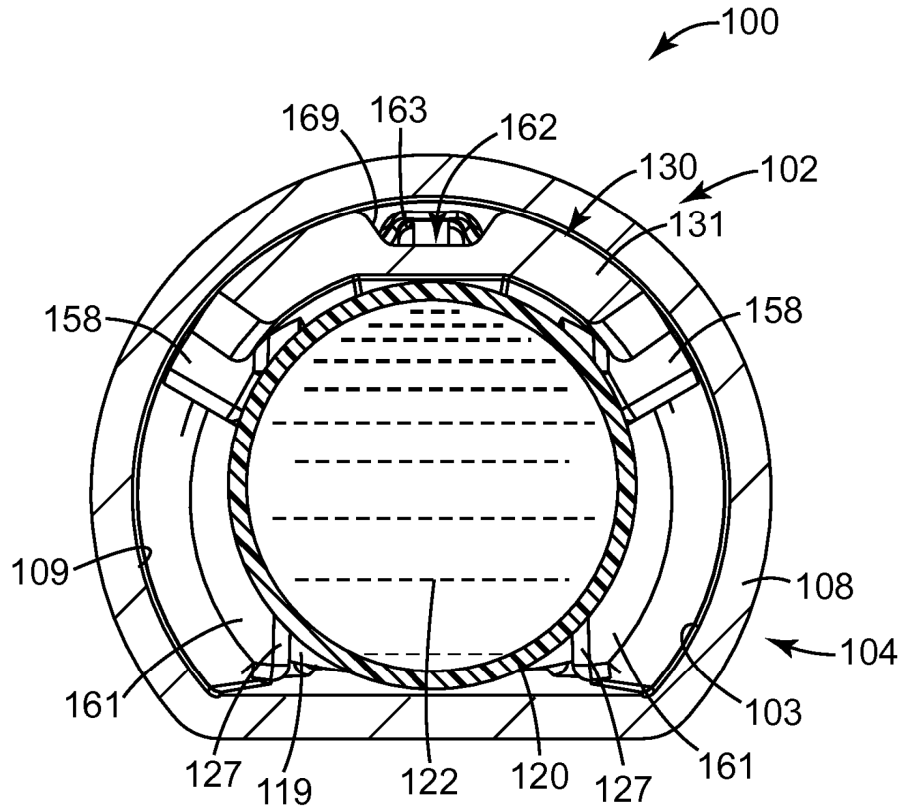
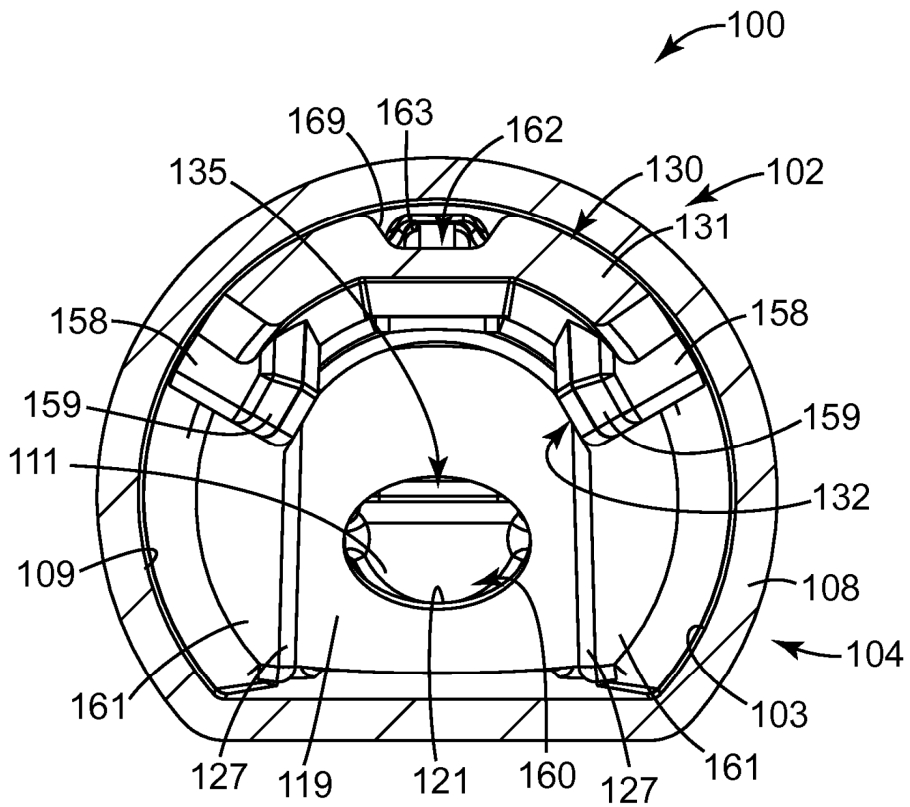


