



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101080498 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200580042835. 2

(22) 申请日 2005. 10. 24

(30) 优先权数据

PCT/US2004/042461 2004. 12. 16 US

11/117, 635 2005. 04. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 06. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/038415 2005. 10. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02006/065349 EN 2006. 06. 22

(73) 专利权人 金伯利-克拉克环球有限公司

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 S·M·马丁 J·G·麦唐纳

A·S·贝韦尔 J·利

R·B·约翰逊

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 曹津燕 郭广迅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 11-083849 A, 1999. 03. 26, 全文, 尤其是摘要, 说明书第 [0002] 段.

US 6524846 B1, 2003. 02. 25, 全文, 尤其是说明书第 3 栏第 1 段, 第 10 栏第 2 段, 权利要求 20-23, 附图 11、12.

W0 02/103356 A1, 2002. 12. 27, 全文, 尤其是说明书第 4 页第 1、2、4、6 段, 第 5 页第 3 段, 第 7 页第 5 段.

审查员 幸颖

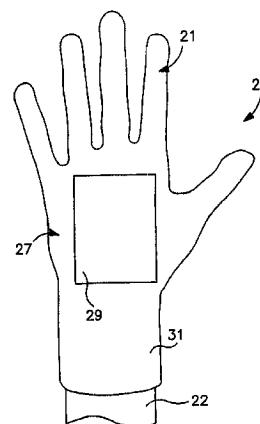
权利要求书 2 页 说明书 28 页 附图 4 页

(54) 发明名称

弹性物品上微生物污染的检测

(57) 摘要

本发明提供了含有色原的弹性物品, 该色原在一种或多种微生物的存在下经历可检测的颜色变化。例如, 在一个实施方案中, 色原为在细菌或其他微生物的存在下经历颜色变化的溶剂化显色染料 (例如 Reichardt 染料)。更特别是, 此类染料可响应微生物成分 (例如细胞膜、细胞质等) 与细胞外环境之间的极性差别。或者, 其他机理可以全部或部分地为染料与微生物之间相互作用的原因, 例如酸-碱反应、氧化还原反应等。



1. 一种弹性物品,所述弹性物品包含弹性材料和微生物敏感性色原,其中所述微生物敏感性色原为溶剂化显色染料,其以有效量存在,以便在一种或多种微生物存在下进行可检测的颜色变化。

2. 权利要求 1 的弹性物品,其中所述微生物敏感性色原存在于所述弹性物品的一个或多个表面上。

3. 权利要求 1 的弹性物品,其中在所述弹性材料内含有所述微生物敏感性色原。

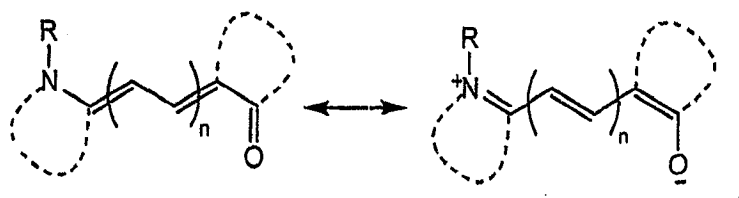
4. 权利要求 1 的弹性物品,其中所述微生物敏感性色原存在于指示剂条上,该指示剂条粘结至所述弹性物品的一个或多个表面,以便使所述色原能够暴露于一种或多种微生物。

5. 前述权利要求中任一项的弹性物品,其中所述微生物敏感性色原存在的量基于所述弹性物品干重计为 0.001%重量至 20%重量。

6. 权利要求 5 的弹性物品,其中所述微生物敏感性色原存在的量基于所述弹性物品干重计为 0.01%重量至 10%重量。

7. 权利要求 1-4 任一项的弹性物品,其中所述染料为吩噻染料。

8. 权利要求 7 的弹性物品,其中所述吩噻染料具有以下结构:

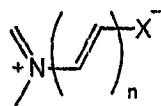


9. 权利要求 1-4 任一项的弹性物品,其中所述染料为两性离子染料。

10. 权利要求 9 的弹性物品,其中所述两性离子染料为 N- 酚盐甜菜碱染料。

11. 权利要求 10 的弹性物品,其中所述 N- 酚盐甜菜碱染料为 4-(2,4,6- 三苯基吡啶鎓-1-基)-2,6- 二苯基酚盐 (Reichardt 染料)。

12. 权利要求 9 的弹性物品,其中所述两性离子染料具有以下结构:



其中:

n 为 0 或更大;和

X 为氧、碳、氮或硫。

13. 权利要求 1-4 任一项的弹性物品,其中所述物品为手套。

14. 一种在弹性物品上测定一种或多种微生物存在的方法,所述方法包括:

将处理组合物涂覆在所述弹性物品,该处理组合物包含色原和载体;和

然后,使所述色原与一种或多种微生物接触,以便使所述色原进行可检测的颜色变化,其中,所述色原为溶剂化显色染料。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述载体为溶剂。

16. 权利要求 14 或 15 的方法,其中所述色原在所述处理组合物中存在的浓度为每毫升载体 0.1 至 100 毫克。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述色原在所述处理组合物中存在的浓度为每毫升载体

0.5 至 60 毫克。

18. 权利要求 14 或 15 的方法,所述方法还包括将所述处理组合物干燥,使所述色原的残留物留下。

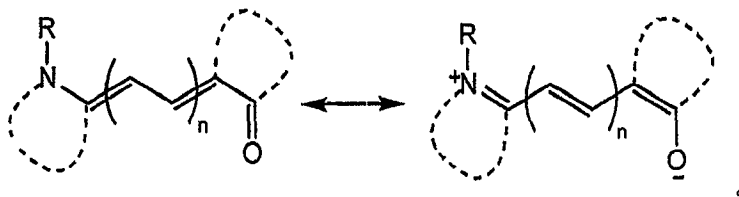
19. 权利要求 14 或 15 的方法,其中将所述处理组合物涂覆在所述弹性物品的表面。

20. 权利要求 14 或 15 的方法,其中在涂覆所述处理组合物前将所述弹性物品灭菌。

21. 权利要求 14 或 15 的方法,其中所述处理组合物还包含环糊精、表面活性剂、粘合剂或其组合。

22. 权利要求 14 或 15 的方法,其中所述染料为吩噻染料。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述吩噻染料具有以下结构:

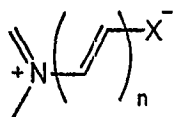


24. 权利要求 14 或 15 的方法,其中所述染料为两性离子染料。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述两性离子染料为 N- 酚盐甜菜碱染料。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述 N- 酚盐甜菜碱染料为 4-(2,4,6- 三苯基吡啶鎓 -1- 基)-2,6- 二苯基酚盐 (Reichardt 染料)。

27. 权利要求 24 的方法,其中所述两性离子染料具有以下结构:



其中:

n 为 0 或更大;和

X 为氧、碳、氮或硫。

28. 权利要求 14 或 15 的方法,其中所述物品为手套。

弹性物品上微生物污染的检测

[0001] 相关申请

[0002] 本发明是 2004 年 12 月 16 日递交的国际专利申请 No. PCT/US2004/042461 的部分连续申请,该国际专利申请要求 2003 年 12 月 16 日递交的美国专利申请 No. 10/737,574 的优先权。

[0003] 发明背景

[0004] 弹性物品的微生物污染在许多应用中是有问题的。例如,在医疗应用中(例如手术),由于感染的可能性和向大量的患者和/或其他医护人员传播感染的潜在性的增加,医护人员戴的弹性手套的微生物污染特别危险。因此,一般采取几个步骤以确保手套无细菌和其他微生物。手术期间,例如,外科医生用强杀菌肥皂和刷子或海绵用力擦洗他的/她的手,以排除有害微生物的存在。然后,外科医生戴上预消毒手套进行操作。在某些情况下,然而,手套的一部分或多个部分可能仍然被微生物污染。例如,手术期间外科医生可能无意间接触了被污染的表面。同样,存在于皮肤毛孔深处的微生物可能在戴上手套后再感染手,如果手套的完整性受到影响,例如当戴手套时手套被钩破或者被器械或骨头碎片戳破,因此将对患者产生危险。

[0005] 除了医疗应用外,弹性物品也可用于其中微生物污染是所考虑问题的其他应用中。例如,触摸食品(例如肉类)的人员经常戴弹性手套,以防止微生物污染。然而,弹性物品将无意间接触食物带的病原体,例如沙门氏菌属(*Salmonella*)和李斯忒氏菌属(*Listeria*)的可能性仍然存在。如果未被发现,这些病原体在产品的包装、运输和陈列期间将繁殖到不受欢迎的程度。例如,温度增加小于 3°C 可缩短食物保存期 50%,并随时间的延长引起细菌生长的显著增加。确实,基于每克食品 10^3 菌落形成单位("cfu")的总致病菌和非致病菌负荷,于 37°C,在如几个小时短的时间内,食物可发生变质。

[0006] 因此,对易于检测弹性物品上微生物存在的技术,目前存在需求。

[0007] 发明概述

[0008] 按照本发明的一个实施方案,公开了包含弹性材料和微生物敏感性色原的弹性物品。微生物敏感性色原(例如溶剂化显色染料)以一种或多种微生物的存在下,有效地进行可检测颜色变化的量存在。

[0009] 按照本发明的另一个实施方案,公开了确定弹性物品上一种或多种微生物存在的方法。该方法包括将处理组合物涂覆在弹性物品上,该处理组合物包含色原和载体。然后,将色原与一种或多种微生物接触,以使色原进行可检测的颜色变化。

[0010] 本发明的其他特征和方面将在下面更详细的讨论。

[0011] 附图简要描述

[0012] 参照附图,本说明书的其余部分更具体地描述,使本发明完全和充分的公开,包括本领域普通技术人员直接得到的其最佳方式,其中:

[0013] 图 1 为根据本发明制备弹性手套的一个实施方案透视图;

[0014] 图 2 为可用于本发明的一种份菁染料的结构;

[0015] 图 3-4 举例说明合成份菁染料的一种方法;

[0016] 图 5 为实施例 22 中所获得结果的图解说明,其中 ΔE 对已知浓度的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 作图;

[0017] 图 6 为实施例 22 中所获得结果的图解说明,其中 ΔE 对已知浓度的铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 作图;

[0018] 图 7 为实施例 22 中所获得结果的图解说明,其中 ΔE 对已知浓度的大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 作图。

[0019] 本说明书和附图中提及特征的重复使用,将表示本发明的相同或类似的特征或元件。

[0020] 代表性实施方案的详述

[0021] 现在,将对本发明的各种实施方案详细说明,下面提出其中的一个或多个实施例。各实施例为了解释本发明而提供,而不是限制本发明。事实上,可在本发明中进行各种修改和变化而不背离本发明的范围或宗旨,这对本领域技术人员而言将是显而易见的。例如,作为一个实施方案的一部分来说明或描述的特征,可用于另一个实施方案中,产生再一个实施方案。因此,本发明将涵盖落入权利要求及其同等权利要求范围内的此类修改和变化。

[0022] 一般而言,本发明涉及弹性物品,该弹性物品含有在一种或多种微生物的存在下进行可检测颜色变化的色原。例如,在一个实施方案中,色原为在细菌或其他微生物的存在下进行颜色变化的溶剂化显色染料(例如 Reichardt 染料)。更特别是,此类染料可对微生物组成(例如细胞膜、细胞质等)和细胞外环境之间的极性差别作出响应。或者,其他机理可能是染料和微生物之间相互作用的全部或部分原因,例如酸-碱反应、氧化还原反应等。

[0023] I. 弹性物品

[0024] 按照本发明的色原可结合至任一种弹性物品。例如,手套和避孕套,以及医疗装置例如扩张球囊、膨胀式套管、外导管、导管球囊、仪器外壳等可用于本发明。弹性物品通常含有由弹性原料形成的弹性材料,例如天然橡胶胶乳、异戊二烯聚合物、氯丁二烯聚合物、氯乙烯聚合物、S-EB-S(苯乙烯-乙烯-丁烯-苯乙烯)嵌段共聚物、S-I-S(苯乙烯-异戊二烯-苯乙烯)嵌段共聚物、S-B-S(苯乙烯-丁二烯-苯乙烯)嵌段共聚物、S-I(苯乙烯-异戊二烯)嵌段共聚物、S-B(苯乙烯-丁二烯)嵌段共聚物、丁二烯聚合物、苯乙烯-丁二烯聚合物、羧基化苯乙烯-丁二烯聚合物、丙烯腈-丁二烯聚合物、羧基化丙烯腈-丁二烯聚合物、丙烯腈-苯乙烯-丁二烯聚合物、羧基化丙烯腈-苯乙烯-丁二烯聚合物、其衍生物等。合适的 S-EB-S 嵌段共聚物例如在 Buddenhagen 等的美国专利 No. 5, 112, 900、Buddenhagen 等的 5, 407, 715、Plamthottam 的 5, 900, 452 及 Plamthottam 的 6, 288, 159 中有描述,为了所有目的,这些专利通过引用而整体结合到本文中。

