

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 646**

51 Int. Cl.:

C12N 15/75 (2006.01)

C12Q 1/22 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2014 PCT/US2014/017903**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014 E 14709493 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2970992**

54 Título: **Indicador de esterilización que incluye un indicador biológico simplificado genéticamente manipulado**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313832019

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

04.12.2018

73 Titular/es:

**AMERICAN STERILIZER COMPANY (100.0%)
5960 Heisley Road
Mentor, OH 44060, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 692 646 T3

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

DESCRIPCIÓN

Indicador de esterilización que incluye un indicador biológico simplificado genéticamente manipulado

5 Antecedentes

Los presentes inventores divulgaron previamente un indicador biológico genéticamente manipulado que comprende al menos un organismo de prueba y al menos un gen indicador para producir una enzima indicadora, el gen indicador es absorbido por el organismo de prueba, el organismo de prueba comprende esporas bacterianas; y al menos un gen represor que inhibe la expresión del gen indicador hasta que el gen indicador se expone a al menos un inductor; en donde el indicador biológico genéticamente manipulado es un componente de un indicador biológico autónomo, por ejemplo, un sistema de dos compartimentos tal como una combinación de vial y tapa, el sistema de dos compartimentos contiene además un medio de crecimiento para el indicador biológico genéticamente manipulado. Véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 8.372.624.

15 El documento US 2008/070231 A1 divulga indicadores biológicos genéticamente manipulados.

Albert et al. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85 (5), 865-874 divulga indicadores biológicos para la esterilización con vapor.

20 El documento WO 2008/079469 A2, WO 2008/079469 A2 divulga indicadores biológicos genéticamente manipulados.

El documento US 5 770 393 A divulga indicadores biológicos para la detección de actividad metabólica temprana.

25 En el sistema y método de indicador biológico genéticamente manipulado divulgados en el documento US 8372624, el gen represor inhibe la expresión del gen indicador hasta que el sistema se expone al inductor. Se han encontrado varios problemas en el uso de este sistema y método, incluyendo la descoloración del indicador debido a la degradación del inductor y/o problemas referentes al gen represor que, como el gen indicador, debe ser absorbido por el organismo de prueba. La descoloración se ha observado, por ejemplo, cuando el sistema se calienta durante el proceso de esterilización o en el procesamiento para producir el sistema indicador biológico genéticamente manipulado. Se cree que el inductor, por ejemplo, xilosa, se degrada por el calentamiento u otro proceso de esterilización (por ejemplo, por procesos de esterilización oxidativa, tal como peróxido de hidrógeno vapor, óxido de etileno, etc.) y se vuelve marrón o se descolora de otra manera. Este volverse marrón o descoloración produce interferencia con la detección de cualquier cambio asociado con un resultado que muestra el fallo de la esterilización. Esto es, comprensiblemente, indeseable, ya que produce sensibilidad reducida de la prueba. Se requirió previamente que el inductor superara los efectos del gen represor. Al omitir el gen represor, ya no hay ninguna necesidad de usar el inductor, y por tanto el problema de volverse marrón o descoloración resultante del inductor se puede evitar. Además, como se reconocerá, la necesidad para incluir el gen represor en el vector usado para inducir que el organismo de prueba absorba el gen indicador solo aumenta la complejidad de proceso global usado para fabricar el sistema indicador biológico genéticamente manipulado. Estos problemas se han mantenido en necesidad de una solución.

Compendio

45 Los problemas anteriores se resuelven según el objeto de las reivindicaciones independientes. Las formas de realización preferidas resultan de las subreivindicaciones.

50 Por tanto, se han encontrado problemas con el uso de este sistema, y los presentes inventores han abordado este problema desarrollando la presente invención. Los presentes inventores han desarrollado un nuevo indicador biológico genéticamente manipulado que incluye, como el sistema previo, al menos un organismo de prueba y al menos un gen indicador para producir una enzima indicadora, el gen indicador es absorbido por el organismo de prueba, el organismo de prueba comprende esporas bacterianas; en donde el indicador biológico genéticamente manipulado es un componente de un indicador biológico autónomo. Sin embargo, la presente invención no requiere, y de hecho excluye, el gen represor y el inductor, que eran requeridos por el sistema y método del indicador biológico genéticamente manipulado divulgados en el documento US 8372624.

55 Por tanto, según una forma de realización de la presente invención, se proporciona un indicador de esterilización, que comprende: un primer compartimento que contiene un indicador biológico genéticamente manipulado, el primer compartimento está adaptado para permitir que el indicador biológico entre en contacto con un medio de esterilización durante la esterilización; y

60 un segundo compartimento que contiene al menos un sustrato de enzima, el segundo compartimento está adaptado para mantener el sustrato de enzima separado del indicador biológico durante la esterilización, y el segundo compartimento está adaptado para permitir que el sustrato de enzima entre en contacto con el indicador biológico después de que el indicador biológico se haya expuesto el medio de esterilización;

65

en donde el indicador biológico genéticamente manipulado comprende al menos un microorganismo y al menos un gen indicador adecuado para producir una enzima indicadora, en donde el gen indicador comprende *lacZ*, *bgaB*, *xyIE*, *cat*, o una mezcla de dos o más de los mismos;

5 en donde el microorganismo en el indicador de esterilización está libre de cualquier gen represor activo o activable que inhibiría la expresión del gen indicador si estuviera presente en el microorganismo o indicador de esterilización, y

en donde la enzima indicadora y el sustrato enzimático se seleccionan de modo que la acción enzimática de la enzima indicadora sobre el sustrato enzimático produzca una señal detectable.

10 En una forma de realización, el microorganismo comprende esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y/o *Bacillus atrophaeus*.

15 En una forma de realización, la enzima indicadora comprende beta-D-galactosidasa, beta-D-galactosidasa termoestable cloranfenicol acetiltransferasa, catecol-2,3-desoxigenasa, o una mezcla de dos o más de las mismas.

En una forma de realización, el gen indicador comprende *lacZ* o *bgaB*, y la enzima indicadora comprende beta-D-galactosidasa.

20 En una forma de realización, el virus comprende al menos un transportador de genes que comprende ácido nucleico rodeado por una cápside, el transportador de genes comprende un gen indicador y está libre de cualquier gen represor. En una forma de realización, el virus comprende al menos un bacteriófago. En una forma de realización, el virus comprende el bacteriófago lambda o M13.

25 Según otra forma de realización de la presente invención, se proporciona un proceso de esterilización, que comprende:

exponer un artículo que se va a esterilizar y el indicador de esterilización a un medio de esterilización;

30 combinar los contenidos del primer compartimento y el segundo compartimento;

incubar los contenidos combinados del primer compartimento y el segundo compartimento; y

35 determinar la eficacia del proceso de esterilización detectando la presencia o ausencia de la señal detectable después de la incubación.

En una forma de realización, en el proceso de esterilización, el medio de esterilización comprende vapor, calor seco, radiación, plasma, uno o más esterilizantes gaseosos y/o uno o más esterilizantes líquidos.

40 En una forma de realización, en el proceso de esterilización, el medio de esterilización comprende radiación por haz de electrones, radiación electromagnética, radiación gamma, radiación beta, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno gaseoso, peróxido de hidrógeno líquido, formalina, glutaraldehído y/o ácido peracético.

45 La presente invención puede proporcionar una o más de varias ventajas sobre el sistema del documento US 8372624. Al eliminar el gen represor o de otra manera desactivar su actividad, también se elimina la necesidad para el inductor. "Desactivar" la actividad de un gen se puede lograr por mutaciones de inserción, mutaciones de delección o retransformando el organismo huésped de tipo salvaje con un virus o plásmido que no contiene ese gen. Puesto que el inductor, por ejemplo, xilosa, puede interferir inadvertidamente con la función apropiada del sistema del documento US 8372624 en algunos casos, su eliminación elimina esta posibilidad del todo. Al eliminar el gen represor la presente invención también proporciona los beneficios de coste reducido y complejidad reducida de fabricar el indicador de esterilización que incluye el indicador biológico genéticamente manipulado, ya que ni el represor ni el inductor son componentes requeridos. Al eliminar el represor, el vector de transfección puede expresar su enzima indicadora de forma constitutiva; lo que significa que en ausencia de represión el producto del gen indicador se hará a niveles mucho más altos aumentando de esta manera la sensibilidad de indicador. Por tanto, el número y complejidad de las etapas implicadas en la fabricación de este indicador de esterilización, y el coste y manejo de estos componentes ahora innecesarios se eliminan. Por último, la ausencia de absorbancia causada por el inductor degradado aumenta más la sensibilidad e intensidad de la señal en el lector, cuando el indicador de esterilización ha pasado a través del proceso de esterilización, se ha incubado y los resultados se determinan.

60 Breve descripción de los dibujos

La presente invención puede ser útil con una variedad de aparatos indicadores de esterilización. Se pretende que los dibujos adjuntos proporcionen una representación ejemplar, no limitante de un aparato de esterilización adecuado, para el fin de proporcionar una mejor comprensión de la invención, y no se pretende que sean limitantes en modo alguno. En los dibujos adjuntos, partes y características similares tienen referencias similares.

65

La figura 1 es una vista transversal esquemática de una primera forma de realización de un indicador de esterilización adecuado para uso con formas de realización de la presente invención, en una configuración preactivada.

5 La figura 2 es una vista transversal esquemática del indicador de esterilización de la figura 1 es una configuración activada.

La figura 3 es una vista transversal esquemática de una segunda forma de realización de un indicador de esterilización adecuado para uso con formas de realización de la presente invención, en configuración preactivada, similar a la de la figura 1.

10 La figura 4 es un gráfico que muestra los efectos de ninguno, uno y dos ciclos de autoclave en un medio de recuperación que no contiene xilosa.