FIG. 6

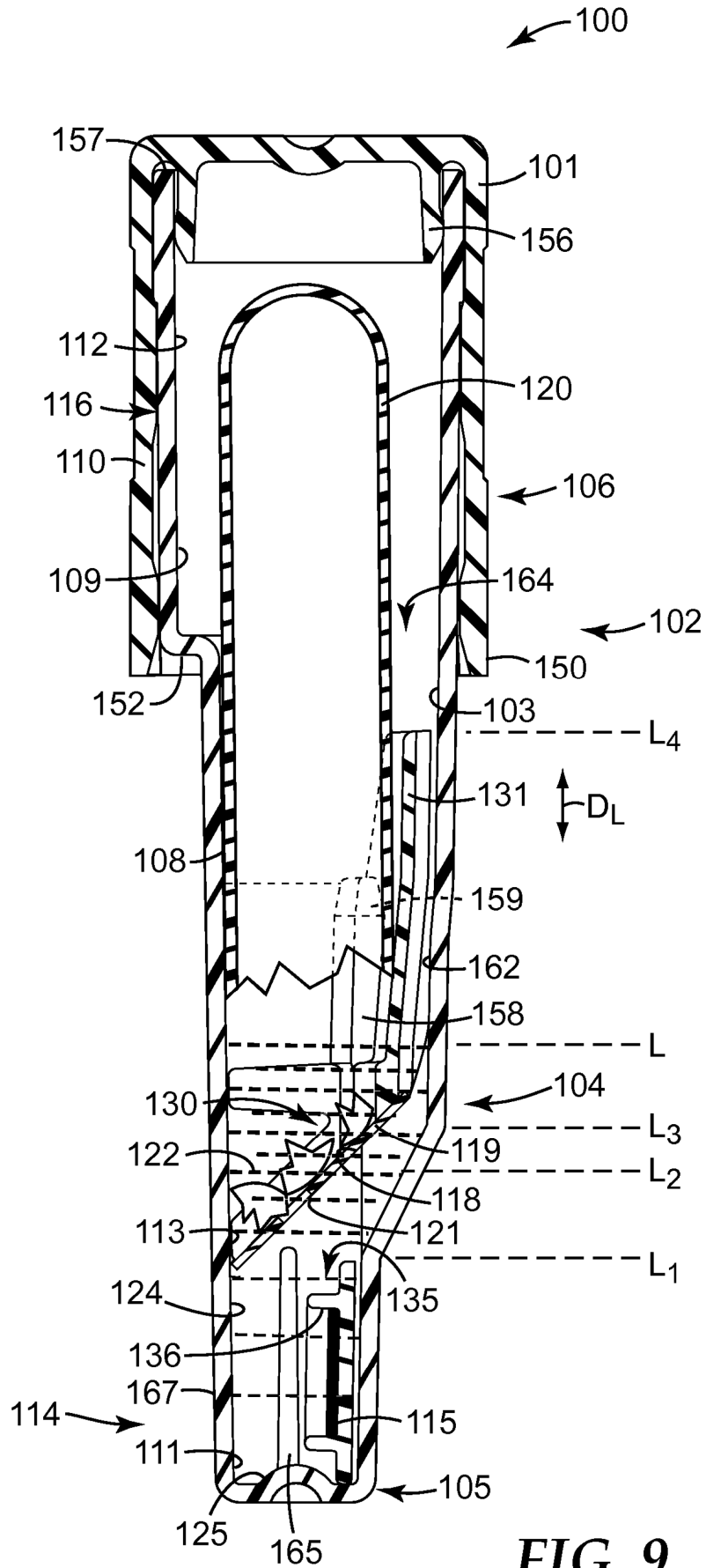




**FIG. 8**



**FIG. 10**



**FIG. 9**