[0025] 弹性物品可以是单层或多层的。例如,物品可包括覆盖至少一部分弹性材料的涂层。在一个特定的实施方案中,穿戴层可用于使弹性手套更容易套入使用者的手。合适的穿戴层材料的某些实例包括但不限于聚丁二烯(例如间规 1,2-聚丁二烯)、聚氨酯、嵌段共聚物等。此类聚合物的其他实例在 Littleton 等的美国专利 No. 5, 792, 531 中有描述,为了所有目的,该专利通过引用而整体结合到本文中。润滑剂也可涂覆穿戴层,以进一步有助于湿法和/或干法润滑。例如,润滑剂可包括阳离子表面活性剂(例如氯化十六烷基吡啶鎓)、阴离子表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠)、非离子表面活性剂(例如聚乙二醇)等。润滑剂也可含有聚硅氧烷乳剂,例如 DC365(Dow Corning)或 SM2140(GE Silicones)。

[0026] 按照本发明制备的弹性物品通常可用本领域已知的各种方法形成。例如,弹性物品形成技术可使用浸渍、喷雾、氯化、干燥、固化以及任何其他本领域已知的技术。形成可用于本发明的弹性物品的合适方法的某些实例在 Buddenhagen 等的美国专利 No. 5, 112, 900、Buddenhagen 等的 5, 407, 715、Chen 的 5, 742, 943、Littleton 等的 5, 792, 531、Plamthottam 的 5, 900, 452、Plamthottam 的 6, 288, 159 及 Weikel 等的 6, 306, 514 中有描述,为了所有目的,这些专利通过引用而整体结合到本文中。

[0027] 例如,在某些实施方案中,最初将具有物品形状,例如弹性手套手形的定型模浸入到含弹性材料凝结剂的浴中。该浴也可包括其他任选的成分,例如表面活性剂、水、含钙离子的盐(例如硝酸钙和/或碳酸钙)等。该盐例如可打破天然橡胶胶乳乳液的保护系统,并且也使发粘的胶乳更容易从定型模中除去,因此起脱模剂的作用。表面活性剂可提供良好的湿润效果,以避免形成弯液面并捕获该形式和沉积的胶乳之间的空气,特别是在胶管管头区域。如果期望,可将定型模预热,以便余热将水干燥除去,将例如硝酸钙、碳酸钙和表面活性剂留在定型模表面。其他合适的凝结剂溶液也在 Jounq 的美国专利 No. 4, 310, 928 中有所描述,为了所有目的,该专利通过引用而整体结合到本文中。

[0028] 浸入凝结剂组合物中后,将定型模取出并令其干燥。然后,定型模可浸在含弹性聚合物浴的罐中,形成基体体。该浴含有例如天然橡胶胶乳、稳定剂、抗氧化剂、固化活化剂、有机促进剂、硫化剂等。将定型模浸在一个或多个胶乳浴中足够数量的次数,以在定型模上形成所期望的厚度。作为实例,基体体的厚度可为约 0.1 至约 0.3 毫米。如果手套正在形成,可使用卷边站为其赋予胶管管头。然后将胶乳涂覆的定型模浸在浸提罐中,在该罐中热水循环流动以除去水溶性组分,例如残留的硝酸钙和天然胶乳中含有的蛋白质。该浸提方法可在水温为约 49℃ 的罐中,连续进行约 12 分钟。然后,物品可任选浸入溶液中,以形成涂层。一旦涂覆,定型模被送至固化站(例如烘箱),在该站胶乳被硫化或固化。然后,可用各种其他处理组合物(例如润滑剂、卤化剂等)“离线”(即剥离后)或“在线”涂覆弹性物品。

[0029] II. 微生物敏感性色原

[0030] 一般来说,用于本发明的微生物敏感性色原具有发出一种或多种微生物存在信号的能力。按照本发明,通常可检测各种不同类型微生物中的任何一种,例如细菌、真菌、病毒、霉菌、酵母等。例如,本发明的微生物敏感性色原可检测各种不同形状、细胞排列和组成的细菌。例如,大多数细菌具有五种基本细胞形状之一,即(1)圆形或球菌,(2)棒状或杆菌,(3)螺旋形或螺旋菌,(4)逗号形或弧菌及(5)细丝形。同样,可能的细胞排列实例包括双球菌(例如成对)、链球菌(例如链状)及葡萄球菌(例如成串)。例如,已知双球菌引起肺炎。链球菌经常与“链球菌咽炎”相关联。由于其在“葡萄球菌感染”和某些类型的食物中毒中所起的作用,葡萄球菌对许多人来说是熟悉的。细菌在大小上也多少有变化,但是每个细菌通常平均为约 1/25,000 英寸(2.54cm)。在某些情况中,形状或细胞排列可赋予微生物对特定色原的敏感性。

[0031] 虽然细菌通常含有由脂多糖的脂质双层形成的细胞膜(即细胞壁),细菌类型的组成可用革兰氏反应(细菌分类的染色法)更具体地分类。例如,革兰氏阳性菌在醇或丙酮的存在下呈结晶紫色斑,并包括例如放线菌属(Actinomyces)、芽孢杆菌属(Bacillus)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)、纤维单胞菌属(Cellulomonas)、梭状芽孢

杆菌属 (*Clostridium*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。某些革兰氏阳性菌,尤其是棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 和诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 甚至能在酸的存在下染色。这些细菌称为耐酸性细菌。革兰氏阴性菌在醇或丙酮的存在下不呈结晶紫色斑,并包括例如醋杆菌属 (*Acetobacter*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、博德特氏菌属 (*Bordetella*)、布鲁氏菌属 (*Brucella*)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、柄杆菌属 (*Caulobacter*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、埃希氏杆菌属 (*Escherichia*)、螺杆菌属 (*Helicobacterium*)、军团菌属 (*Legionella*)、Nesseria、硝化杆菌属 (*Nitrobact*)、巴斯德氏菌属 (*Pasteurelia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、立克次氏体属 (*Rickettsia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、*Veillonella*、弧菌属 (*Vibrio*)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 和耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)。

[0032] 革兰氏阴性细胞膜包括作为主要成分的脂多糖,并且另外包括磷脂、蛋白质、脂蛋白和少量肽聚糖。脂多糖成分具有多糖部分的重复单元或侧链与之相连的核区域。这些侧链的化学组成,关于不同糖的组成和排列两者,决定了菌体抗原或 O 抗原决定因素的性质。这些决定因素,反过来可用于在血清学上将许多革兰氏阴性类菌分类。例如,属于完全不同属并具有强的血清学交叉反应性的革兰氏阴性菌的某些类型,然而具有化学上类似的碳水化合物部分作为其脂多糖侧链的一部分,这些侧链通常具有约 30 个重复单元。革兰氏阳性菌的细胞膜包括肽聚糖、多糖和 / 或磷壁酸。肽聚糖 (也称为“胞壁质”) 为聚糖链的杂聚物,并且通过短肽交联。胞壁质的基础是 β -1,4-连接的 N-乙酰基氨基葡萄糖和 N-乙酰基胞壁酸的交替残基链。这些链通过含 L- 和 D- 氨基酸的短多肽链交联。

[0033] 尽管共享共同的特征,然而革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的表面排列和组成不同。例如,革兰氏阴性菌具有脂多糖 (LPS) 覆盖的外膜。LPS 提供给革兰氏阴性菌表面净负电荷并使其致病。另一方面,革兰氏阳性菌由厚的肽聚糖 (或胞壁质) 片样层覆盖。这些片由交替的 N-乙酰基氨基葡萄糖和 N-乙酰基胞壁酸分子形成。磷壁酸也在革兰氏阳性菌中发现,并可与 N-乙酰基胞壁酸连接。虽然革兰氏阴性菌也具有肽聚糖,但是革兰氏阳性菌上的层要厚得多。革兰氏阴性菌的肽聚糖层也位于 LPS 层下,使其较不易从表面接近。

[0034] 除细菌之外,其他有关的微生物包括属于真菌界的霉菌和酵母 (例如白色念珠菌 (*Candida albicans*))。例如,接合菌门 (*Zygomycota*) 是包括黑面包霉菌和显示与植物和动物共生关系的其他霉菌的一类真菌。这些霉菌能够融合并形成硬的“接合孢子”。子囊菌门 (*Ascomycota*) 是另一类真菌,它包括酵母、粉状霉、黑和蓝-绿霉菌及引起疾病例如荷兰榆木疾病、苹果黑星病和麦角病的某些属。这些真菌的生存期将有性繁殖和无性繁殖结合在一起,菌丝被细分成允许核和细胞质通过的多孔壁。半知菌纲 (*Deuteromycota*) 是另一类真菌,它包括不易于适合上述分类的真菌或担子菌门 (*Basidiomycota*) 类 (它包括大部分蘑菇状真菌、孔真菌和马勃真菌) 的各种集合。半知菌纲包括产生奶酪和青霉素的属,但是也包括引起疾病的成员,例如导致脚癣和癣菌病的那些成员。

[0035] 不管目的微生物的类型,可按照本发明选择微生物敏感性色原,该色原以某种方式与微生物细胞膜和 / 或微生物存在的环境相互作用。作为该相互作用的结果,色原经历

了易于检测（例如用肉眼）的颜色变化。术语“颜色”涉及从物体反射或发射的某些波长的光在视野中的存在或不存在。例如，进入眼中的光由对可见光谱特殊区域敏感的三种类型的视网膜圆锥细胞进行光谱分析。这些细胞的刺激又被视网膜神经元、视神经神经元和视皮质处理，以便经历颜色的感觉。应用于本发明的色原通常将其颜色归因于某些波长的光的吸收。因此，感觉到的颜色通常是与被物体吸收的光的波长相关的颜色补充。例如，当在白光下观察似乎是红色的物体，事实上正在选择性吸收波长范围为 490-500 纳米的蓝光。类似地，在白光下似乎是黄色的物体，事实上在吸收波长范围为 435-480 纳米的蓝光。

[0036] 可见光的吸收与分子中的电子跃迁有关，并导致激发态的产生。分子基态与相关激发态之间的能量差决定了按照普朗克公式吸收的光的波长：

[0037] $E = h\nu$

[0038] 其中，

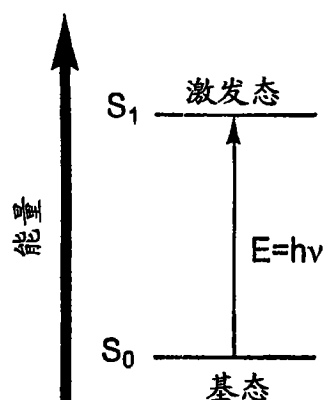
[0039] E 为能量，

[0040] h 为普朗克常数，

[0041] ν 为所吸收光的光子频率，并通过 $\nu = c/\lambda$ 与波长 λ 和光速 c 相关。

[0042] 如下所示，可用状态图图示电子的跃迁：

[0043]



[0044] 被吸收光子的能量因此与该光子的波长成反比。因此，蓝光（435-480 纳米）的光子具有比黄光（580-595 纳米）更高的能量。因此，色原的颜色由该色原的基态和第一允许激发态之间的跃迁能量决定。

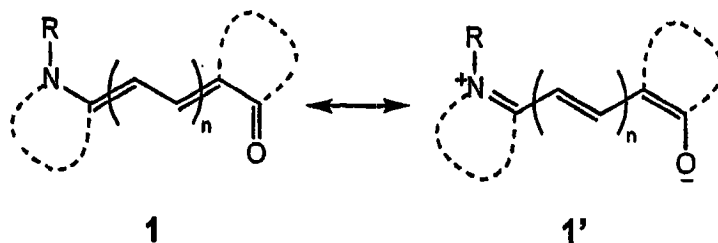
[0045] 本发明所采用色原的光吸收部分为通常引起该色原颜色并与共轭系统相连的发色团。例如，偶氮基团（例如偶氮染料）、多烯基团（例如胡萝卜素染料）、羰基（例如蒽醌染料）是普通的发色团。助色团可以诱导发色团的最大吸收向光谱的红端转移（红移），或向光谱的蓝端转移（蓝移）。助色团可以与或不与色原共轭。例如，通过例如苯环与偶氮基团（发色团）共轭的氨基，将形成氨基偶氮色原。吸收位移的类型取决于发色团的性质，例如，在产生蓝移的情况中，取决于助色团是否起电子受体的作用，或者在产生红移的情况中，取决于氨基是否起电子供体的作用。例如，共轭的氨基助色团将使偶氮基团的吸收带移到更长的波长处，并增加该吸收带的强度。吸收位移提供了可用视觉或通过仪器检测的色差。