15 La figura 5 es un gráfico que muestra los efectos de ninguno, uno y dos ciclos de autoclave en un medio de recuperación que contiene xilosa al 1%.

Se debe apreciar que, por simplicidad y claridad de ilustración, los elementos mostrados en las figuras no se han dibujado necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos pueden estar exageradas relativas una a otra por claridad. Además, donde se considera apropiado, los números de referencia se han repetido entre las figuras para indicar elementos correspondientes.

20 Además, se debe apreciar que las etapas del proceso y estructuras descritas a continuación pueden no formar un flujo de proceso completo para producir un indicador de esterilización utilizable final. La presente invención se puede practicar junto con aparatos y técnicas de procesamiento actualmente usadas en la técnica, y solo se incluye tanto de las etapas de proceso comúnmente practicadas como sea necesario para una comprensión de la presente invención.

Descripción detallada

30 El término "esterilización" se refiere a hacer una sustancia incapaz de reproducción, de metabolismo y/o de crecimiento. Mientras esto se toma con frecuencia que quiere decir ausencia total de organismos vivos, el término se puede usar en el presente documento para referirse a una sustancia libre de organismos vivos a un grado previamente acordado que es aceptable. A menos que se indique de otra manera, el término esterilización se puede usar en el presente documento para referirse también a métodos y procedimientos menos rigurosos que la esterilización, por ejemplo, desinfección, higienización, y similares. El indicador biológico genéticamente manipulado y los procesos y aparatos descritos en el presente documento se pueden usar en los campos de la asistencia sanitaria, campos científicos, y similares. Estos se pueden usar en aplicaciones comerciales e industriales donde pueden desearse la esterilización, desinfección, higienización, descontaminación, limpieza, y similares. Las aplicaciones comerciales e industriales pueden incluir procesos tales como, procesamiento de alimentos, pasteurización, saneamiento de suelos, saneamiento de agua, y similares.

40 El proceso de esterilización para el que el indicador de esterilización descrito se puede usar puede comprender cualquier proceso de esterilización. El proceso de esterilización puede incluir los procesos de esterilización en donde el medio de esterilización o esterilizante puede comprender vapor, calor seco, radiación, plasma, así como también uno o más esterilizantes gaseosos, uno o más esterilizantes líquidos, y similares. La radiación puede comprender un haz de electrones o cualquier espectro electromagnético que incluya radiación ionizante, luz blanca pulsada o ultravioleta, microondas, y similares. La radiación puede comprender radiación gamma o beta. Los esterilizantes gaseosos pueden comprender óxido de etileno, peróxido de hidrógeno gaseoso, y similares. Los esterilizantes líquidos pueden comprender formalina (gas de formaldehído disuelto en agua y que opcionalmente contiene metanol para inhibir la formación de sustancias tóxicas), glutaraldehído, ácido peracético, peróxido de hidrógeno líquido, y similares.

50 El indicador biológico genéticamente manipulado se puede usar para examinar la letalidad de los esterilizantes contra cualquier microorganismo diana con menos resistencia al proceso de esterilización que el organismo de prueba proporcionado con el indicador biológico genéticamente manipulado. Estos microorganismos pueden incluir bacterias tales como *Escherichia coli*, *Legionella sp.*, *Campylobacter sp.*, y otras bacterias entéricas, así como también especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* y otros microorganismos patógenos a humanos tal como *Cryptosporidium*.

60 El crecimiento de un organismo puede comprender el resultado combinado de una multitud de procesos celulares. En aplicaciones típicas del indicador de esterilización esto se puede observar de diversas maneras. Según las células crecen y se dividen sus números individuales incrementan hasta un punto en el que el medio soporte de las células puede cambiar de claro a opaco (turbio). Para facilitar la observación de crecimiento, se puede usar un colorante indicador de pH. El crecimiento requiere energía. Esta energía se puede proporcionar por la capacidad de la célula para metabolizar nutrientes contenidos en el medio soporte. Los productos de descomposición de este proceso pueden producir que el medio soporte se vuelva ácido. Esta acidez puede inducir que un colorante indicador de pH (por ejemplo, rojo fenol) cambie de color. Como resultado, el crecimiento se puede observar como la conversión del medio soporte de un color rojo transparente a amarillo, por ejemplo, a un estado amarillo turbio. Aunque estos procesos son lentos, representan la evidencia convincente de vida y en general se aceptan como punto de referencia por los varios

cuerpos regulatorios de la seguridad de la esterilidad. Mediante la medida indirecta de la viabilidad como función de la actividad de una enzima diana/indicadora (por ejemplo, alfa glucosidasa), es posible acortar el tiempo requerido para conseguir un indicio de esterilidad. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, este proceso aún puede requerir crecimiento como última confirmación. Debido a que el crecimiento y la acumulación de productos residuales metabólicos son el resultado final de los procesos de vida, pueden requerir un tiempo significativo (de 24 a 72 horas) para hacerse aparentes

Con la presente invención, un gen indicador (por ejemplo, *lacZ*) adecuado para producir una enzima indicadora (por ejemplo, β -galactosidasa) puede ser absorbido por un organismo de prueba (por ejemplo, un microorganismo bacteriano) mediante el uso de un vehículo adecuado (por ejemplo, plásmido o virus). A diferencia con el estado de la técnica, en la presente invención, no se incluye gen represor en el organismo de prueba, y puesto que no se usa gen represor, no hay necesidad para un inductor para superar los efectos del gen indicador. Por tanto, la presente invención evita la posible ofuscación de los signos detectables de vida después de la esterilización, y puesto que no hay represión de la expresión del gen indicador, es posible obtener confirmación ya sea de la eficacia de la esterilización o del fracaso de la misma en un punto anterior en el tiempo. Lo que se expone al proceso de esterilización son los mecanismos varios y vitales que el organismo de prueba usa para sobrevivir y crecer y que también son usados para la producción de la enzima indicadora. Estas pueden incluir las ADN polimerasas usadas para el crecimiento celular (y replicación del plásmido), ARN polimerasas para la transcripción de los requerimientos metabólicos de los organismos de prueba (y el gen indicador transmitido por el plásmido o virus, por ejemplo, *lacZ*) y los polisomas ribosómicos requeridos para la traducción de proteínas celulares (así como también la expresión de la enzima indicadora). Debido a que la enzima indicadora puede ser de acción rápida como un mecanismo generador de señal, la presencia de cualquier organismo viable restante puede hacerse aparente más pronto que si estuvieran vinculados a los resultados finales acumulados de los mecanismos de crecimiento vitales del organismo de prueba.

El organismo de prueba puede comprender cualquier organismo cuya resistencia al proceso de esterilización pretendido supere la de los otros organismos que se van a destruir mediante el proceso de esterilización. El tipo de organismo de prueba usado puede ser dependiente de una variedad de factores ejemplificados por, pero sin limitarse a, el tipo de proceso de esterilización que se usa. El organismo de prueba es un microorganismo. Las cepas que se pueden usar pueden ser las que son las más resistentes al proceso usado para la esterilización. El organismo de prueba puede comprender una o más bacterias, patógenos, organismos gram negativos, organismos gram positivos, organismos vegetativos, virus, agentes no autorreplicantes, componentes subcelulares o productos de células y/o priones. Los microorganismos bacterianos pueden ser los que forman endosporas, por ejemplo, esporas bacterianas. El organismo de prueba puede comprender bacterias de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus* o *Clostridia*. Estos pueden incluir *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis globigii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli*, y similares. Los dos organismos de prueba más comúnmente usados son *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*, con más frecuencia y preferiblemente en forma de esporas. Como se sabe en la técnica, *Geobacillus stearothermophilus* también puede ser conocido como *Bacillus stearothermophilus*.

El organismo de prueba puede comprender además hongos, micobacterias, protozoos, bacterias vegetativas, y similares. Los ejemplos de hongos que pueden usarse pueden incluir *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella dermatitis*, y similares. Los ejemplos de micobacterias que pueden usarse pueden incluir *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmantis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, y similares. Los ejemplos de protozoos que pueden usarse pueden incluir *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, y similares. Los ejemplos de bacterias vegetativas que pueden usarse pueden incluir *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus radiodurans*, *Deinococcus radiodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y similares. Se pueden usar organismos tales como *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, y similares, para determinar la eficacia de esterilización por calor húmedo (autoclave), siendo especialmente útil *Geobacillus stearothermophilus*.

Los organismos vegetativos tales como bacterias vegetativas, células vegetativas y/o sus partes constituyentes se pueden usar como el organismo de prueba. Los ejemplos pueden incluir especies coliformes y células que no forman endosporas, por ejemplo, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae)*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y similares.

Estos organismos de prueba se pueden usar en combinación con uno o más excipientes. Los excipientes se pueden definir como una amplia clase de compuestos generalmente inertes que se pueden usar para estabilizar entidades lábiles. Una subclase de excipientes que se puede usar incluye los hidratos de carbono, por ejemplo, sacáridos oligoméricos y poliméricos. Un ejemplo de tal compuesto puede ser la trehalosa que es un disacárido. Las altas concentraciones de trehalosa en los tejidos de ciertos organismos pueden permitir a los organismos sobrevivir en un

estado de deficiencia de agua. La trehalosa se puede usar para reactivar los componentes celulares funcionales después de la deshidratación. La trehalosa puede proporcionar estabilidad a membranas y otras estructuras macromoleculares esenciales para la viabilidad de una célula en condiciones medioambientales extremas (por ejemplo, liofilización). Otros compuestos excipientes estabilizantes pueden incluir azúcares simples (por ejemplo, sacarosa, glucosa, maltosa y similares) y polímeros de cadena larga (por ejemplo, dextranos, almidón, agarosa, celulosa, y similares). Otros excipientes no basados en hidratos de carbono pueden incluir proteínas, fosfonatos, agentes tamponantes, ceras, lípidos, aceites, así como también otros materiales basados en hidrocarburos.

Los organismos de prueba pueden comprender uno o más agentes no autorreplicantes y/o componentes subcelulares o productos de células. Estos se pueden usar debido a su significación clínica o debido a su uso como agentes de bioterrorismo. Estos materiales indicadores pueden comprender cepas celulares que pueden tener ahora resistencia a medios normales de tratamiento con antibiótico o desinfección química debido a las modificaciones naturales o artificiales. Los ejemplos del primer tipo pueden incluir ERV (enterococos resistentes a vancomicina), SARM (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina), *Mycobacterium chelonii*, y similares. Estos se pueden usar porque los ERV y los SARM han desarrollado resistencia a contramedidas terapéuticas (por ejemplo, resistencia a antibióticos) y *M. chelonii* ha desarrollado resistencia a algunos modos de desinfección (por ejemplo, resistencia a glutaraldehído).

El organismo de prueba puede comprender uno o más organismos emergentes. Estos pueden representar un riesgo o desafío especial para el curso terapéutico de acción o desinfección. Los ejemplos de estos materiales indicadores pueden incluir priones. Los priones son organismos no vivos, por sí, pero su función como agentes causantes de enfermedades puede estar relacionada con su estructura y esta relación estructura/función se puede emplear para determinar su infectividad relativa. Se pueden usar otros agentes no autónomos (por ejemplo, virus), así como elementos subcelulares y priones proteínicos.

El gen indicador que es absorbido por el organismo de prueba se proporciona para el fin de producir la enzima indicadora y puede comprender *lacZ*, *bgaB*, *xylE*, *cat*, o una mezcla de dos o más de los mismos. El término "*lacZ*" se refiere a un gen que codifica β-galactosidasa. El término "*bgaB*" se refiere al gen que codifica la β-galactosidasa termoestable de *G. stearothermophilus*. El término "*xylE*" se refiere a un gen que codifica catecol-2,3-dioxigenasa de *Pseudomonas putida*. El término "*cat*" se refiere al gen que codifica cloranfenicol acetiltransferasa, por ejemplo, de pC194. El término "pC194" se refiere a una construcción particular de plásmido. La discusión anterior de los genes indicadores se aplica a otros organismos, incluyendo en particular *Bacillus atrophaeus*.

El vehículo para insertar (o transfectar) el gen indicador en el organismo de prueba puede comprender uno o más plásmidos y/o uno o más virus. Estos vehículos se pueden denominar vectores. Los plásmidos pueden comprender ADN circular bicatenario que está separado del ADN cromosómico. Los plásmidos pueden ser lineales. El tamaño de los plásmidos puede estar en el intervalo de aproximadamente 2000 a aproximadamente 20000 pares de base (pb), y en una forma de realización en el intervalo desde aproximadamente 5000 a aproximadamente 12000 pb. Una o más copias (por ejemplo, desde 1 a aproximadamente 3000 copias, y en una forma de realización desde 1 a aproximadamente 60 copias, y en una forma de realización desde aproximadamente 20 a aproximadamente 3000 copias) del mismo plásmido pueden ser absorbidas por una única célula del organismo de prueba. Los plásmidos pueden contener una o más secuencias de ADN que sirven como un origen de replicación. Los plásmidos pueden contener uno o más marcadores genéticos. Los plásmidos pueden contener un polienlazador o sitio de clonación múltiple (MCS) que puede ser una región relativamente corta que contiene uno o más sitios de restricción que permiten la inserción de los fragmentos de ADN. Los plásmidos pueden contener uno o más genes que proporcionan un marcador selectivo para inducir que el organismo de prueba retenga el plásmido. El marcador selectivo puede comprender un gen de resistencia a antibiótico y/o un gen con capacidad nutricional. Los plásmidos pueden comprender plásmidos conjugativos que contienen genes *tra* (operón de transferencia) que pueden realizar el proceso de conjugación, la transferencia no sexual de plásmidos a otra bacteria.

Los plásmidos pueden comprender al menos un origen de replicación, al menos un marcador seleccionable, al menos un promotor inducible, y al menos un gen indicador. El marcador seleccionable puede comprender un gen de resistencia a antibiótico y/o un gen con capacidad nutricional exógena. Estos pueden incluir genes de los antibióticos cloranfenicol, ampicilina o espectinomicina, y/o genes nutricionales de xilosa o lactosa. El promotor inducible puede comprender *PxylA*. El término *PxylA* se refiere a un promotor de transcripción que en presencia de una función reguladora *xylR* activa requiere xilosa para permanecer activo. El gen indicador puede comprender *lacZ*, *bgaB*, *xylE*, *cat*, y similares. El plásmido puede comprender dos orígenes de replicación. Uno de los orígenes de replicación puede comprender un origen de replicación gram negativo y el otro origen de replicación puede comprender un origen de replicación gram positivo. El origen de replicación gram negativo puede comprender *Escherichia coli*. El origen de replicación gram positivo puede comprender *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* o *Bacillus atrophaeus*. Los plásmidos pueden contener de aproximadamente 2000 a aproximadamente 20000 pb, y en una forma de realización de aproximadamente 5000 a aproximadamente 12000 pb.

Los plásmidos de origen natural existen a lo largo de una amplia gama de organismos huéspedes en la naturaleza. Pueden comprender genes, elementos reguladores y/o piezas estructurales del ADN. Los plásmidos habitualmente proporcionan alguna ventaja a su organismo huésped (por ejemplo, resistencia a antibióticos o la capacidad para usar ciertas fuentes nutricionales de energía) y pueden ser tolerados por sus organismos huéspedes durante tanto tiempo

como pueda existir esta relación ventajosa. Los plásmidos genéticamente manipulados pueden comprender un mosaico de genes, elementos reguladores y/o piezas estructurales de interés. Ya que hay muchos plásmidos de origen natural (y previamente manipulados) disponibles, hay un extenso surtido de genes para elegir. Por ejemplo, los genes empleados se pueden seleccionar basado en las propiedades deseadas de la construcción terminada. Estas propiedades pueden incluir la capacidad para transformar la gama completa de organismos huéspedes útiles, proporcionar alguna ventaja selectiva al organismo huésped (por ejemplo, resistencia a antibióticos), producir una señal termoestable y rápidamente detectable a demanda, y proporcionar que la señal esté desactivada hasta que se desee volver a activarla. Esto se puede lograr al poner juntos (ligación) los atributos requeridos en forma de segmentos de ADN de una variedad de plásmidos fuente. Por ejemplo, los fragmentos pueden comprender los orígenes de replicación tanto para organismos gram positivos como gram negativos, un gen *cat* para la resistencia a cloranfenicol, un gen *bgaB* para la β-galactosidasa termoestable, y un regulador *xyIR* opcional para regular el producto del gen *bgaB* hasta que se necesite.

Un plásmido de diseño específico puede construirse mediante el ensamblaje de los elementos genéticos deseados. Los elementos genéticos se pueden ensamblar mediante digestión por restricción de la secuencia genética deseada de un plásmido u organismo donante para producir extremos del ADN que pueden después ligarse fácilmente a otra secuencia genética. Típicamente, se puede producir un saliente 5' o 3' a través de la digestión por restricción en ambas secuencias dirigidas para ligación. Después de la digestión, las secuencias diana se pueden purificar y después ligar con una enzima (ligasa). El plásmido se puede construir mediante el ensamblaje de un plásmido base que contiene los orígenes de replicación tanto para los organismos gram positivos como gram negativos, así como también el gen *cat* para resistencia a cloranfenicol. Después de la confirmación de la unión apropiada del gen *cat* al segmento base, el proceso puede repetirse tanto para el segmento del gen *bgaB* como los terminadores T1 y T2 para este gen. Tras el ensamblaje completo de los elementos y la confirmación del ensamblaje y la orientación apropiadas, el plásmido se puede insertar en un organismo huésped que se puede usar como organismo de prueba.

Una partícula completa de virus, que se puede denominar un virión, puede ser un transportador de genes que puede comprender ácido nucleico rodeado por un recubrimiento protector de proteína que se puede denominar una cápside. Una cápside puede comprender proteínas codificadas por el genoma vírico y su forma puede servir como una base para la distinción morfológica. Las unidades de proteínas codificadas por virus, que se pueden denominar promotores, se pueden autoensamblar para formar la cápside, lo que no requiere aporte del genoma del virus; sin embargo, unos pocos virus pueden codificar proteínas que pueden ayudar a la construcción de su cápside. Las proteínas asociadas con el ácido nucleico se pueden conocer más técnicamente como nucleoproteínas, y la asociación de las proteínas de la cápside vírica con el ácido nucleico vírico se puede denominar una nucleocápside. Los virus pueden no considerarse organismos vivos y pueden carecer de los medios para su propia reproducción fuera de la célula huésped. Los virus usados en el presente documento con bacterias se pueden denominar bacteriófagos o fagos. Los ejemplos de virus pueden incluir bacteriófagos lambda o M13. El gen indicador se puede insertar en el virus cortando primero el ADN no recombinante del fago con una endonucleasa y después ligando un trozo de ADN a los dos extremos recién formados.

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

Las enzimas indicadoras, que pueden ser producidas por el gen indicador, pueden comprender beta-D-galactosidasa, beta-D-glucosidasa, alfa-D-glucosidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, butirato esterasa, caprilato esterasa lipasa, miristato lipasa, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, quimotripsina, fosfohidrolasa, alfa-D-galactosidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa, beta-D-celobiosidasa, alanina aminopeptidasa, prolina aminopeptidasa, tirosina aminopeptidasa, fenilalanina aminopeptidasa, beta-D-glucuronidasa, ácido graso esterasa, o una mezcla de dos o más de las mismas. Se pueden usar los homólogos termoestables o termolábiles de estas dependiendo de las condiciones de incubación preferidas para el organismo huésped seleccionado.