[0046] 在一种或多种微生物的存在下，可进行可检测颜色变化的一类特别合适的色原是溶剂化显色染料。溶剂化显色染料是在紫外 / 可见 / 近红外光谱中具有光谱特征（例如吸

收)的染料,并且有时受周围介质影响。溶剂化显色染料可以是阳性的或者是阴性的,这分别相应于随着溶剂极性的增加发射带的红移和蓝移。在一个实施方案中,例如,溶剂化显色染料在某些基于溶剂极性和/或氢键合倾向的分子环境中进行了颜色变化。例如,溶剂化显色染料在极性环境(例如水)中颜色可以是蓝色,但是在非极性环境(例如富含脂质的溶液)中可以是黄色或红色。由溶剂化显色染料产生的颜色取决于该染料基态和激发态之间的分子极性差别。

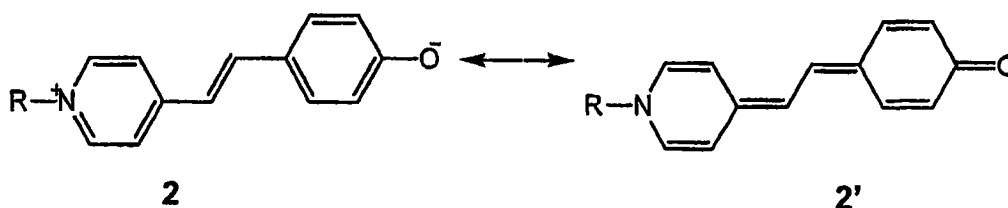
[0047] 份菁染料(例如单-、二-和三-份菁)是可应用于本发明中的溶剂化显色染料类型的一个实例。份菁染料,例如份菁 540 在如在“有机分子的颜色和构成 (Colour and Constitution of Organic Molecules)”Academic Press, London(1976) 中讨论的 Griffiths 供体-简单受体色原分类的范围内。更具体地讲,份菁染料具有被具有偶数次甲基碳的共轭链分离的碱性核和酸性核。此类染料具有起电子受体部分作用的羰基。该电子受体与电子供给基团例如羟基或氨基共轭。份菁染料可以是环状或无环的(例如环状份菁染料的乙烯基类似物(vinylalogous)酰胺)。例如,环状份菁染料通常具有以下结构:

[0048]



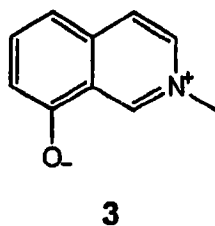
[0049] 其中, n 为任何整数,包括 0。如上述通用结构 1 和 1' 所示,份菁染料通常具有电荷分离(即“两性离子”)的共振形式。两性离子染料是那些含有正电荷和负电荷并且是纯中性的,但是高度带电荷的染料。无意受理论的限制,认为两性离子形式对染料的基态有明显的贡献。由此类染料产生的颜色因此取决于染料基态和激发态之间分子极性差。以下结构 2 提出了基态比激发态极性更大的份菁染料的一个特定实例。

[0050]

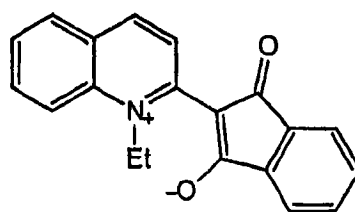


[0051] 电荷分离的左手规范形式 2 是基态的主要贡献者,而右手规范形式 2' 是第一激发态的主要贡献者。以下结构 3-13 中提出了合适的份菁染料的还其他实例。

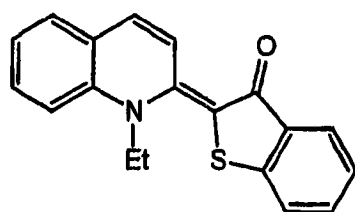
[0052]



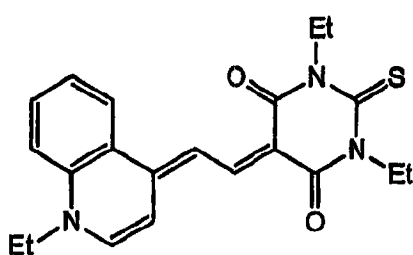
[0053]



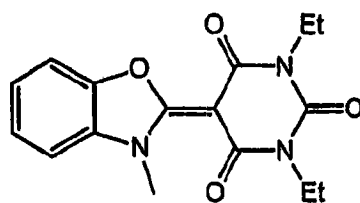
4



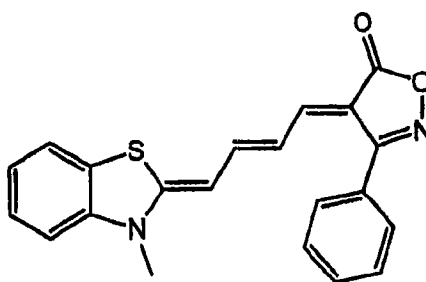
5



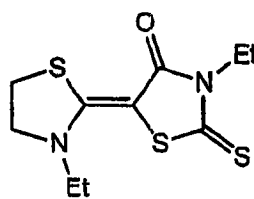
6



7

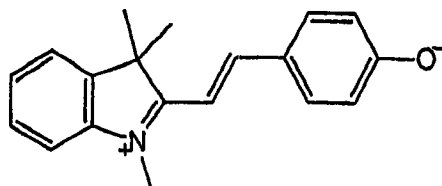


8

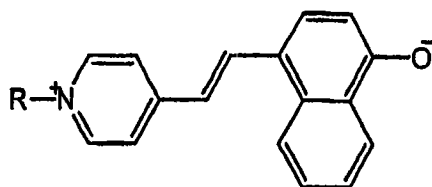


9

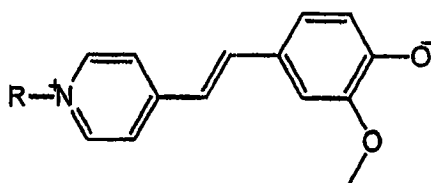
[0054]



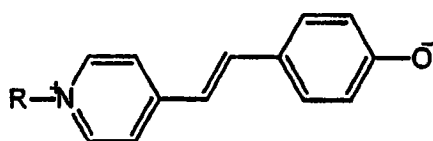
10



11



12

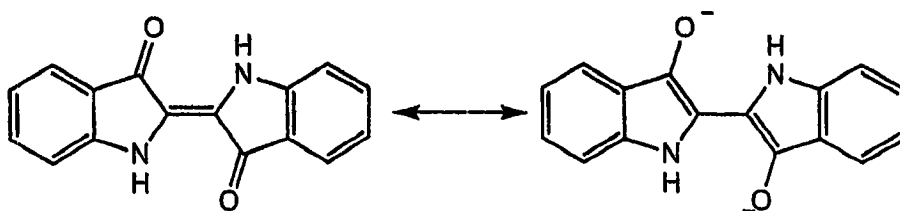


13

[0055] 其中，“R”为基团，例如甲基、烷基、芳基、苯基等。

[0056] 靛蓝是用于本发明的合适的溶剂化显色染料的另一个实例。靛蓝具有极性明显小于激发态的基态。例如，靛蓝通常具有以下结构 14：

[0057]



14

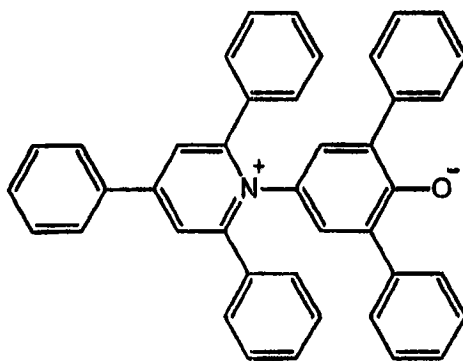
14'

[0058] 左手规范形式 14 是该染料基态的主要贡献者，而右手规范形式 14' 是激发态的主要贡献者。

[0059] 可用于本发明的其他合适的溶剂化显色染料包括具有永久两性离子形式的那些染料。即这些染料具有含在邻近的 π -电子系统内的正电荷和负电荷形式。与上述吩噻染料相反，不能画出此类永久两性离子色原的中性共振结构。示范性的该类染料包括甜菜碱染料，例如具有以下通用结构 15 的 4-(2,4,6-三苯基吡啶鎓-1-基)-2,6-二苯基酚盐

(Reichardt 染料)。

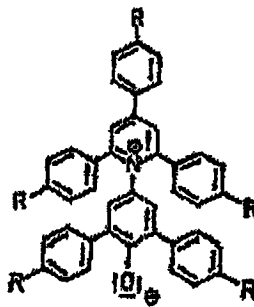
[0060]



15

[0061] Reichardt 染料溶剂化显色显示强阴性。即 Reichardt 染料显示出吸收向更短的波长移动,因此当溶剂洗脱浓度(极性)增加时具有可见的颜色变化。以下结构 16-22 中描述了合适的溶剂化显色阴性的吡啶鎓 N- 酚盐甜菜碱染料的还其他实例:

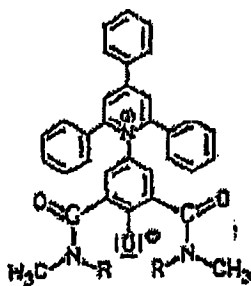
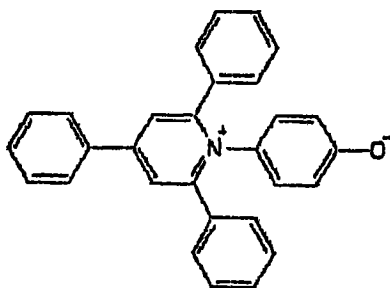
[0062]



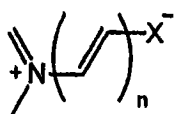
16

[0063] 其中, R 为氢、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 或 C_6F_{13} 。

[0064]

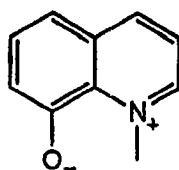
**21****22**

[0066] 具有永久两性离子形式的染料的再一些实例包括具有以下通用结构 23 的染料：
[0067]

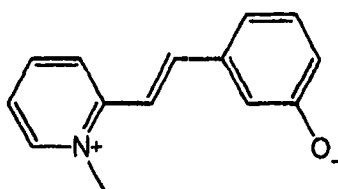
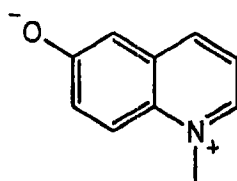
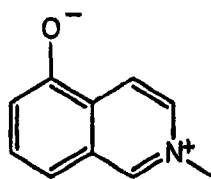
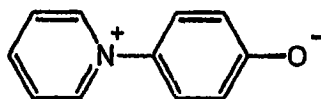
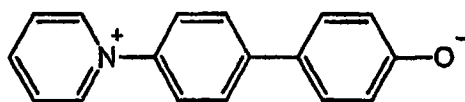
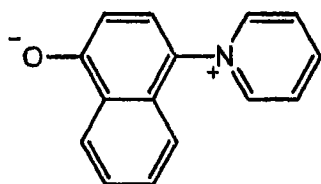
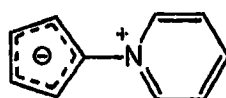
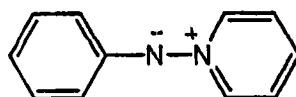
**23**

[0068] 其中, n 为 0 或更大, X 为氧、碳、氮、硫等。结构 23 中所示的永久两性离子染料的特定实例包括以下结构 24-32。

[0069]

**24**

[0070]

**25****26****27****28****29****30****31****32**

[0071] 还其他合适的溶剂化显色染料可包括但不限于4-二氰基亚甲基-2-甲基-6-(对-二甲基氨基苯乙烯基)-4H-吡喃 (DCM)、6-丙酰基-2-(二甲基氨基) 萘

(PRODAN)、9-(二乙基氨基)-5H-苯并[a]吩恶嗪-5-酮(尼罗红)、4-(二氰基乙烯基)久洛尼定(DCVJ)、酚蓝、苯乙烯基吡啶鎓染料、香豆素染料、酮基菁蓝染料、N,N-二甲基-4-硝基苯胺(NDMNA)及N-甲基-2-硝基苯胺(NM2NA)、尼罗蓝、1-苯氨基萘-8-磺酸(1,8-ANS)及dapoxyl丁基磺酰胺(DBS)和其他dapoxyl类似物。除了上面提及的染料外,可用于本发明的还其他合适的染料包括但不限于4-[2-N-取代-1,4-氢化吡啶-4-次基]亚乙基]环己-2,5-二烯-1-酮、红吡啶酮染料、甲亚胺染料、靛苯胺染料及其混合物。

[0072] 虽然将上述染料归为溶剂化显色染料类,但是应理解本发明不必要将在微生物的存在下色原的可检测颜色变化限于任何特定机理。例如,甚至在采用溶剂化显色染料时,其他机理事实上可完全或部分地为在微生物的存在下染料颜色变化的原因。例如,酸-碱反应或染料和微生物之间的质子供给反应可产生颜色变化。作为实例,细菌细胞壁上高度组织化的酸部分可使某些染料质子化,导致颜色的损失。染料和微生物之间的氧化还原反应同样地可对颜色变化有贡献。