El indicador biológico genéticamente manipulado se puede exponer al medio de esterilización durante un proceso de esterilización mediante el uso de cualquier procedimiento adecuado.

El indicador de esterilización que contiene el indicador biológico divulgado se puede usar en cualquier proceso en donde el indicador de selección se expone a un medio de esterilización durante un proceso de esterilización y después a un sustrato de enzima para determinar si el proceso de esterilización es eficaz. El proceso de esterilización puede emplear esterilizantes gaseosos o líquidos, calor seco, radiación, y similares. El indicador de esterilización junto con los artículos que se van a esterilizar se puede exponer al medio de esterilización durante el proceso de esterilización. Tras la terminación del proceso de esterilización, el indicador biológico genéticamente manipulado se combina con un medio de recuperación o incubación que comprende al menos un sustrato de enzima. El indicador biológico genéticamente manipulado se puede incubar después con el sustrato de la enzima durante un periodo de tiempo deseado y examinar para determinar si el proceso de esterilización fue eficaz.

El indicador biológico genéticamente manipulado se puede usar en un indicador de esterilización autónomo que comprende un envase con dos compartimentos separados. Uno de los compartimentos puede contener el indicador biológico. El otro compartimento puede contener un medio de recuperación que comprende al menos un sustrato de

enzima. En el uso, el indicador de esterilización y los artículos que se van a esterilizar se pueden exponer a un medio de esterilización. Después de la esterilización, el indicador de esterilización se puede activar de manera que el indicador biológico genéticamente manipulado entra en contacto con el medio de recuperación suficientemente para determinar si el proceso de esterilización fue eficaz. Estos indicadores de esterilización se pueden usar con cualquier proceso de esterilización en donde el indicador biológico se puede exponer al medio de esterilización, por ejemplo, procesos de esterilización que emplean esterilizantes gaseosos.

En referencia ahora a los dibujos, las figuras 1 y 2 muestran un sistema indicador de esterilización 10 según una primera forma de realización ejemplar de la presente invención. El sistema indicador 10 comprende una tapa 20 que es montable sobre un envase 30. El envase 30 incluye un extremo inferior cerrado 31 y un extremo superior abierto, y define un espacio interior 34. La tapa 20 tiene una pared externa 22, un extremo inferior abierto y un extremo superior cerrado 23. La tapa también incluye una pared (o paredes) interna 24 dispuesta en el interior de la pared externa de la tapa, que forma una pared separada, y define una cámara interna 26. La cámara interna 26 incluye una abertura 25 adyacente al extremo inferior de la(s) pared(es) 24. La cámara 26 contiene un fluido 50, y la tapa 20 incluye una barrera rompible 40 dispuesta alrededor de la abertura 25 de la cámara 26 para encapsular el fluido 50 dentro de la cámara 26.

En la forma de realización ilustrada en las figuras 1 y 2, el sistema indicador está configurado por la tapa 20 que se va montar en el envase 30 en una relación en presilla. En otras formas de realización, no mostradas, el sistema indicador puede estar configurado por la tapa que se monta sobre el envase en una relación roscada en la que la tapa se engancha con el envase mediante roscas y el sistema se activa rotando la tapa con respecto al envase, es decir, atornillando la tapa más sobre el envase. Como se muestra en las figuras 1 y 2, el envase 30 incluye una proyección anular 32 que forma una cresta o labio adyacente o cerca del extremo superior del envase. La tapa 20 incluye una proyección anular 29 que forma una cresta o labio adyacente a la parte inferior de la tapa. La tapa 20 se puede montar sobre el envase 30 deslizando la cresta 29 de tapa sobre la cresta 32 del envase. La cresta 32 del envase 30 se engancha con la cresta 29 en la tapa 20 para prevenir que la tapa 20 y el envase 30 se desacoplen. La tapa 20 y el envase 30 puede tener un tamaño tal que la cresta 32 ejerza una cantidad suficiente de presión contra la tapa 20 para prevenir que la tapa 20 se deslice hacia abajo sin aplicar una fuerza externa hacia abajo a la tapa 20. De esta manera, la barrera rompible 40 se puede mantener separada de los bordes 38 de miembros de punción 36 de modo que la barrera rompible 40 no entre en contacto y/o no se rompa por los miembros de punción hasta tal momento deseado para activar el indicador.

Como se muestra en las figuras 1 y 2, el envase 30 está adaptado para romper la barrera rompible 40. Los envases incluyen una o más proyecciones 36 (que también se pueden denominar en el presente documento "miembros de punción") que tienen un borde 38 adaptado para romper o perforar la barrera rompible 40 cuando la tapa 20 con la barrera rompible 40 se mueve hacia abajo y la barrera 40 entra en contacto con el borde 38 de la proyección 36. El miembro de punción 36 se muestra como que es integral con y se extiende hacia arriba desde la pared inferior interna 37 del envase. En otra forma de realización, no mostrada, los miembros de punción 36 se pueden extender tanto desde la pared lateral 35 como desde la pared inferior interna 37.

Para evaluar un proceso de esterilización, una concentración calibrada de microorganismo se dispone en el interior 34 del envase 30. Los microorganismos se pueden disponer directamente en las paredes 35 del envase o se pueden proporcionar en un miembro soporte (por ejemplo, el miembro soporte 70) que está dispuesto dentro del envase 30. En otra forma de realización los microorganismos se pueden disponer directamente sobre la pared inferior 37. El indicador de esterilización se ensambla después montando la tapa 20 llena del medio de recuperación sobre el envase 30. La tapa 20 se puede montar por cierre a presión de la tapa 20 sobre el envase 30 como se ha descrito anteriormente o, por ejemplo, por un montaje roscado. Con referencia a la figura 1, la tapa 20 llena de medio de recuperación se monta sobre el envase 30 en una primera posición no activada (o abierta) de modo que la barrera rompible 40 permanezca intacta y no sea perforada por los miembros de punción 36. Deseablemente, en la primera posición no activada, la barrera rompible 40 está colocada lejos de y no está en contacto con los bordes 38 de los miembros de punción 36.

Con el indicador 10 ensamblándose tal como se muestra en la figura 1, el indicador de esterilización se puede someter después a un proceso de esterilización. Se muestra que la tapa 20 tiene aperturas 28 a través de las cuales un vapor esterilizante puede entrar y fluir en el sistema indicador. El esterilizante entra en la tapa a través de las aperturas 28 (en el espacio entre la pared externa 22 y la pared interna 24) y fluye en el envase 30 a través de un espacio 60 definido entre la superficie exterior de la pared interna 24 en la tapa 20 y la superficie interna de la pared 35 en el envase 30. El vapor esterilizante fluye en el envase 30 y actúa sobre los microorganismos del indicador biológico genéticamente manipulado.

Después de que se complete el proceso de esterilización, el indicador de esterilización se puede activar moviendo la tapa 20 hacia abajo hacia el envase 30 a una segunda posición (o cerrada o activada), que se ilustra en la figura 2. La tapa 20 se mueve hacia abajo aplicando una fuerza o presión hacia abajo suficiente sobre la tapa 20. Según se mueve la tapa 20 hacia abajo, la barrera rompible 40 se pone en contacto con el borde 38 del miembro de punción 36, y finalmente se mueve a una posición tal que el borde 38 del miembro de punción 36 perfora o penetra la barrera rompible 40. Cuando la barrera rompible 40 es perforada, la abertura 25 de la cámara 26 se expone, y el medio de

recuperación líquido 50 se vacía en la región interior 34 del envase 30 y en contacto con los microorganismos como se muestra en la figura 2. Puede ser deseable mover la tapa 20 hacia abajo con un movimiento serpenteante para efectuar una abertura mayor o máxima de la barrera rompible 40 para asegurar al drenaje completo del medio de crecimiento en el envase.

5 Como se muestra en las figuras 1 y 2, en esta forma de realización, la superficie interna de la tapa 20 incluye una segunda proyección anular 27, y la tapa se puede mover hacia abajo a una posición tal que la parte superior de la proyección se engancha con la parte inferior de la cresta 32 en el envase 30 y la tapa se mantiene en la segunda posición cerrada/activada. La segunda posición cerrada/activada puede servir para mantener la tapa 20 en una relación sellada con el envase 30, que puede prevenir que microorganismos adicionales entren en el sistema. El indicador de esterilización 10 se incuba después durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que se determine la viabilidad de los microorganismos. Durante la incubación, cualquier microorganismo viable metabolizará y crecerá, y este metabolismo y crecimiento libera subproductos en el medio de cultivo. Los subproductos se pueden detectar mediante cualquier propiedad seleccionada incluyendo, por ejemplo, cambio de pH, cambio de color, opacidad, fluorescencia, y similares.

20 Se apreciará que, en otra forma de realización, la tapa 20 no incluye la segunda proyección 27 para mantener el envase en la posición cerrada. En otra forma de realización alternativa, el envase 30 puede incluir otra proyección anular o un conjunto de fijadores (no mostrados) en el exterior del envase 30 y situados por debajo de la cresta 32, proyección o fijadores que se pueden adaptar para enganchar la cresta 29 en la tapa para mantener el envase 30 en la posición cerrada. La patente en EE UU No. 5.770.393 ilustra tal configuración, y esta patente se incorpora al presente documento mediante referencia por sus enseñanzas relacionadas a configuraciones de tapa y envase. En otra forma de realización alternativa, la superficie interna de la tapa 20 y la superficie externa del envase 30 pueden estar roscadas, y la tapa se puede mover a y mantenerse en una posición cerrada atornillando la tapa 20 sobre el envase 30, en la que la tapa 20 puede estar roscada como se muestra, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 8.173.388 B2, que se puede consultar para detalles adicionales sobre esta forma de realización del vial, y que se incorpora por este medio al presente documento mediante referencia por sus enseñanzas en relación a la configuración del vial y la tapa de esta y formas de realización anteriores. Todas estas configuraciones alternativas están dentro del ámbito de la presente invención.

30 Como se ha descrito anteriormente, la tapa 20 en la forma de realización ilustrada en las figuras 1 y 2 se muestra como que tiene la apertura 28 para permitir el acceso del esterilizante vapor en el indicador. Se apreciará, sin embargo, que no se necesita proporcionar a la tapa tal característica. El número, tamaño, forma y/o localización de la(s) apertura(s) se puede seleccionar según se desee, con consideración al esterilizante particular con el que el indicador de esterilización se va a usar. Por ejemplo, la localización, forma, y tamaño de las aperturas en la tapa y/o el envase se pueden seleccionar para proporcionar una ruta tortuosa para la entrada y salida del vapor de esterilización entre los microorganismos y el medio circundante. La ruta tortuosa también puede servir para inhibir o prevenir la contaminación de agentes externos, y para asegurarse que una cantidad adecuada de esterilizante está disponible. Al incluir la ruta tortuosa, es más probable que la carga entera se exponga al esterilizante destruyendo de esta manera cualquier microorganismo existente antes de que el organismo de prueba en el indicador de esterilización se destruya.

45 Se pueden proporcionar aperturas en el envase además de o como una alternativa a proporcionar aperturas en la tapa. Además, si se proporcionan aperturas en el envase, deben estar localizadas de modo que el medio de crecimiento no se salga o derrame a través de tales aperturas cuando el indicador se activa y la barrera se rompe.

50 La figura 3 representa un indicador 10 en el que se forma una apertura 80 en la pared lateral 35 del envase 30 en una posición apropiada, además de las aperturas 28 en la tapa 20. La apertura mostrada en la figura 3 está en la pared lateral 35 del envase 30 cerca de la parte superior del envase 30, en la proximidad del borde 38 del miembro de punción 36, para evitar fugas o derrames después de la activación. Como se puede ver de la figura 3, después de la activación, la apertura 80 en esta localización estará cubierta por la tapa 20 en la posición activada. Se advierte que el indicador 10 mostrado en la figura 3 incluye la apertura 28 en la tapa 20, pero esto no es necesario. En una forma de realización (no mostrada), el envase 30 incluye la apertura 80 y se usa con una tapa similar a la tapa 20, pero que no incluye una apertura tal como la apertura 28. Por tanto, se puede proporcionar una apertura ya sea en la tapa o en el envase, o tanto en la tapa como en el envase.

55 Después de que el proceso de esterilización se haya completado, la tapa 20 se presiona o gira hacia debajo de modo que el borde 38 del miembro de punción 36 penetra y rompe la barrera 40 liberando el medio de crecimiento en el espacio 26 para mezclarse con e incubarse con cualquiera de los microorganismos del indicador biológico genéticamente manipulado que puedan haber sobrevivido el proceso de esterilización. El medio de recuperación 50 puede comprender un medio acuoso o solución acuosa que proporciona la germinación, metabolismo y posteriormente crecimiento de los organismos según se requiera. El medio acuoso o solución acuosa puede estar tamponado. La enzima indicadora, si está presente como resultado de haber sido producida por el gen indicador en cualquier microorganismo superviviente del indicador biológico genéticamente manipulado, entra en contacto con el sustrato de la enzima produciendo la formación del producto modificado por la enzima que tiene un color o fluorescencia detectable u otra característica, tal como un cambio de pH.

El sustrato de enzima puede comprender una sustancia o mezcla de sustancias que cuando la enzima indicadora actúa sobre ellas se convierte en un producto modificado por enzimas. En general, el producto modificado por enzimas puede comprender un material luminiscente, fluorescente, o coloreado. Alternativamente, el sustrato de enzima puede comprender uno o más compuestos que cuando la enzima indicadora actúa sobre ellos, pueden dar un producto (por ejemplo, un intermedio reactivo o un sustrato capaz de cambiar el pH del medio) que reacciona con un compuesto o composición adicional para dar un material luminiscente, fluorescente, o coloreado.

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

Al segundo tipo de sustrato de enzima puede dársele la fórmula química general CD, por ejemplo, que se puede convertir por una enzima específica a C+D. Sin embargo, ni C ni D pueden ser fluorescentes o coloreados, pero D puede ser capaz de reaccionar adicionalmente con el compuesto Z para dar un compuesto fluorescente o coloreado, que indica por lo tanto la actividad de la enzima. Un ejemplo fluorogénico específico de este tipo puede ser el aminoácido lisina. En presencia de la enzima lisina descarboxilasa, la lisina puede perder una molécula de CO₂. La parte restante de la lisina se puede llamar entonces cadaverina, que es muy básica. Un indicador básico tal como 4-metilumbeliferona se puede incorporar y puede ser fluorescente en presencia de una base fuerte. Un sustrato cromogénico de este tipo puede ser fosfato de 2-naftilo. La enzima indicadora fosfatasa, puede reaccionar con el sustrato de enzima para dar beta-naftol. El beta-naftol liberado puede reaccionar con un reactivo cromogénico que contiene 1-diazo-4-benzoilamino-2,5-dietoxibenceno para producir un color violeta.

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

Los compuestos fluorogénicos pueden en sí mismos ser no fluorescentes o metafluorescentes (es decir, fluorescentes en una manera claramente diferente, por ejemplo, por el color o la intensidad, más que los productos correspondientes modificados por enzimas) y las longitudes de ondas apropiadas de excitación y detección, se pueden usar para separar la señal de fluorescencia desarrollada por la modificación enzimática de cualquier otra fluorescencia que pueda estar presente.

Se puede usar un número de sustratos de enzimas para las enzimas indicadoras de diversos orígenes. Estos pueden incluir los derivados fluorogénicos de 4-metilumbeliferilo (hidrolizable a 4-metilumbeliferona); derivados de 7-amido-4-metilcumarina; derivados de diacetilfluoresceína; y fluorescamina.

Los derivados de 4-metilumbeliferilo que pueden usarse como el sustrato de la enzima pueden incluir: 4-metilumbeliferil-2-acetamido-4,6-O-bencilideno-2-deoxi-beta-D-lucopiranosida; acetato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil-N-acetil-beta-D-galactosaminida; 4-metilumbeliferil-N-acetil-alfa-D-glucosaminida; 4-metilumbeliferil-N-acetil-beta-D-glucosaminida; ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-alfa-D-N-acetil neuramínico; 4-metilumbeliferil-alfa-L-arabinofuranósido; 4-metilumbeliferil alfa-L-arabinósido; butirato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil-beta-D-celobiósido; metilumbeliferil-beta-D-N,N'-diacetil quitobiósido; elaidato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil-beta-D-fucósido; 4-metilumbeliferil-alfa-L-fucósido; 4-metilumbeliferil-beta-L-fucósido; 4-metilumbeliferil-alfa-D-galactósido; 4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido; 4-trifluorometilumbeliferil beta-D-galactósido; 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido; 4-metilumbeliferil-alfa-D-glucósido; 4-metilumbeliferil-beta-D-glucósido; 4-metilumbeliferil-7,6-sulfo-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucósido; 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido; 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido; p-guanidinobenzoato de 4-metilumbeliferilo; heptanoato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil-alfa-D-manopiranosido; 4-metilumbeliferil-beta-D-manopiranosido; oleato de 4-metilumbeliferilo; oleato de 4-trifluorometilumbeliferilo; palmitato de 4-metilumbeliferilo; fosfato de 4-metilumbeliferilo; propionato de 4-metilumbeliferilo; estearato de 4-metilumbeliferilo; sulfato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil-beta-D-N,N',N"-triacetilquitotriosa; 4'-metilumbeliferil 2,3,5-tri-beta-benzoil-alfa-L-arabinofuranósido; cloruro de cinamato de 4-metilumbeliferil-beta-trimetilamonio; 4-guanidinobenzoato de 4-metilumbeliferilo; y 4-metilumbeliferil-beta-D-xilósido.

Los derivados de 7-amido-4-metilcumarina que se pueden usar como el sustrato de la enzima pueden incluir: L-alanina-7-amido-4-metilcumarina; L-prolina-7-amido-4-metilcumarina; L-tirosina-7-amido-4-metilcumarina; L-arginina-7-amido-4-metilcumarina; L-citrulina-7-amido-4-metilcumarina; L-leucina-7-amido-4-metilcumarina; L-metionina-7-amido-4-metilcumarina; ácido L-piroglutámico 7-amido-4-metilcumarina; ácido L-aspartico beta-(7-amido-4-

metilcumarina); ácido L- glutámico 1-(7-amido-4-metilcumarina); L-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina; y 7-glutaril-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina.

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

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

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

25 Un sustrato de enzima que se puede usar puede ser un compuesto cromogénico capaz de ser modificado enzimáticamente para dar un cromóforo derivado, o un producto que reacciona con otro compuesto para dar un cromóforo derivado, cromóforo que tiene un color diferente o más intenso. Los compuestos cromogénicos pueden ser no coloreados o coloreados en una manera claramente diferente, por ejemplo, ya sea por el color o la intensidad, que los productos correspondientes modificados por enzimas. Se pueden usar longitudes de onda apropiadas de excitación y detección, en modos bien conocidos por los usuarios de la instrumentación colorimétrica, para separar la señal coloreada desarrollada por la modificación de la enzima de cualquier otro color que pueda estar presente.

30 Los compuestos cromogénicos que se pueden usar como sustratos de enzima pueden incluir derivados de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo; derivados de nitrofenilo; derivados de indoxilo; y derivados de fenoltaleína.