[0073] III. 施用至弹性物品上

[0074] 根据本领域已知的任何技术,通常可将色原施用至弹性物品。在某些实施方案中,将色原加入到处理组合物中,以促进其施用至弹性物品上。处理组合物的性质可根据色原的性质、弹性物品、施用技术等变化。例如,处理组合物可含有起流动相作用的色原载体。该载体可为液体、气体、凝胶等,并且可以选择,以提供所期望的色原性能(颜色变化的时间、不同区域之间的对比及灵敏度)。在某些实施方案中,例如载体可为水性溶剂例如水,以及非水性溶剂例如二醇(例如丙二醇、丁二醇、三甘醇、己二醇、聚乙二醇、乙氧基二甘醇及一缩二丙二醇);醇(例如甲醇、乙醇、正丙醇及异丙醇);甘油三酯;乙酸乙酯;丙酮;三醋精;乙腈、四氢呋喃;二甲苯;甲醛(例如二甲基甲酰胺)等。载体也可作为消毒剂或杀菌组合物。载体和色原在处理组合物中的量,通常可基于微生物敏感性的水平及所用的颜色图案或设计变化。例如,在某些实施方案中,处理组合物中色原的浓度可为约0.1至约100毫克/毫升载体,在某些实施方案中为约0.5至约60毫克/毫升载体,及在某些实施方案中为约1至约40毫克/毫升载体。

[0075] 除了色原和载体外,处理组合物也可含有各种其他组分。在一个实施方案中,例如,将添加剂加入到处理组合物中,以提高色原的性能。例如,环糊精可提高色原的敏感性及其不同颜色区域之间的对比度。虽然不希望受理论的束缚,但是本发明人相信此类添加剂可抑制染料的结晶,并因此提供更鲜明的颜色,也提高了检测的灵敏度。即因为每个染料分子自由地与微生物膜相互作用,所以单一染料分子对微生物具有更大的敏感性。相反,小的染料结晶必须首先溶解,然后渗透至膜中。合适的环糊精的实例可包括但不限于羟丙基- β -环糊精、羟乙基- β -环糊精、 γ -环糊精、羟丙基- γ -环糊精及羟乙基- γ -环糊精,它们在商业上可从Cerestar International of Hammond, Indiana获得。

[0076] 表面活性剂也有助于提高色原的敏感性及其不同区域之间的对比度。特别期望的表面活性剂有非离子表面活性剂,例如乙氧基化烷基酚、乙氧基化和丙氧基化脂肪醇、环氧乙烷-环氧丙烷嵌段共聚物、(C₈-C₁₈)脂肪酸的乙氧基化酯、环氧乙烷与长链胺或酰胺的缩合产物、环氧乙烷与醇的缩合产物、炔二醇及其混合物。合适的非离子表面活性剂的各种具体实例包括但不限于甲基 gluceth-10、PEG-20 甲基葡萄糖二硬脂酸酯、PEG-20 甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯、C₁₁₋₁₅pareth-20、ceteth-8、ceteth-12、dodocynol-12、laureth-15、PEG-20

蓖麻油、聚山梨酯 20、steareth-20、聚氧化乙烯-10 十六烷基醚、聚氧化乙烯-10 十八烷基醚、聚氧化乙烯-20 十六烷基醚、聚氧化乙烯-10 十八烷基醚、聚氧化乙烯-20 十八烷基醚、乙氧基化壬基苯酚、乙氧基化辛基苯酚、乙氧基化十二烷基苯酚或包括 3-20 个环氧乙烷部分的乙氧基化 (C_6-C_{22}) 脂肪醇、聚氧化乙烯-20 异十六烷基醚、聚氧化乙烯-23 甘油月桂酸酯、聚氧化乙烯-20 甘油硬脂酸酯、PPG-10 甲基葡萄糖醚、PPG-20 甲基葡萄糖醚、聚氧化乙烯-20 脱水山梨醇单酯、聚氧化乙烯-80 蓖麻油、聚氧化乙烯-15 十三烷基醚、聚氧化乙烯-6 十三烷基醚、聚乙二醇单十二醚-2、聚乙二醇单十二醚-3、聚乙二醇单十二醚-4、PEG-3 蓖麻油、PEG600 二油酸酯、PEG400 二油酸酯及其混合物。可从商业上获得的非离子表面活性剂可包括可从 AirProducts and Chemicals of Allentown, Pennsylvania 获得的 **SURFYNOL**[®] 系列的炔二醇表面活性剂, 和可从 Fischer Scientific of Pittsburgh, Pennsylvania 获得的 **TWEEN**[®] 系列的聚氧化乙烯表面活性剂。

[0077] 在某些实施方案中, 处理组合物也可含有粘合剂, 以促进色原固定在所期望的基体上。例如, 水溶性有机聚合物可用作粘合剂。一类合适的水溶性有机聚合物包括多糖及其衍生物。多糖是含有重复碳水化合物单元的聚合物, 它可以是阳离子的、阴离子的、非离子的和 / 或两性的。在一个特定的实施方案中, 多糖为非离子、阳离子、阴离子和 / 或两性纤维素醚。合适的非离子纤维素醚可包括但不限于烷基纤维素醚, 例如甲基纤维素和乙基纤维素; 羟烷基纤维素醚, 例如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基羟丁基纤维素、羟乙基羟丙基纤维素、羟乙基羟丁基纤维素和羟乙基羟丙基羟丁基纤维素; 烷基羟烷基纤维素醚, 例如甲基羟乙基纤维素、甲基羟丙基纤维素、乙基羟乙基纤维素、乙基羟丙基纤维素、甲基乙基羟乙基纤维素和甲基乙基羟丙基纤维素等。

[0078] 处理组合物可直接涂覆在弹性物品或者通过使用指示剂条涂覆。例如, 指示剂条可含有有用处理组合物涂覆的并且随后置于与弹性物品接触的基体。各种众所周知的涂覆技术中的任一种可用于本发明。合适的涂覆技术包括印刷、浸渍、喷雾、熔融挤出、涂覆 (例如溶剂涂覆、粉末涂覆、刷涂等) 等。涂覆后, 将处理组合物干燥, 以除去载体, 并将色原的残余物留下, 以便与微生物相互作用。例如, 可将处理组合物印刷到基体表面上, 以在颜色变化时指示微生物的存在。处理组合物可覆盖所有基体表面或仅覆盖一部分。在一个实施方案中, 例如, 处理组合物以给使用者传达某些信息的标记形式印刷。

[0079] 基体可由各种能够用处理组合物涂覆的材料中任一种形成。例如基体可由膜、纸、非织造织物、针织织物、织造织物、泡沫等形成。在一个特定的实施方案中, 基体为通常用于制备标签的面材材料, 例如纸、聚酯、聚乙烯、聚丙烯、聚丁烯、聚酰胺等。粘合剂, 例如压敏粘合剂、热活化粘合剂、热熔粘合剂等可用于一个或多个面材材料的表面上, 以帮助将其粘合至弹性物品。合适的压敏粘合剂的实例包括例如基于丙烯酸的粘合剂和弹性粘合剂。在一个实施方案中, 压敏粘合剂基于丙烯酸酯 (例如丙烯酸 2-乙基己酯) 与极性共聚单体 (例如丙烯酸) 的共聚物。粘合剂的厚度可在约 0.1 至约 2 密耳 (2.5-50 微米) 的范围内。也可采用在使用前接触粘合剂的释放衬里。释放衬里可含有本领域技术人员已知的任何一种材料, 例如聚硅氧烷涂覆的纸或膜基体。使用期间, 被处理的基体和粘合剂从释放衬里中剥出。然后, 将粘合剂置于接近弹性物品的期望位置, 以使被处理基体暴露于环境中。

[0080] 一般而言, 指示剂条可施用至所期望的弹性物品的任何部分, 只要色原能够在使用期间接触目的微生物。例如, 指示剂条可施用至手套的外部、掌心表面, 以使色原能够接

触手套在其中使用的环境中存在的微生物。同样,指示剂条可施用至手套的内部、穿戴表面,以使色原能够接触使用者手上存在的微生物。指示剂条可覆盖整个手套表面、手套表面的大部分或仅手套表面的小部分。此外,指示剂条可具有各种不同的形状,例如圆形、正方形、矩形、椭圆形、三角形、点状等。如果期望,也可采用多个指示剂条,并置于弹性物品的各个部位。

[0081] 例如来看图 1,图 1 显示了可被置于使用者手 22 上的手套 20 的一个实施方案。手套 20 具有由弹性材料限定的外部掌心表面 31 和内部穿戴表面(未显示)。弹性材料具有手指区 21、掌侧 27 和顶侧(未显示)。在该图解实施方案中,含色原的指示剂条 29 位于手套 20 的外表面 31,并在掌侧 27 上形成。以此方式,色原位于使用期间最易受微生物污染的表面上。虽然上述讨论是指处理组合物施用至物品,但是应理解添加剂也可独立于含色原的处理组合物施用。

[0082] 除了使用指示剂条外,本发明也考虑用如上述的各种施用技术中任一种,将处理组合物直接施用至弹性物品的实施方案。例如,在一个实施方案中,将处理组合物浸涂或喷涂到一个或多个弹性物品表面。同样,也可将处理组合物加入到弹性物品的基质中。例如,在某些实施方案中,色原可被包括在凝结剂、胶乳、涂层或其他用于形成物品的材料中。以该方式,在形成物品时色原将均匀地分布在弹性材料中。在某些情况中,色原可用于作用于可从商业上获得的弹性物品中的颜料和/或染料的替代物。例如,色原可用作可从 Kimberly-Clark, Inc 获得的 **Safeskin® Purple Nitrile™** 或 **Safeskin® Neon Nitrile™** 手套的颜料的替代物。当然,色原也可与弹性物品形成方法中的其他步骤联合使用,例如加入到经常涂覆在弹性物品表面上的聚硅氧烷乳剂和/或表面活性剂溶液中。

[0083] 不管其施用方式,所采用色原的量对与一种或多种微生物接触后产生可检测的颜色变化是有效的。精确的数量可基于各种因素变化,包括色原的敏感性、处理组合物中其他添加剂的存在、所期望检测能力的程度(例如用肉眼)、微生物的浓度、预定的应用等。在某些情况中,期望仅在认为致病的浓度下检测微生物的存在。例如,在基于食物的应用中,每毫升储液 1×10^3 菌落形成单位("CFU")的细菌载量可认为是安全阈值水平。在此类实施方案中,色原可以足够仅检测细菌载量大于 1×10^3 CFU/毫升的量存在。同样,色原的量通常足够低,以致不会有害地影响物品的强度和拉伸特性。虽然实际量可按上面描述的变化,但是基于弹性物品干重计,色原的量通常为约 0.001% 重量至约 20% 重量,在某些实施方案中为约 0.01% 重量至约 10% 重量,在某些实施方案中为约 0.1% 重量至约 5% 重量。其他添加剂(例如环糊精、表面活性剂、粘合剂等)的量也可按所期望的变化,例如基于弹性物品干重计为约 0.001% 重量至约 10% 重量,在某些实施方案中为约 0.01% 重量至约 5% 重量,在某些实施方案中为约 0.025% 重量至约 1% 重量。

[0084] 应理解:一种或多种添加剂,例如上面描述的那些可与处理组合物分别施用至基体和/或弹性物品。在一个特定的实施方案中,添加剂独立施用以防止假阳性读数。例如,甚至在无微生物存在的情况下,某些漂白化合物(例如次氯酸钠、氯和亚硫酸氢钠)也可能引起色原的颜色变化。因此,如果期望,可将漂白指示剂施用至弹性物品,以指示漂白剂的存在。该漂白指示剂的一个实例为 2,2',5,5'-四甲基联苯胺,它在正常情况下为无色,而在暴露于氯或次氯酸钠时变成红色。漂白指示剂也可与淀粉与碘的组合,该组合物在氯或次氯酸盐的存在下变成黑色。还另一个漂白指示剂即品红,可用于检测亚硫酸盐(例如

焦亚硫酸氢钠)。品红为粉红色,并在暴露于亚硫酸盐时变为无色。这样,弹性物品的区域可被指定为对微生物敏感的区域和对漂白剂敏感的其他区域,以使含活性漂白剂的表面给出颜色变化组合,使使用者能够区别微生物污染和漂白剂。漂白指示剂可印刷成图案,拼出字" BLEACH",以使如果该物品与漂白剂接触," BLEACH" 将同漂白剂可使色原产生的任何其他颜色变化一起变成可见的。漂白指示剂的量可为足够引起可检测颜色变化的量。