35 Los derivados de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo que se pueden usar pueden incluir acetato de 5-bromo-6-cloro-3-indolilo, acetato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranosido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1,3-diacetato, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-fucopiranosido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucopiranosido, ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D- glucurónico, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, y sulfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo.

40 Los derivados de nitrofenilo que se pueden usar pueden incluir derivados de p-nitrofenol y o-nitrofenol. Estos incluyen fosfato de dietil-p-nitrofenilo; fosfato de di-p-nitrofenilo; p-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi-3-O-beta-galactopiranosil-beta-glucopiranosido; p-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi-beta-glucopiranosido; acetato de p-nitrofenilo; p-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminida; p-nitrofenil-beta-D-N,N'-diacetilquitobiósido; p-nitrofenil-alfa-glucopiranosido; p-nitrofenil-alfa-maltósido; p-nitrofenil-beta-maltósido; p-nitrofenil-alfa-manopiranosido; p-nitrofenil-beta-manopiranosido; miristato de p-nitrofenilo; palmitato de p-nitrofenilo; fosfato de p-nitrofenilo; bis(p-nitrofenil)fosfato; tris(p-nitrofenil)fosfato; p-nitrofenil-beta-glucopiranosido; p-nitrofenil-beta-glucurónido; alfa-p-nitrofenilglicerina; p-nitrofenil-alfa-rhamnopiranosido; estearato de p-nitrofenilo; sulfato de p-nitrofenilo; p-nitrofenil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-glucosaminida; p-nitrofenil timidina mono-fosfato; éster metílico del ácido p-nitrofenil-2,3,4-tri-O-acetil-beta-glucurónico; y valerato de p-nitrofenilo.

50 Los o-nitrofenoles útiles pueden incluir acetato de o-nitrofenilo, o-nitrofenil-beta-glucósido y o-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido. Otros derivados de nitrofenilo útiles pueden incluir nitrofenil-beta-fucopiranosido; nitrofenil-alfa-galactopiranosido; nitrofenil-beta-galactopiranosido; butirato de nitrofenilo; caprato de nitrofenilo; caproato de nitrofenilo; caprilato de nitrofenil; laurato de nitrofenilo; y propionato de nitrofenilo.

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

60 Los derivados de fenoltaleína que se pueden usar pueden incluir: dibutirato de fenoltaleína; difosfato de fenoltaleína; disulfato de fenoltaleína; ácido fenoltaleína glucurónico; ácido fenoltaleína mono-beta-glucosidurónico; ácido fenoltaleína mono-beta-glucurónico; y mono-fosfato de fenoltaleína.

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

5 Se pueden emplear sustratos enzimáticos adicionales que contienen derivados de 1-naftilo, 2-naftilo y naftil-AS-BI si el producto modificado de enzima derivado se hace reaccionar después con un reactivo cromogénico, tal como colorantes diazo, por ejemplo, 1-diazo-4-benzoilamino-2,5-dietoxibenceno, 1-diazo-4-benzoilamino-2,5-dietoxibenceno, p-diazo-2,5-dietoxi-N-benzoialanina, cloruro de 4-cloro-2-metilbenceno diazonio, y sal de o-aminoazotolueno diazonio, para producir un cromóforo.

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

10 Los derivados de 2-naftilo que se pueden usar pueden incluir fosfato de 2-naftilo; butirato de 2-naftilo; caprilato de 2-naftilo; miristato de 2-naftilo; L-leucil-2-naftilamida; L-valil-2-naftilamida; L-cistol-2-naftilamida; N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida; N-glutaril-fenilalanina 2-naftilamina; fosfato de 2-naftilo; 6-Br-2-naftil-alfa-D-galacto-piranosido; 2-naftil-beta-D-galacto-piranosido; 2-naftil-2-D-glucopiranosido; 6-bromo-2-naftol-beta-D-glucopiranosido; 6-bromo-2-naftil-2-D-manopiranosido; y 2-naftil-alfa-L-fucopiranosido.

15 Los derivados de naftil-AS-BI que se pueden usar pueden incluir naftil-AS-BI-fosfato; y naftil-AS-BI-beta-D-glucurónido.

20 Cuando la enzima indicadora cuya actividad va a detectarse es alfa-D-glucosidasa, el sustrato de enzima puede ser p-nitrofenil-alfa-glucopiranosido. Cuando la enzima indicadora cuya actividad va a detectarse es alfa-L-arabinofuranosidasa, el sustrato de enzima que puede usarse puede ser p-nitrofenil-alfa-L-arabinofuranósido. Cuando la enzima indicadora cuya actividad va a detectarse es beta-galactosidasa, el sustrato de enzima puede ser 5-bromo-4-cloro-3-indoil-beta-D-galactopiranosido o 4-metilumbeliferona-beta-D-galactopiranosido.

25 El sustrato de enzima que se puede usar puede depender de la identidad de la enzima indicadora cuya actividad está en estudio. A continuación hay una lista de un número de sustratos de enzimas y las enzimas indicadoras correspondientes que pueden reaccionar con el sustrato de enzima para producir un producto que tiene la fluorescencia o el color considerablemente modificada o incrementada.

<u>Sustrato enzimático</u>	<u>Enzima indicadora</u>
acetato de 4-metilumbeliferilo	Esterasa
butirato de 4-metilumbeliferilo	Esterasa
elaidato de 4-metilumbeliferilo	Lipasa
4-metilumbeliferil-beta-D-galactopiranosido	beta-D-galactosidasa
4-metilumbeliferil-alfa-D-galactopiranosido	alfa-D-galactosidasa
4-metilumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido	alfa-D-glucosidasa
4-metilumbeliferil-beta-D-glucopiranosido	beta-D-glucosidasa
heptanoato de 4-metilumbeliferilo	Esterasa
oleato de 4-metilumbeliferilo	Lipasa
fosfato de 4-metilumbeliferilo	Fosfatasa ácida o alcalina
propionato de 4-metilumbeliferilo	Esterasa
4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido	beta-D-galactosidasa
4-metilumbeliferil-beta-D-glucósido	beta-D-glucosidasa
4-metilumbeliferil-alfa-D-glucósido	alfa-D-glucosidasa
4-metilumbeliferil-alfa-L-arabinofuranósido	alfa-L-arabinofuranosidasa
L-leucina-7-amido-4-metilcumarina	Leucina aminopeptidasa
7-glutaril-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina	Quimotripsina
D-melobiosa	alfa-D-galactosidasa
fosfato de p-nitrofenilo	Fosfatasa ácida o alcalina
acetato de p-nitrofenilo	Lipasa
o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido	beta-D-galactosidasa
p-nitrofenil-alfa-D-galactopiranosido	alfa-D-galactosidasa
o-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido	beta-D-glucosidasa
p-nitrofenil-alfa-D-glucopiranosido	alfa-D-glucosidasa
p-nitrofenil-beta-D-glucurónido	beta-D-glucuronidasa
p-nitrofenil-alfa-L-arabinofuranósido	alfa-L-arabinofuranosidasa
laurato de p-nitrofenilo	Esterasa
miristato de p-nitrofenilo	Esterasa
palmitato de p-nitrofenilo	Esterasa
fosfato de p-nitrofenilo sal di-Na	Fosfatasa alcalina
dibutirato de fenolftaleína	Esterasa
difosfato de fenolftaleína	Fosfatasa ácida o alcalina
difosfato de fenolftaleína sal penta-Na	Fosfatasa ácida o alcalina
fenolftaleína-beta-D-glucurónido sal Na	beta-D-glucuronidasa
fenolftaleína-beta-D-glucurónido	beta-D-glucuronidasa
éster etílico de L-fenilalanina HCl	Quimotripsina
fenil-beta-D-galactopiranosido	beta-D-galactosidasa
fenil-beta-D-glucurónido	beta-D-glucuronidasa

fenil-β-D-glucopiranosido	β-D-glucosidasa
fenil-β-D-glucuronido	β-D-glucuronidasa
fenil-α-D-glucósido	α-D-glucosidasa
β-glicerofosfato de sodio	Fosfatasa ácida o alcalina
1-naftilfosfato de sodio	Fosfatasa ácida o alcalina
2-naftilfosfato de sodio	Fosfatasa ácida o alcalina
butirato de 2-naftilo	Esterasa
acetato de β-naftilo	Lipasa
6-Br-2-naftil-β-D-glucósido	β-D-glucosidasa
L-leucil-2-naftilamda aminopeptidasa	leucina
L-valil-2-naftilamda aminopeptidasa	Valina
N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamina	Quimotripsina
fosfato de naftil-AS-BI	Fosfohidralasa
acetato de indoxilo	Lipasa
acetato de N-metilindoxilo	Lipasa
miristato de N-metilindoxilo	Lipasa
acetato de 5-bromoindoxilo	Lipasa
fosfato de 3-indoxilo	Fosfatasa ácida o alcalina
indoxil-β-D-glucósido	β-D-glucosidasa
acetato de 5-Br-4-Cl-3-indolilo	Lipasa
fosfato de 5-Br-4-Cl-3-indolilo	Fosfatasa ácida o alcalina
ácido 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucurónico	β-D-glucuronidasa
diacetilfluoresceína	Lipasa/Esterasa

5 Cuando la enzima indicadora es β-galactosidasa, el sustrato de enzima puede comprender 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal), 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (Mag-gal), 5-bromo-3-indolil-β-D-galactopiranosido (Bluo-gal), 6-bromo-2-naftil-β-D-galactopiranosido, 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (Rose-gal), 3-indoxil-β-D-galactopiranosido (Y-gal), 5-yodo-3-indoxil-β-D-galactopiranosido, N-metilindoxil-β-D-galactopiranosido, 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (PNPG), fenil-β-D-galactopiranosido (P-gal), 2-cloro-4-nitrofenil-β-D-lactósido, 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido, 4-trifluorometilumbeliferil-β-D-galactopiranosido, fluoresceína di(β-D-galactopiranosido) (FDG), fluoresceína mono-β-D-galactopiranosido, fluoresceína di-(β-D-acetil galactosamina), 4-metilumbeliferil-β-D-lactopiranosido, 2-naftil-β-D-galactopiranosido, 8-hidroxiquinolina-β-D-galactopiranosido, resorufina β-D-galactopiranosido, 3-carboxiumbeliferil-β-D-galactopiranosido, 4-clorometil-6,8-difluoroumbeliferil-β-D-galactopiranosido, 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido, 6,8-difluoro-4-heptadecilumbeliferil-β-D-galactopiranosido, 5-(pentafluorobenzoilamino)-fluoresceína-β-D-galactopiranosido, C₂-fluoresceína-β-D-galactopiranosido, C₈-fluoresceína-β-D-galactopiranosido, C₁₂-fluoresceína-β-D-galactopiranosido, 5-clorometilfluorescein-β-D-galactopiranosido, C₁₂-resorufin-β-D-galactopiranosido, 7-hidroxil-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO), o una mezcla de dos o más de los mismos.

20 La concentración de sustrato de enzima en la solución acuosa o medio acuoso puede ser dependiente de la identidad del sustrato enzimático y la enzima indicadora, la cantidad de producto modificado por enzima que debe generarse para ser detectable, ya sea visualmente o mediante instrumento, y la cantidad de tiempo requerido para determinar si está presente la enzima indicadora. La cantidad de sustrato de enzima que puede ser suficiente puede ser la cantidad necesaria para reaccionar con cualquier enzima indicadora que puede estar presente después de que la esterilización se haya completado de modo que un producto modificado por enzima a una concentración molar de al menos aproximadamente 10⁻¹⁵ molar se pueda producir en un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 4 horas, y en una forma de realización una concentración molar de al menos aproximadamente 10⁻⁸ molar en un periodo de hasta aproximadamente 2 horas.

30 El pH de la solución acuosa o medio acuoso que contiene el medio de crecimiento nutriente y sustrato de enzima puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9,5, y en una forma de realización aproximadamente 7,5.

35 Aquí, y en algún sitio más en la presente divulgación, los límites numéricos del intervalo y limitaciones de proporción se pueden combinar. Por tanto, por ejemplo, en lo anterior, aunque no se enumera específicamente, un pH en el intervalo desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 9, y un pH en el intervalo desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 8, están incluidos en el intervalo de pH específicamente divulgado. Los valores intermedios integrales y fraccionales se juzgan que se divulgan en todos los intervalos expuestos en la presente solicitud.

40 El sustrato de enzima en el medio de recuperación puede incubarse con el indicador biológico después de que el indicador biológico se haya sometido al ciclo de esterilización. La incubación puede seguir durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para liberar una cantidad detectable del producto modificado por enzimas, suponiendo que cualquiera de los indicadores biológicos permanece funcional. En general, la cantidad de producto modificado por enzima que se puede detectar puede ser tan baja como aproximadamente 1 x 10⁻¹⁵ molar. Las condiciones de incubación pueden ser suficientes para generar al menos aproximadamente 1 x 10⁻⁸ molar de producto

modificado por enzima, y en una forma de realización desde aproximadamente 1×10^{-6} hasta aproximadamente 1×10^{-5} molar de producto modificado por enzima. El tiempo y la temperatura de incubación necesarios para producir una cantidad detectable de producto modificado por enzima puede depender de la identidad de la enzima indicadora y el sustrato de enzima, y las concentraciones de cada uno presentes en el medio de recuperación. En general, la temperatura de incubación puede estar en el intervalo desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 70°C. El tiempo de incubación puede estar en el intervalo hasta aproximadamente 4 horas, y en una forma de realización en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4 horas, y en una forma de realización en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 horas, y en una forma de realización en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 horas, y en una forma de realización en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1 hora, y en una forma de realización, desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 30 minutos.

Los métodos generalmente aplicables para detectar el producto modificado por enzima que se pueden usar pueden incluir técnicas fotométricas, potenciométricas, gravimétricas, calorimétricas, conductométricas, o amperométricas. Se pueden usar métodos fluorométricos o espectrofotométricos. Por ejemplo, el sustrato de enzima puede comprender un derivado de 4-metilumbeliferilo que al interactuar con la enzima indicadora puede dar lugar a umbeliferona que puede seguirse fluorométricamente o el sustrato puede comprender un nitrofenol, o tipo similar de derivado, que al interactuar con la enzima indicadora puede dar lugar a un producto modificado por enzima que puede seguirse colorimétricamente.

El indicador biológico, aunque se ha descrito en el presente documento principalmente en términos de una enzima indicadora única, puede proporcionar una pluralidad de enzimas indicadoras. Por ejemplo, el indicador biológico puede proporcionar tres tipos de enzimas indicadoras, una enzima que es resistente al calor, una segunda enzima que es resistente a medios esterilizantes gaseosos, y una tercera que es resistente a radiación, por ejemplo, radiación beta o gamma.

Las ventajas de utilizar el indicador biológico genéticamente manipulado divulgado pueden incluir proporcionar resultados de si la esterilización es eficaz dentro de un período de tiempo relativamente corto como se ha descrito anteriormente para el periodo de incubación, ya que el resultado deseado en general será aparente dentro del periodo de incubación, si acaso. En virtud del uso del indicador biológico genéticamente manipulado divulgado, puede ser posible medir la viabilidad de un organismo de prueba directamente, más que por la medida indirecta de una molécula sustituta. El uso del indicador biológico divulgado puede no limitarse a cualquier método particular de esterilización. Es decir, los indicadores biológicos divulgados pueden usarse para cualquier proceso de esterilización. La eficacia de un proceso de esterilización se puede determinar mediante el uso del indicador biológico genéticamente manipulado divulgado sin que requiera crecimiento para proporcionar la confirmación final de la eficacia de la esterilización. Al usar el indicador biológico divulgado, puede no ser necesario emplear un sensor electroquímico para determinar si la esterilización es eficaz, aunque pueden ser posibles resultados más rápidos con un sensor. El indicador biológico divulgado puede ser modificable para usar con aplicaciones instantáneas de lectura tales como aplicaciones de chip o sensor. El indicador biológico genéticamente manipulado divulgado puede aplicarse a cualquier proceso que emplea un organismo más resistente, un organismo clínicamente significativo o un organismo de guerra biológica.

El uso del indicador biológico genéticamente manipulado divulgado para la detección de la eficacia de un proceso de esterilización puede implicar el uso de la medida basada en un modelo teórico genético (solo una célula viva puede expresar un gen). El indicador biológico genéticamente manipulado divulgado puede responder a cualquier suceso letal o combinación de sucesos letales. El indicador biológico divulgado puede proporcionar una respuesta de acción rápida a cualquier modo de acción biocida (vapor, ácido peracético, óxido de etileno, formaldehído líquido, formaldehído gaseoso, peróxido de hidrógeno líquido estabilizado, vapor de peróxido de hidrógeno, calor seco, ozono, orto-ftalaldehído, glutaraldehído, cloraminas, aminos cuaternarias, compuestos fenólicos, yodóforos, radiación ionizante, radiación ultravioleta, luz blanca pulsada, plasma, radiación de microondas, etc.).

Un beneficio significativo de la presente invención incluye evitar la interferencia con la determinación del cambio de color indicador, fluorescencia, etc., que se ha observado en sistemas convencionales debido a la descomposición del inductor que se requiere cuando se incluye un gen represor en el microorganismo del indicador biológico genéticamente manipulado. Al eliminar la necesidad para un gen represor en el microorganismo del indicador biológico genéticamente manipulado, también se elimina la necesidad para cualquier inductor, y por tanto se evita el problema de descoloración debido, por ejemplo, a descomposición de xilosa, y los problemas que pueden surgir de la descomposición de otros inductores. Además, la modificación genética se simplifica significativamente al omitir la necesidad de incluir el gen represor en el vector usado para transfectar el microorganismo indicador.

Ejemplos

Los efectos de la presencia de xilosa, y los efectos de omitir xilosa, y por tanto los beneficios de la presente invención, se muestran en las figuras 4 y 5, que son gráficos de la absorbancia de luz a longitudes de onda que varían de 325 nm a 900 nm, antes de autoclavado, después de un ciclo de autoclave y después de dos ciclos de autoclave. Como se entenderá, al menos el segundo compartimento, que convencionalmente contendría el inductor, experimentará dos ciclos de autoclave antes de que se lea la absorbancia en un proceso para determinar la eficacia de una esterilización.

El primer ciclo de autoclave se produce cuando el indicador de esterilización se fabrica, y es necesario para asegurar la esterilidad del medio de crecimiento y el sustrato enzimático; y el segundo ciclo de autoclave se produce cuando el indicador de esterilización se somete al proceso de esterilización para el que es el indicador.

5 La figura 4 es un gráfico que muestra la absorbancia de un medio de crecimiento sin xilosa (es decir, que contiene xilosa al cero por ciento) antes del autoclavado, después de un único ciclo de autoclave y después de dos ciclos de autoclave. En el ejemplo de la figura 4, el sustrato enzimático de interés absorbe radiación electromagnética a 360 nm y emite fluorescencia a 420 nm. Como se puede ver en el gráfico de la figura 4, hay muy poca diferencia en la absorbancia del medio de crecimiento en la proximidad de 420 nm.