[0085] 正如上面所提及的,弹性物品有时在使用前进行灭菌操作。在此类情况下,任何预施用的色原可能已经接触了一种或多种微生物并且改变了颜色。然而,灭菌后,引起颜色变化的微生物通常被除去。因此,在本发明的某些实施方案中,可将色原密封与环境隔绝,以抑制灭菌前过早颜色变化的可能性。例如,可将含色原的处理组合物密封在容器或瓶子中。当期望使用该色原时,例如在灭菌后,将内容物取出,并且例如通过喷雾涂覆在弹性物品上。在另一个实施方案中,可将含色原的指示剂条密封在由液体不渗透性膜和 / 或蒸气不渗透性膜形成的包装中。要使用该指示剂条,只要将该包装打开,将指示剂条取出并置于弹性物品上。

[0086] 在其他实施方案中,灭菌前出现的任何色原颜色变化很可能是可逆的。例如,出现在许多类型的溶剂化显色染料中的颜色变化在升高 pH 值下是可逆的。在这点上,某些可用于升高 pH 的碱性 pH 调节剂的实例包括但不限于氨水;一 -、二 - 和三 - 烷基胺;一 -、二 - 和三 - 烷醇胺;碱金属和碱土金属氢氧化物;碱金属和碱土金属硅酸盐;及其混合物。碱性 pH 调节剂的具体实例有氨水;氢氧化钠、氢氧化钾和氢氧化锂;硅酸钠、硅酸钾和硅酸锂;一乙醇胺;三乙胺;异丙醇胺;二乙醇胺;及三乙醇胺。该 pH 调节剂可以实现所期望颜色变化需要的任何有效量加入。

[0087] 作为本发明的结果,已发现弹性物品的微生物污染可以通过使用在一种或多种微生物的存在下进行颜色变化的色原,容易地检测。本发明的一个特别益处是颜色变化可在相对短的时间内凭视力观察。例如,色原在小于约 30 分钟的时间内可进行可检测的颜色变化,在某些实施方案中小于约 5 分钟,在某些实施方案中小于约 1 分钟,在某些实施方案中小于约 30 秒,在某些实施方案中小于约 10 秒。以该方式,色原可提供弹性物品上微生物存在或不存在的“即时”指示。

[0088] 另外,色原也可提供关于它暴露在微生物中的微生物数量信息。例如,色原颜色变化可凭视觉比较在已知微生物浓度下所获得的颜色与接近该微生物浓度的颜色。或者,也可测定色强度,以定量或半定量确定微生物的量。在一个实施方案中,色强度作为吸光度的函数测定,吸光度的增加通常代表胺浓度的增加。例如,吸光度读数可用 Dynex Technologies of Chantilly, Virginia (Model#MRX) 的微量板读数器,于波长 650 纳米处测定。在另一个实施方案中,色强度和变化可用称为" CIELAB" 的常规试验测定,该试验在 F. Cost, Delmar Publishers, Albany, NY. 出版的 Pocket Guide to Digital Printing ISBN0-8273-7592-1, 144-145 页中有讨论。该方法定义了三个变量,即 L^* 、 a^* 和 b^* , 它们对应于基于颜色感觉对立理论的被感觉颜色的三个特征。这三个变量具有以下含义:

[0089] L^* = 亮度 (或发光度), 范围在 0-100, 其中 0 = 黑暗, 100 = 光亮;

[0090] a^* = 红 / 绿轴, 范围在约 -100-100; 正值是红色的, 而负值是绿色的;

[0091] b^* = 黄 / 蓝轴, 范围在约 -100-100; 正值是黄色的, 而负值是蓝色的。

[0092] 因为 CIELAB 颜色空间在视觉上多少是均匀的, 可以计算代表人类感觉到的两种

颜色之差的单一数字。该差值称为 ΔE , 并通过两种颜色之间的三个差值 (ΔL^* 、 Δa^* 和 Δb^*) 平方和的平方根计算。在 CIELAB 颜色空间中, 各 ΔE 单位约等于两种颜色之间“刚好可见的”差值。CIELAB 因此是目标装置 - 独立性颜色标准系统的好的测量, 为了颜色管理的目的和颜色变化的表达, 它可用作对比颜色空间。用该试验, 色强度 (L^* 、 a^* 和 b^*) 因此可用例如 Minolta Co. Ltd. of Osaka, Japan (Model#CM2600d) 的便携式分光光度计测量。该仪器采用与 CIE No. 15, ISO7724/1, ASTM E1164 和 JIS Z8722-1982 一致的 D/8 几何学 (漫射照明 /8- 度可见系统)。样品表面以 8 度角反射到该表面常态的 D65 光通过样品测量光学系统接收。测量可见光强度的还其他合适的装置也可用于本发明。例如, Kaylor 等的美国专利申请公布 No. 2003/0119202 中描述了一种合适的反射比读数器, 为了所有目的, 该专利申请通过引用而整体结合到本文中。

[0093] 不管测定色强度的方式, 其结果可与预测定的检测曲线相比较, 在该曲线中色原颜色对微生物的各种已知浓度作图。以该方式, 色原的颜色可在使用期间测定, 并容易地与微生物浓度相关联, 为使用者提供定量或半定量结果。另外, 颜色变化可按照本发明迅速发生。例如, 色原可在小于约 1 分钟内开始改变颜色, 在某些实施方案中小于约 30 秒, 在某些实施方案中小于约 10 秒。

[0094] 参照以下实施例可以更好地理解本发明。虽然不是所有叙述的实施例直接涉及弹性物品上微生物敏感性色原的存在, 但是此类实施例举例说明了微生物敏感性色原在一种或多重微生物的存在下, 进行可检测颜色变化的能力。

[0095] 实施例

[0096] 所用材料

[0097] 除非另外说明, 实施例中所使用的所有试剂和溶剂均从 Sigma-Aldrich Chemical Co., Inc. of St. Louis, Missouri 获得, 并且未经进一步纯化使用。测试了以下微生物:

[0098] 1. 革兰氏阴性 (活的)

[0099] - 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) (ATCC#8739);

[0100] - 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC#9027);

[0101] - 猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*);

[0102] - 阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis*);

[0103] 2. 革兰氏阳性 (活的)

[0104] - 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (ATCC#6538);

[0105] - 木糖葡萄球菌 (*S. Xylosis*);

[0106] - 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*);

[0107] 3. 革兰氏阳性 (死的)

[0108] - 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (ATCC#6538);

[0109] - 木糖葡萄球菌 (*S. Xylosis*);

[0110] 4. 酵母 (活的)

[0111] - 白色念珠菌 (*Candida albicans*);

[0112] 5. 霉菌 (活的)

[0113] - 黑曲霉 (*Aspergillus Niger*);

[0114] 6. 病毒

- [0115] -1 型脊髓灰质炎病毒；
- [0116] - 单纯疱疹病毒 1 (HSV-1)；
- [0117] - 鼻病毒；
- [0118] - 麻疹病毒；
- [0119] - 牛痘病毒；
- [0120] - 流感 A 病毒；
- [0121] - 所有病毒均从 Gibraltar Laboratories, Inc. of Fairfield, New Jersey 获得。Reichardt 染料和溴化 1-二十二烷基-4-(4-羟基苯乙烯基)-吡啶鎓也从 Sigma-Aldrich Chemical Co, Inc 获得。

[0122] 实施例 1

[0123] 该实施例证明了形成用于本发明中的份菁染料的能力。例如，图 2 所示的份菁染料在实验室用两步反应合成。具体地说，如图 3 所示，在冰浴中，将碘代甲烷缓慢地加入到搅拌下的 δ -甲基吡啶的 50 毫升异丙醇溶液中。加料完成后，将反应加热至回流，并继续回流 2 小时。然后将溶液在冰浴中冷却，并将沉淀物用布氏漏斗过滤，用冷乙醇洗涤。然后将粉末在通风橱中干燥 2 小时。

[0124] 粗产物的产量为 18.6 克。粗产物未进一步纯化，并直接用于下一步反应。如图 4 所示，将 N-甲基- δ -皮考啉酮 (Picolone) (9.4 克, 0.04 摩尔) 和香草醛 (6.1 克, 0.04 摩尔) 搅拌下全部溶解于 50 毫升乙醇中。向该溶液中加入吡啶 (3.4 克, 0.04 摩尔)，并使该混合物回流 16 小时。反应混合物然后在冰浴中冷却，产物用布氏漏斗过滤，并用冷乙醇洗涤。得到结构 13 的粗染料，其中 R 为甲基。该染料然后在 250 毫升 0.2 摩尔浓度的氢氧化钾溶液中搅拌 60 分钟，形成两性离子，然后用布氏漏斗过滤。该染料然后用最少量的 1:1 水/甲醇混合物结晶。产率为 9.4 克 (98%)。

[0125] 通过选择与染料所期望的各“R”基团相应的烷基碘化物的烷基，以类似的方法也合成了其他份菁染料。以下表 1 显示了结构 13 染料三种不同 R 基团的化合物及获得的收率。

[0126] 表 1. 合成的烷基衍生物及所获得的收率

[0127]

“R”基团	产率 (%)
甲基	98
己基	92
十二烷基	87

[0128] 实施例 2

[0129] 该实施例证明了按照本发明将色原应用于弹性手套的能力。具体地说，将 Reichardt 染料 (160 毫克/10 毫升乙腈) 刷在天然橡胶胶乳手套 (可在商业上从 Kimberly-Clark Corp. 获得) 片上。然后，将 100 微升 10^7 CFU/mL 金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 滴在该手套表面，并轻轻地用一次性移液管扩散。然后，将第二只天然橡胶胶乳手套 (可在商业上从 Kimberly-Clark Corp. 获得) 的手指浸在 Reichardt 染料 (160 毫克/10 毫升乙腈) 溶液中。干燥后，用第二只手套的手指，将置于胶乳手套片上的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 液滴的细菌扩散到该胶乳片的另一个区域。手套片和手套手指的颜色立即改变。用 Reichardt 染料溶液以上述方法，处理的乙烯基和腈手套 (可在商业上从

Kimberly-Clark 获得) 也获得了类似结果。

[0130] 实施例 3

[0131] 该实施例证明了用异丙醇作为色原的载体的能力。用塑料门拉手作为测试细菌污染的“真实世界”表面。最初,将生鸡腿于室温陈化几天,以确保获得高细菌水平(下文中称为“陈化鸡肉”)。然后,将陈化肌肉的汁用于标记拉手之一的表面。其他门拉手作为对照未被污染。擦拭两种拉手。然后,将 Reichardt 染料溶解于异丙醇(160 毫克染料溶于 10 毫升异丙醇)中。将该染料的异丙醇溶液喷在两表面上。门拉手的污染区域通过其 Reichardt 染料从蓝到无色的颜色变化,可容易地观察。

[0132] 实施例 4

[0133] 该实施例证明了用染料滴定各种浓度的细菌的能力。将 100 微升连续稀释的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 悬浮液置于 SCOTT® 纸巾上。然后,将 Reichardt 染料的乙腈溶液(40 毫克/10 毫升)液滴(10 微升)用移液管滴在放置细菌的各斑点上。染料溶液在小于 1 秒钟内改变了颜色。将另外的液滴置于相同的斑点上,直到染料颜色保持稳定,并且紫/蓝色不褪去。在放置了不同浓度的细菌的相应各斑点上,重复该操作。结果显示与表面上细菌污染水平呈良好相关性。

[0134] 实施例 5

[0135] 该实施例证明了用染料滴定各种浓度的细菌的能力。将陈化的、合并的女性尿液(100 微升)样品置于纤维素毛巾上,产生各自具有 100 微升体积尿液的几个斑点。已知陈化的女性尿液具有高度的细菌污染,结果显示高水平的污染。两种 Reichardt 染料溶液用于滴定研究:40 毫克染料/10 毫升乙腈和 160 毫克染料/10 毫升乙腈。然后,以 10 微升等分试样将染料溶液置于尿液斑点上,并且继续滴加,直到保持蓝/紫颜料颜色(即将染料加入到尿液中,直到颜色持续)。表 2 显示染料颜色保持稳定所需的各染料溶液的体积。

[0136] 表 2:女性合并尿液的细菌定量

[0137]

样品	4mg/ml 染料溶液	16mg/ml 染料溶液
尿液	120 微升	30 微升

[0138] 实施例 6

[0139] 以与实施例 5 中描述的相同方法,将细菌和其他微生物用移液管滴到纤维素毛巾上。将 10^7 CFU/mL 金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、白色念珠菌 (*C. albicans*) (酵母)、阴道加德纳氏菌 (*G. vaginalis*)、大肠埃希氏菌 (*E. coli*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 用移液管滴到毛巾上(各 100 微升)。另外,将 10^5 黑曲霉 (*A. niger*) (一种普通霉菌) 也用移液管滴到毛巾上。然后,将 Reichardt 染料溶液(160 毫克/10 毫升乙腈)以 10 微升等分试样加入到各斑点中,并计数建立持续颜色所需的液滴数。表 3 提供了各生物体维持持续紫色所需的染料量。