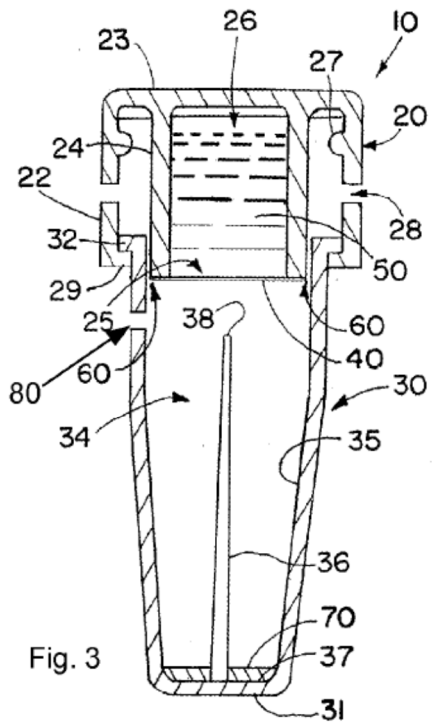
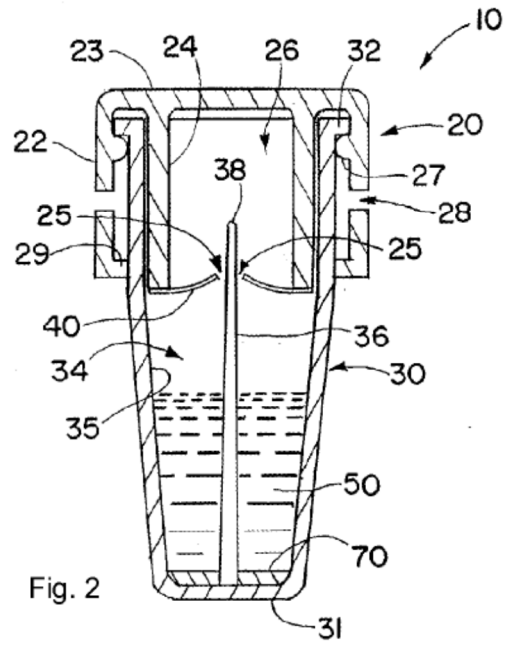
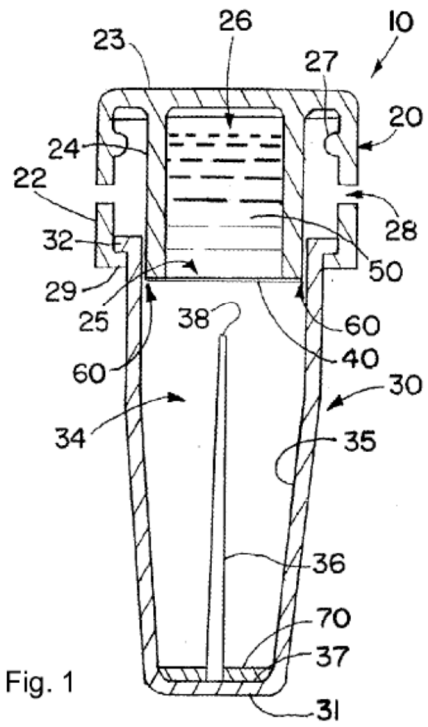
10 La figura 5 es un gráfico que muestra la absorbancia de un medio de crecimiento que contiene xilosa al 1% antes del autoclavado, después de un único ciclo de autoclave y después de dos ciclos de autoclave. En el ejemplo de la figura 5, se usa el mismo sustrato enzimático de interés, que absorbe radiación electromagnética a 360 nm y emite fluorescencia a 420 nm. Como se puede ver en el gráfico de la figura 5, hay muy poca absorbancia del medio de crecimiento inicialmente en la proximidad de 420 nm, pero la absorbancia del medio de crecimiento aumenta drásticamente después de solo un ciclo de autoclave, y la absorbancia del medio de crecimiento aumenta incluso más después del segundo ciclo de autoclave, en la proximidad de 420 nm. La absorbancia del medio de crecimiento autoclavado después de uno o dos ciclos de autoclave es tan grande que se esperaría que al menos de forma parcial y posiblemente de forma total ofuscará cualquier cambio de color o fluorescencia resultante del crecimiento de microorganismos del indicador biológico genéticamente manipulado supervivientes, y que por tanto interfiriera con la determinación de la eficacia de un proceso de esterilización.

20 La presente invención se ha hecho para evitar el problema tan claramente evidente de la comparación del gráfico de la figura 4 con el de la figura 5.

25

REIVINDICACIONES

1. Un indicador de esterilización, que comprende:
- 5 un primer compartimento que contiene un indicador biológico genéticamente manipulado, el primer compartimento está adaptado para permitir que el indicador biológico entre en contacto con un medio de esterilización durante la esterilización; y
- 10 un segundo compartimento que contiene al menos un sustrato de enzima, el segundo compartimento está adaptado para mantener el sustrato de enzima separado del indicador biológico durante la esterilización, y el segundo compartimento está adaptado para permitir que el sustrato de enzima entre en contacto con el indicador biológico después de que el indicador biológico se haya expuesto al medio de esterilización;
- 15 en donde el indicador biológico genéticamente manipulado comprende al menos un microorganismo y al menos un gen indicador adecuado para producir una enzima indicadora, en donde el gen indicador comprende *lacZ*, *bgaB*, *xyIE*, *cat*, o una mezcla de dos o más de los mismos;
- 20 en donde el microorganismo en el indicador de esterilización está libre de cualquier gen represor activo o activable que inhibiría la expresión del gen indicador si estuviera presente en el microorganismo o indicador de esterilización, y
- en donde la enzima indicadora y el sustrato enzimático se seleccionan de modo que la acción enzimática de la enzima indicadora sobre el sustrato enzimático produzca una señal detectable.
- 25 2. El indicador de esterilización de la reivindicación 1 en donde el microorganismo comprende esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y/o *Bacillus atrophaeus*.
3. El indicador de esterilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde la enzima indicadora comprende beta-D-galactosidasa, β -D-galactosidasa termoestable cloranfenicol acetiltransferasa, catecol-2,3-desoxigenasa, o una mezcla de dos o más de las mismas.
- 30 4. El indicador de esterilización de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde el gen indicador comprende *lacZ* o *bgaB* y la enzima indicadora comprende beta-D-galactosidasa.
- 35 5. Un proceso de esterilización, que comprende:
- exponer un artículo que se va a esterilizar y el indicador de esterilización de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 a un medio de esterilización;
- 40 combinar los contenidos del primer compartimento y el segundo compartimento;
- incubar los contenidos combinados del primer compartimento y el segundo compartimento; y
- 45 determinar la eficacia del proceso de esterilización detectando la presencia o ausencia de la señal detectable después de incubar.
6. El proceso de esterilización de la reivindicación 5 en donde el medio de esterilización comprende vapor, calor seco, radiación, plasma, uno o más esterilizantes gaseosos y/o uno o más esterilizantes líquidos.
- 50 7. El proceso de esterilización de la reivindicación 5 en donde el medio de esterilización comprende radiación de haz de electrones, radiación electromagnética, radiación gamma, radiación beta, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno gaseoso, peróxido de hidrógeno líquido, formalina, glutaraldehído, y/o ácido peracético.



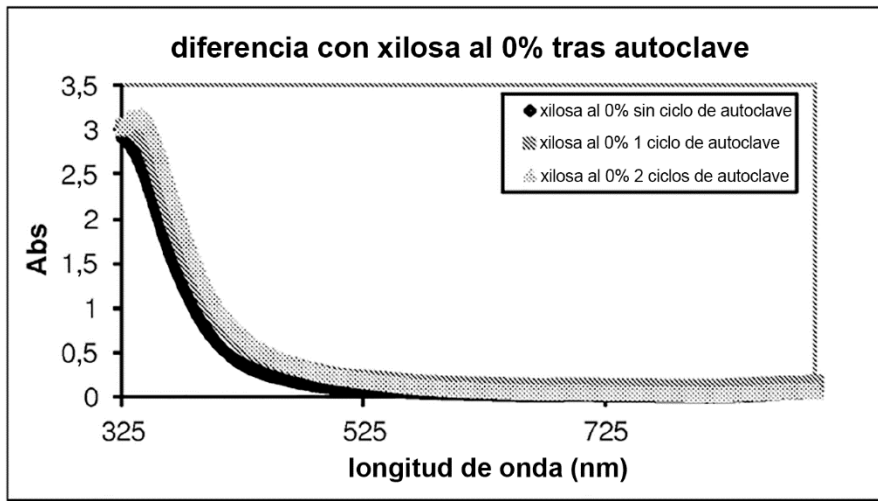


Fig. 4

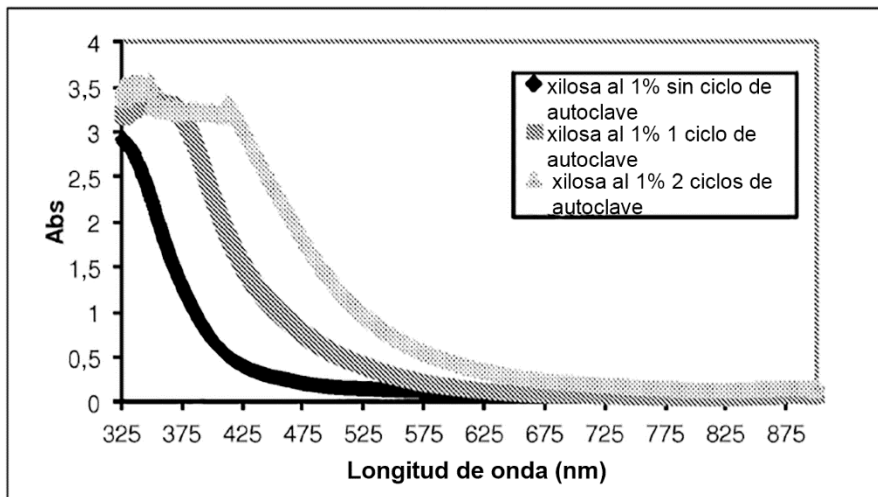


Fig. 5