[0140] 表 3:用 Reichardt 染料滴定各种微生物

[0141]

混合物	类型	颜色持续所需的染料 的量 (μ l)
乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus</i>)	革兰氏 (+)	110

金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	革兰氏 (+)	90
阴道加德纳氏菌 (<i>G. vaginalis</i>)	革兰氏 (-)	90
大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>)	革兰氏 (-)	80
铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	革兰氏 (-)	80
白色念珠菌 (<i>C. albicans</i>)	酵母	70
黑曲霉 (<i>A. niger</i>)	霉菌	50

[0142] 观察到嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 具有最强的反应,接着是金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、阴道加德纳氏菌 (*G. vaginalis*)、大肠埃希氏菌 (*E. coli*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、白色念珠菌 (*C. albicans*),最后是黑曲霉 (*A. niger*)。虽然革兰氏阳性金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 似乎具有与革兰氏阴性阴道加德纳氏菌 (*G. vaginalis*) 相同强度的反应,但是各种类型的细菌和病原体达到稳态反应所需的量是不同的。

[0143] 实施例 7

[0144] 该实施例研究了可检测颜色变化的机理。将衍生自大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的去毒脂多糖 (除去脂质 A 成分)、衍生自粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 的脂磷壁质、衍生自大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的脂多糖和胞壁酸溶液置于 **SCOTT®** 纸巾上。除了纯 LPS 外,所有溶液均以 5% (重量 / 重量)、1% (重量 / 重量) 和 0.2% (重量 / 重量) 浓度制备。纯 LPS 以 0.1% (重量 / 重量)、0.02% (重量 / 重量) 和 0.004% (重量 / 重量) 浓度制备。将 Reichardt 染料 (160 毫克 / 10 毫升乙腈) 以 10 微升等分试样加入各斑点中,并记录产生持久颜色所需染料的量。也进行了相反的试验,其中将细胞壁化合物置于纸巾上的染料斑点。胞壁酸产生最强烈的反应,导致在两个试验设置中几乎产生瞬时的染料颜色变化。其他化合物最终确实产生染料颜色的变化,但是似乎不像胞壁酸那样反应强烈。因为在革兰氏阳性菌中胞壁酸以更大的浓度存在,所以这些结果证明该染料不仅具有给出 CFU/ 毫升数据的潜能,而且具有基于反应强度和速度区别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的潜能。

[0145] 实施例 8

[0146] 该实施例证明了 Reichardt 染料响应鸡肉液体的某些成分,例如脂质和蛋白质的能力。用将含有鸡肉衍生产物例如脂质、蛋白质等的罐头装鸡汤作为对照,检查这些天然物质潜在的干扰。将新打开的 **Swanson®** 鸡汤用移液管滴到热板表面上,并用 **SCOTT®** 毛巾擦干。室温贮藏几天的生鸡肉汁也用移液管滴到热板上,并擦干作为阳性对照。将 Reichardt 染料指示剂 (160 毫克 / 10 毫升异丙醇) 喷在表面上,很明显仅含有陈化鸡肉汁 (因此有细菌) 的一侧改变了颜色。因此,在鸡肉的情况中,微生物的存在显然是引发颜色变化的原因,而不是某些其他成分,例如鸡肉脂肪或蛋白质。

[0147] 实施例 9

[0148] 该实施例研究了酸 - 碱还原反应对在微生物的存在下,Reichardt 染料的颜色变化所做出贡献的程度。将几滴 Reichardt 染料 (160 毫克 / 10 毫升乙腈) 用移液管滴到 **SCOTT®** 毛巾上,并令其干燥。将两种已知引起颜色变化的化合物 (醋酸和 pH2.0 的 Aldrich 缓冲液) 各自滴到两个斑点,并产生染料颜色的迅速变化。然后,将一滴 1N NaOH 用移液管滴到其中一个斑点,引起迅速的再显色。加入 1N NaOH 后,Reichardt 染料的蓝

/ 紫色又重新出现。

[0149] 用喷雾进行第二个试验,以确证这些结果。将陈化的生鸡肉汁用移液管以容易识别的图案滴到热板表面上。将该表面吸干干燥,并喷以 Reichardt 染料(160 毫克/10 毫升乙腈),以准确的鸡肉汁图案形式产生染料颜色变化。然后,将一滴 1N NaOH 置于前面改变了颜色的区域,导致该小斑点的再显色。在另一个区域重复该操作。

[0150] 为了测试 1N NaOH 只是作用于细菌而不是作用于染料的可能性,将陈化鸡肉汁和 1 摩尔浓度 NaOH 以等比例混合,并令其放置 30 秒。然后,用该混合物产生另一个相同(尽管更小)图案。该溶液也引起 Reichardt 染料的迅速颜色变化,然而,加入 1N NaOH 后颜色又复原。

[0151] 实施例 10

[0152] 该实施例证明了 Reichardt 染料响应健康的(低 pH、无细菌感染)、pH 阳性/细菌性阴道病(BV)(无细菌感染,但是比正常 pH 高)及 pH 阳性/BV 阳性(比正常 pH 高及已知的细菌感染)阴道液体样品的能力。用两种不同浓度的 Reichardt 染料溶液(160 毫克/10 毫升乙腈、80 毫克/10 毫升乙腈、40 毫克/10 毫升乙腈、20 毫克/10 毫升乙腈)刷涂粘附物片。用正常的 BV 阳性/pH 阳性和 BV 阴性/pH 阳性阴道液体样品测试各浓度的粘附物。正常阴道液体产生最急剧的染料颜色变化,大概是由于乳酸杆菌(Lactobacillus)和低 pH 组合的结果。BV 阳性/pH 阳性样品显示次急剧的颜色变化,可能是由于大量 BV 细菌的存在。BV 阴性/pH 阳性样品仅有微弱的染料颜色变化,大概是由于乳酸杆菌(Lactobacillus)的量比正常样品的少。颜色变化的三种状态是容易区分的。

[0153] 实施例 11

[0154] 该实施例制备了 Reichardt 染料(80 毫克/10 毫升乙腈)和 **TWEEN**[®] 80(200 微升)聚氧化乙烯表面活性剂(从 Fischer Scientific, Pittsburgh, PA 获得)的溶液。然后,用该溶液涂覆陶瓷表面,并令其空气干燥。将无表面活性剂的第二种 Reichardt 染料(80 毫克/10 毫升乙腈)溶液置于该表面上,并令其空气干燥。干燥后,将一滴已知具有高细菌计数的陈化鸡肉汁置于各涂层区域上。含 **TWEEN**[®] 80 表面活性剂的区域比不含 **TWEEN**[®] 表面活性剂的区域,以快得多的速度(小于 20-30 秒)改变了颜色。此外, **TWEEN**[®] 表面活性剂的加入使染料从该表面除去更容易。加入少量的水,使染料从表面完全除去,而向不含表面活性剂的斑点上加水,不能改善染料从表面的除去。

[0155] 实施例 12

[0156] 该实施例评价了用各种不同溶剂制备的 Reichardt 染料涂层的行为。制备 Reichardt 染料的乙腈、异丙醇和二甲苯溶液,用这些溶液涂覆 **SCOTT**[®] 厨房卷状纸巾,并令其空气干燥。处理过的毛巾上具有置于其上的金黄色葡萄球菌(S. aureus)100 微升等分试样,观察该涂层的颜色变化。放置细菌悬浮液后,仅基于乙腈溶液的涂层具有迅速的颜色变化。观察到 Reichardt 染料溶解于乙腈中时具有均匀的颜色。其他两种溶剂涂层未观察到可见的颜色变化。然而,本发明人发现 Reichardt 染料的浓度能够调节,从而使异丙醇可以用作染料的溶剂。虽然该染料的颜色比乙腈溶液的看起来弱,但是由于微生物污染产生的颜色变化,仍能容易地观察到。

[0157] 实施例 13

[0158] 将聚苯乙烯盘(购自超级市场)上覆盖一半新鲜鸡肉的透明膜室温下贮藏三周。

用移液管收集收集在聚苯乙烯盘中的浅黄色汁,并用于测试。将 47 毫克溴化 1-二十二烷基-4-(4-羟基苯乙烯基)-吡啶鎓(可从 Aldrich Chemical 获得的 N-二十二烷基-份菁染料)与 10 克二甲基甲酰胺混合。振摇后仍有少量固体,令其沉淀。将橙色上清液滴到基础重量(29.2cm×20.3cm=6.888 克)的织造棉织物上,形成橙黄色的圈。将一滴 1N 氢氧化钠溶液加到棉织物上的一个橙黄色斑点上,颜色从橙黄变成带粉红色的橙色。将陈化鸡肉汁点在棉织物上的橙黄色斑点上,产生非常浅的黄色颜色变化。棉织物上的颜色变化是迅速的。类似地,将陈化鸡肉汁滴到棉织物上的带粉红色的橙色区域(染料+NaOH 溶液)上,引起从带粉红色的橙色到非常浅的黄色的类似颜色变化。

[0159] 实施例 14

[0160] 收集女性人类尿液,并于 37℃ 贮藏 24 小时。可预计合并的女性尿液在这些条件下贮藏后具有约 1×10^5 CFU/毫升的细菌载量。按实施例 1 描述的方法,形成 N-甲基份菁染料,然后将 0.5 克该染料溶解于 20 毫升去离子水中。通过将纸巾浸入该溶液中,将该溶液涂覆在 SCOTT® 厨房卷状纸巾上,使过量的溶液滴下除去,然后使该涂覆的纸巾在室温条件下干燥。该纸巾被染料染成深橙色。将陈化的尿液滴到该橙色纸巾上,颜色立即从深橙色变成浅黄色。作为对照,将陈化的尿液用 0.2 微米过滤器过滤,以除去细菌和其他微生物。过滤后,当陈化尿液滴到纸巾上时不产生颜色变化,提示引起颜色变化的原因是微生物,而不是陈化尿液中的其他成分。

[0161] 实施例 15

[0162] 从笼装宠物虎皮鹦鹉收集虎皮鹦鹉粪便,并在约 10 毫升亚特兰大家用自来水中振摇。按实施例 1 描述的方法,合成 N-甲基份菁染料,然后将 0.5 克该染料溶解于 20 毫升去离子水中。通过将纸巾浸入该溶液中,将该溶液涂覆在 SCOTT® 厨房卷状纸巾上,使过量的溶液滴下除去,然后使该涂覆的纸巾在室温条件下干燥。该纸巾被染料染成深橙色。将虎皮鹦鹉粪便自来水悬浮液液滴点到所涂覆的纸巾上,加悬浮液后颜色立即从深橙色变成浅黄色。作为对照,将自来水滴到该纸巾的不同区域,虽然颜色有点被水稀释,但是该区域仍然保持橙色。

[0163] 实施例 16

[0164] 首先,将 SCOTT® 纸巾用羟丙基-β-环糊精(来自 Cerestar International, Hammond, IN, USA)的水溶液(1 克/20 毫升)浸渍涂覆,并室温下空气干燥。干燥后,将所涂覆的纸巾用 Reichardt 染料的异丙醇溶液(1%重量)处理,并使其空气干燥。干燥的纸巾为紫/蓝色。本发明人相信环糊精阻碍了染料的结晶,因此使染料更鲜明的颜色出现在纸巾上。用该涂覆的纸巾测试革兰氏阴性菌(大肠埃希氏菌(E. coli)),并且发现当将 100 微升含 10,000 CFU/毫升培养基的等分试样涂覆在纸巾时,在小于 5 秒的时间内变成无色。发现该颜色变化出现在 500 CFU/毫升以下的细菌浓度,虽然这需要 15 秒长的时间。本发明人相信小心使用涂层(例如环糊精),可形成染料的单层涂层。

[0165] 实施例 17

[0166] 该实施例进行了使用具有“干”细菌样品的 Reichardt 染料涂覆纸巾的测试。具体地说,从含系列生长培养基的琼脂培养皿中取出大肠埃希氏菌(E. coli)菌落的干样品。然后,将该干样品擦在预湿润的染料涂覆 SCOTT® 纸巾上。放置和擦有菌落的区域在 1-5 秒内变成无色。

[0167] 实施例 18

[0168] 将 Reichardt 染料和 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 的混合物涂覆在 **SCOTT®** 纸巾上, 并使其空气干燥。将稀释的漂白剂溶液涂覆在该纸巾上, 这导致 Reichardt 染料脱色, TMB 变成橙 / 黄色。这显示漂白剂指示剂可与色原联合使用。在最后的试验中, 将具有 Reichardt 染料和 TMB 化学品的涂层的 **SCOTT®** 纸巾暴露于滴加大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的悬浮液中。与细菌接触的纸巾区域在小于 10 秒内变成了白色斑点。未观察到发展成橙 / 黄色。

[0169] 实施例 19

[0170] Reichardt 染料未经进一步纯化使用。按照实施例 1 中描述的方法, 合成 N- 正己基和 N- 正十二烷基份菁染料。丙酮、甲醇和乙腈溶剂 (HPLC 级) 从 Sigma-Aldrich Chemical Co., Inc. 获得。用 ShimadzuUV-1601UV- 可见分光光度计 (Shimadzu Corporation), 在 400-800 纳米的范围内, 测定溶解在三种不同溶剂中、盛在石英比色皿 (cuvettes) 中的染料的最长波长峰吸收。下表中含有测试结果, 溶剂在左侧, 染料在顶栏。

[0171]

	己基份菁	十二烷基份菁	Reichardt 染料
丙酮	617.5nm (绿色)	617nm (绿色)	674nm (含蓝色的绿色)
甲醇	514nm (橙色)	522nm (橙色)	509nm (红色)
乙腈	582nm (含绿色的蓝色)	600nm (蓝色)	623nm (蓝色)

[0172] 份菁染料也显示接近 400 纳米处的吸收及更长波长处的吸收, 这改变了所感觉到的颜色。基于光谱学测定, 这些染料显示当溶解于不同溶剂中时, 这些微生物敏感性染料之间的最大波长峰吸收位移很大 (大于 10 纳米)。

[0173] 实施例 20

[0174] 该实施例证明了按照本发明色原检测病毒存在的能力。准备 1 型脊髓灰质炎病毒、单纯疱疹病毒 1 (HSV-1)、鼻病毒、麻疹病毒、牛痘病毒和流感 A 病毒, 并接种到 MA-104 胚胎猴肾细胞中, 该肾细胞用 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM) 繁殖和培养, 补充浓度为 5% 的胎牛血清, 并在 37°C ± 1°C、在 5% CO₂ 的存在下温育 6 天。通过显微镜观察感染细胞片的细胞分裂 (细胞病变作用, CPE), 例如变圆、皱缩、溶胞、固缩等, 如在至少 50% 的细胞片中所观察到的, 可检测病毒的繁殖。以细胞分裂的程度测定了细胞毒性, 如无病毒只有试剂产生的细胞分裂。病毒用 DMEM 的十倍连续稀释液滴定, 每次稀释 4 个平行测定 MA104 培养基, 各平行测定样品用 0.1 毫升病毒稀释液接种。将病毒复制程度以半数组织培养感染量 (TCID₅₀) 计算, 按 Reed 和 Muench 的方法测定。

[0175] Reichardt 染料涂覆的粘附物 (160 毫克 / 10 毫升乙腈、80 毫克 / 10 毫升乙腈、40 毫克 / 10 毫升乙腈及 20 毫克 / 10 毫升乙腈) 用作测试表面。将 50 微升未稀释病毒的培养基溶液 (TCID₅₀10⁻⁸ 脊髓灰质炎病毒 / mL; TCID₅₀10⁻⁷ HSV-1 / mL; TCID₅₀10⁻⁷ 鼻病毒 / mL; TCID₅₀10⁻⁶ 麻疹病毒 / mL; TCID₅₀10⁻⁶ 牛痘病毒 / mL; 及 TCID₅₀10⁻⁷ 流感病毒 / mL) 滴到各粘附物上, 并在用棉拭子除去液滴前使其放置 3 分钟。对鼻病毒和脊髓灰质炎病毒而言, 这两种病毒用培养基和盐水两者稀释, 单独的培养基等分试样、无病毒细胞培养基和无病毒细胞培养生理盐水用作对照样品, 并且也在擦拭前使其放置三分钟。对其余的病毒而言 (它们未用其原

始培养基稀释使用),仅使用培养基对照。

[0176] 对脊髓灰质炎病毒而言,生理盐水对照似乎干扰染料,而培养基不引起颜色变化。因此将脊髓灰质炎病毒培养基稀释液用于该试验的剩余部分。将病毒用培养基以十倍递增连续稀释,并将 50 微升等分试样涂覆在各粘附物。使其放置 3 分钟后,将液滴从粘附物上擦去。对鼻病毒而言,发现培养基对照有干扰,而生理盐水对照不导致染料的颜色变化。因此,将用生理盐水稀释的病毒的十倍连续稀释液以 50 微升等分试样涂覆在粘附物,并于 3 分钟后擦去。对脊髓灰质炎病毒和鼻病毒而言,在 10^{-6} (即第六次连续十倍的稀释液) 以下粘附物改变了颜色,表明染料涂覆的粘附物具有对这些病毒检测的灵敏度(脊髓灰质炎病毒褪色稍微强些)。对 HSV-1、流感 A、麻疹和牛痘病毒而言,仅将 50 微升(未稀释)液滴置于粘附物上。将所观察到的随后的褪色与用无病毒对照培养基及沙门氏菌属(*Salmonella*) (108CFU/mL) 阳性对照所观察到的进行比较。虽然褪色不如所观察到的沙门氏菌属(*Salmonella*) 的强烈,但是暴露于未稀释的 HSV-1 病毒导致比鼻病毒和脊髓灰质炎病毒所观察到的更强的粘附物褪色。流感 A、牛痘和麻疹病毒所产生的褪色比其他病毒所观察到的要少。

[0177] 还制备了两种 Reichardt 染料溶液(有或无 400 微升 TWEEN80 表面活性剂的 80 毫克/10 毫升乙腈)。将 100 微升脊髓灰质炎病毒或鼻病毒的液滴(均未用培养基稀释)用移液管滴到折叠的 SCOTT® 纸巾上,并将 Reichardt 染料液滴加入到各含病毒的斑点上。含表面活性剂和不含表面活性剂溶液的颜色均迅速褪色。最终加入染料直到颜色持续(约 9 滴)。也测试了上述相同培养基和生理盐水对照。虽然培养基不显示使染料褪色的某些能力,但是生理盐水显示前面用水观察到的相同滴定行为。

[0178] 实施例 21

[0179] 该实施例证明了 Reichardt 染料提供有关细菌浓度的定量信息的能力。最初通过将纸浸入涂料中或将涂料刷在纸上,用 Reichardt 染料溶液(80 毫克/10 毫升乙腈)处理纸-基基体(Neenah Bond™)(可从 Neenah Paper, Inc. of Alpharetta, Georgia 获得),然后将该纸悬挂干燥。将七(7)滴已知浓度的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)(每毫升 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 CFU)置于各片的顶部。约 2 分钟后,将液滴除去并吸干,当金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)浓度为 10^5 CFU/毫升及以上时显示明显的颜色变化。更低浓度下的颜色差别较不明显,特别是对刷涂的片而言。

[0180] 然后进行盲法研究。为了达到测试目的,将含 100 微升浓度为 10^6 CFU/mL 的第一滴置于含 Reichardt 染料的浸涂片的一部分上。将含 100 微升浓度为 10^5 CFU/mL 的第二滴置于含 Reichardt 染料的刷涂片的一部分上。最后,将含浓度为 10^4 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的第三滴置于含 Reichardt 染料的浸涂片的一部分上。两个试验参加者不知道这三滴的浓度。约 2 分钟后,将液滴除去并吸干。采用对照区域,这两人凭视觉各自评估各样品的浓度。两人都正确地估计出第一个样品的浓度为 10^6 CFU/mL。这些人也正确地猜出第二个样品的浓度为 10^5 CFU/mL。然而,这两人不正确地估计第三个样品的浓度为 10^3 CFU/mL。认为,这种不准确性至少部分是由于当浓度小于 10^5 CFU/mL 时,与对照区域的颜色差别相对地低。然而,本发明人相信可容易地选择色原的浓度和涂层的均匀性,以在如此低的浓度下获得准确的结果。无论如何,因为对照区域在更高的浓度下(例如 10^5 CFU/mL 或以上)提供更明显的颜色差别,因此认为准确结果将在临床更相关的高浓度下获得。

[0181] 实施例 22

[0182] 该实施例证明了 Reichardt 染料提供有关细菌浓度的定量信息的能力。纸-基基体 (Neenah Bond™) (可从 Neenah Paper, Inc. of Alpharetta, Georgia 获得) 及标签 (可从 Avery-Dennison 获得) 最初用 Reichardt 染料溶液 (80 毫克/10 毫升乙腈) 涂覆, 并悬挂干燥。用已知浓度的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的等分试样 (100 微升) 产生各种类型细菌的对照曲线。更具体地讲, 将用 Reichardt 染料涂覆的指示剂条暴露于递减量的细菌等分试样中。施用了各等分试样后, 用便携式分光光度计测定各 CFU/mL 浓度下的“ ΔE ”值 (用 L^* 、 A^* 和 B^* 值计算)。结果列于下表 4 (纸) 和表 5 (标签) 中。

[0183] 表 4: 纸基体的结果

[0184]

log CFU/ml	ΔE (金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>))	ΔE (大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>))	ΔE (铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>))
8	—	9.3642	—
7	11.73368	4.3483	4.9569
6	3.876455	3.2574	1.3193
5	2.447325	2.3320	1.7151
4	2.074175	3.0123	2.2358
3	1.866789	3.8228	1.7900

[0185] 表 5: 标签基体的结果

[0186]

log CFU/ml	ΔE (金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>))	ΔE (大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>))	ΔE (铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>))
7	18.62321	7.778702	6.9567
6	6.908263	4.866590	4.2419
5	6.919863	4.643888	4.6519
4	4.791472	5.200596	4.9473
3	5.413890	5.130312	3.8787

[0187] 根据以上结果, 分别产生了如图 5-7 所示金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的标准检测曲线。如图所示, 各种类型的细菌以稍微不同的方式改变了染料处理过的基体的颜色, 产生了独特的标准曲线。然后, 将未知细菌浓度的液滴置于粘附物上, 并用分光光度计测定所得颜色的“ ΔE ”。所获得的各未知样品的数值列于下表 6-7 中。

[0188] 表 6: 纸基体的结果

[0189]

金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)			大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>)			铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>)		
log CFU/ml (实测)	ΔE	log CFU/ml (估计)	log CFU/ml (实测)	ΔE	log CFU/ml (估计)	log CFU/ml (实测)	ΔE	log CFU/ml (估计)
5	3.16136	5	3	1.3605	5	3	1.0267	5

[0190] 表 7 : 标签基体的结果

[0191]

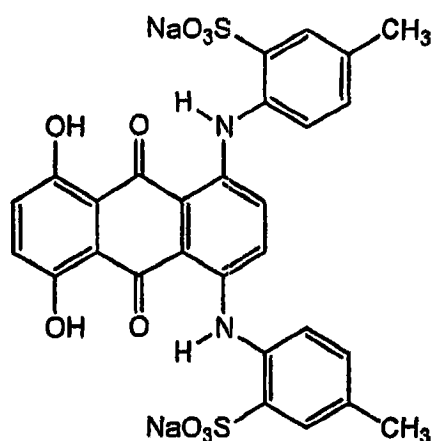
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)			大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>)			铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>)		
log CFU/ml (实测)	ΔE	log CFU/ml (估计)	log CFU/ml (实测)	ΔE	log CFU/ml (估计)	log CFU/ml (实测)	ΔE	log CFU/ml (估计)
6	6.869068	5-6	7	7.1157	7	6	4.4954	5-6
6	4.228215	3	-	-	-	6	4.1002	3-6

[0192] 从数据中可以看出,通过测定未知的 ΔE 值最接近哪个已知的 ΔE 值,来预测未知浓度。虽然一些结果不完全准确,但是本发明人相信,改善涂层均匀性将进一步提高检测的准确性。

[0193] 比较实施例 1

[0194] 将聚苯乙烯盘上覆盖一半新鲜鸡肉的透明膜在室温下贮藏三周。用移液管收集收集在聚苯乙烯盘中的浅黄色汁,并用于测试。将陈化鸡肉汁滴到SCOTT®纸巾上。浓度为 0.008 摩尔 / 升的 CI AcidGreen41 溶液从 Aldrich Chemical 获得。CI Acid Green41 为具有以下结构的羟基蒽醌染料:

[0195]



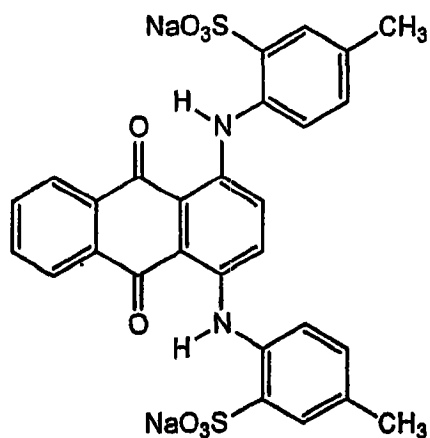
[0196] 将该染料溶液滴到陈化鸡肉汁上。未观察到颜色变化。作为比较,也将 100 毫克 Reichardt 染料悬浮于 10 毫升乙腈中。当将该悬浮液滴到陈化鸡肉汁上时,它立即改变了颜色。

[0197] 比较实施例 2

[0198] 将聚苯乙烯盘上覆盖一半新鲜鸡肉的透明膜在室温下贮藏三周。用移液管收集收

集在聚苯乙烯盘中的浅黄色汁,并用于测试。将陈化鸡肉汁滴到**SCOTT®**纸巾上。浓度为 0.008 摩尔 / 升的 CI AcidGreen25 溶液从 Aldrich Chemical 获得。CI Acid Green25 为具有以下结构的蒽醌染料:

[0199]

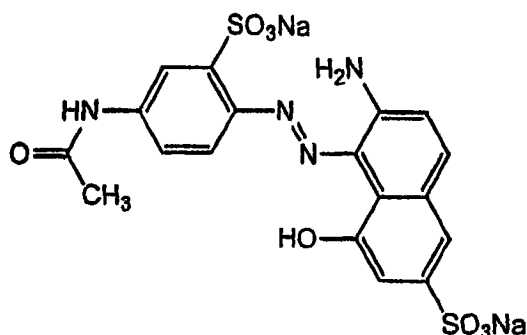


[0200] 将该染料溶液滴到陈化鸡肉汁上。未观察到颜色变化。作为比较,也将 100 毫克 Reichardt 染料悬浮于 10 毫升乙腈中。当将该悬浮液滴到陈化鸡肉汁上时,它立即改变了颜色。

[0201] 比较实施例 3

[0202] 将聚苯乙烯盘上覆盖一半新鲜鸡肉的透明膜在室温下贮藏三周。用移液管收集收集在聚苯乙烯盘中的浅黄色汁,并用于测试。将陈化鸡肉汁滴到**SCOTT®**纸巾上。50 毫克 Acid Red37 从 AldrichChemical 获得,并溶解于 10 毫升去离子水中。Acid Red37 为具有以下结构的氨基偶氮染料:

[0203]

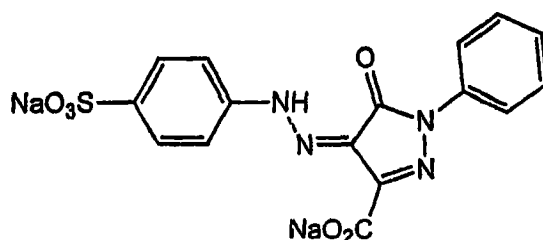


[0204] 将该染料溶液滴到陈化鸡肉汁上。未观察到颜色变化。作为比较,也将 100 毫克 Reichardt 染料悬浮于 10 毫升乙腈中。当将该悬浮液滴到陈化鸡肉汁上时,它立即改变了颜色。

[0205] 比较实施例 4

[0206] 将聚苯乙烯盘上覆盖一半新鲜鸡肉的透明膜在室温下贮藏三周。用移液管收集收集在聚苯乙烯盘中的浅黄色汁,并用于测试。将陈化鸡肉汁滴到**SCOTT®**纸巾上。50 毫克 Acid Yellow23 从 AldrichChemical 获得,并溶解于 10 毫升去离子水中。Acid Yellow23 为具有以下结构的苯基吡唑酮染料:

[0207]

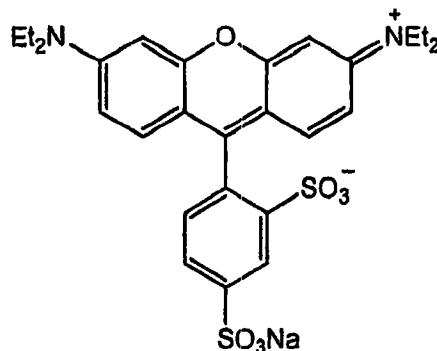


[0208] 将该染料溶液滴到陈化鸡肉汁上。未观察到颜色变化。作为比较,也将 100 毫克 Reichardt 染料悬浮于 10 毫升乙腈中。当将该悬浮液滴到陈化鸡肉汁上时,它立即改变了颜色。

[0209] 比较实施例 5

[0210] 将聚苯乙烯盘上覆盖一半新鲜鸡肉的透明膜在室温下贮藏三周。用移液管收集收集在聚苯乙烯盘中的浅黄色汁,并用于测试。将陈化鸡肉汁滴到 SCOTT® 纸巾上。CI Acid Red52 水溶液从 AldrichChemical 获得。CI Acid Red52 为具有以下结构的咕吨染料:

[0211]

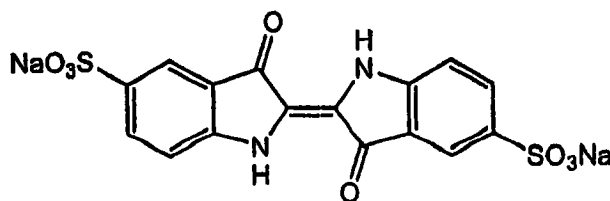


[0212] 将该染料溶液滴到陈化鸡肉汁上。未观察到颜色变化。作为比较,也将 100 毫克 Reichardt 染料悬浮于 10 毫升乙腈中。当将该悬浮液滴到陈化鸡肉汁上时,它立即改变了颜色。

[0213] 比较实施例 6

[0214] 将聚苯乙烯盘上覆盖一半新鲜鸡肉的透明膜在室温下贮藏三周。用移液管收集收集在聚苯乙烯盘中的浅黄色汁,并用于测试。将陈化鸡肉汁滴到 SCOTT® 纸巾上。30 毫克 CI Acid Blue74 从 AldrichChemical 获得,并溶解于 10 毫升去离子水中。CI Acid Blue74 为具有以下结构的靛系染料:

[0215]



[0216] 将该染料溶液滴到陈化鸡肉汁上。未观察到颜色变化。作为比较,也将 100 毫克 Reichardt 染料悬浮于 10 毫升乙腈中。当将该悬浮液滴到陈化鸡肉汁上时,它立即改变了颜色。

[0217] 虽然本发明详细描述了其具体实施方案,但是对前述内容获得理解后,本领域技术人员将认识到,可以容易地构思这些实施方案的变更、变化和等同实施方案。因此,本发明的范围由权利要求及其任何等同权利要求来确定。

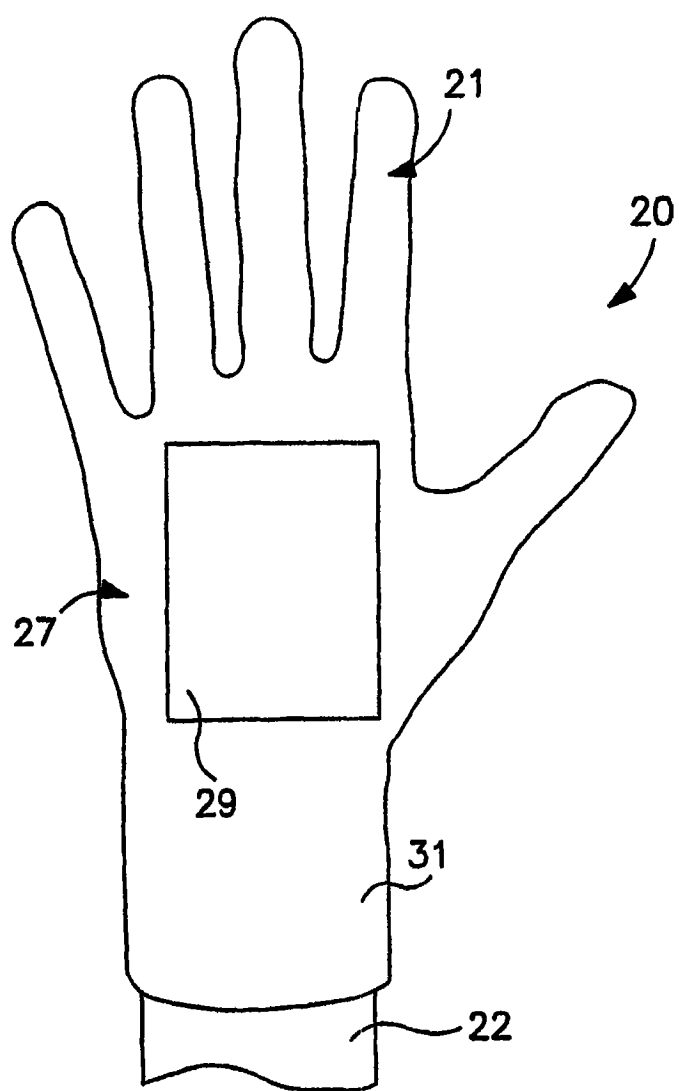


图 1

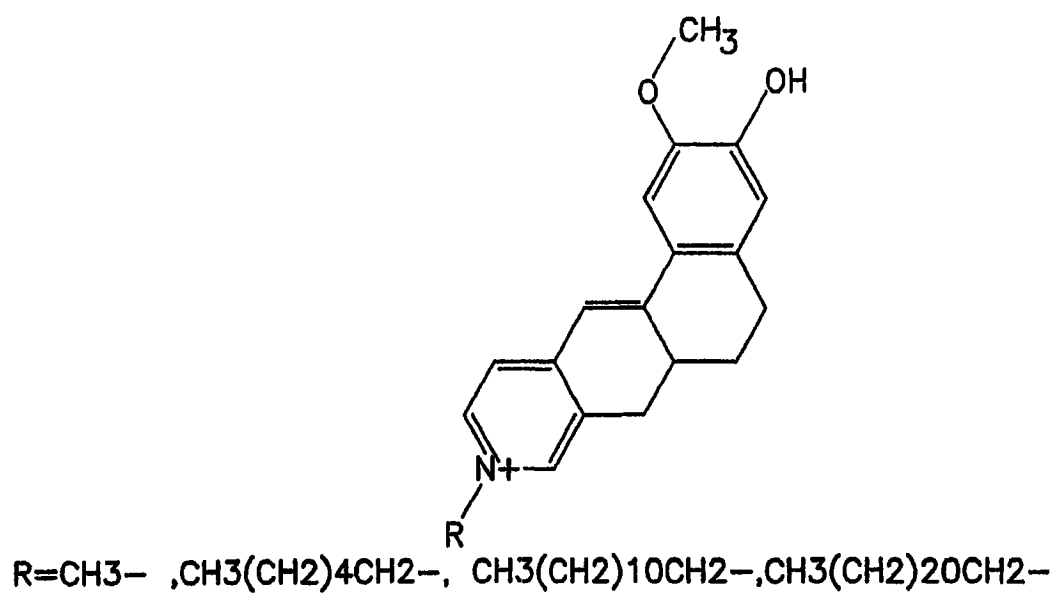


图 2

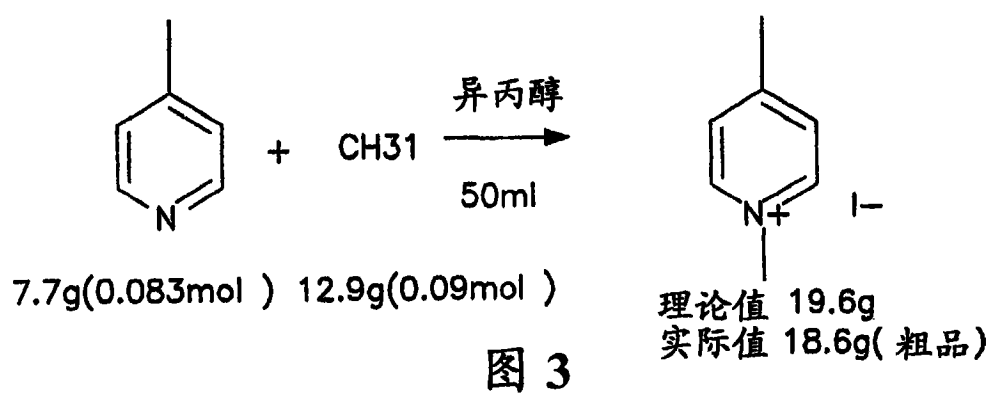


图 3

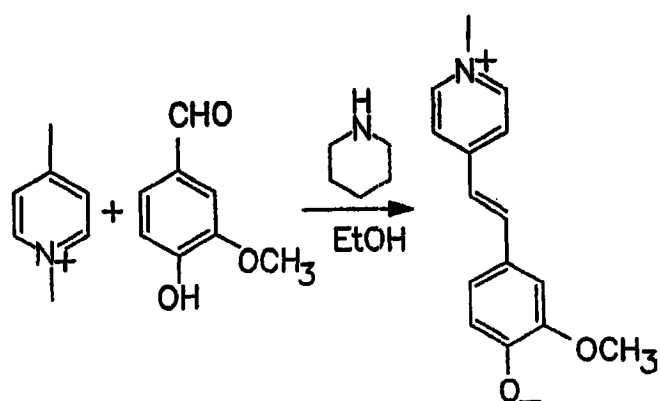


图 4

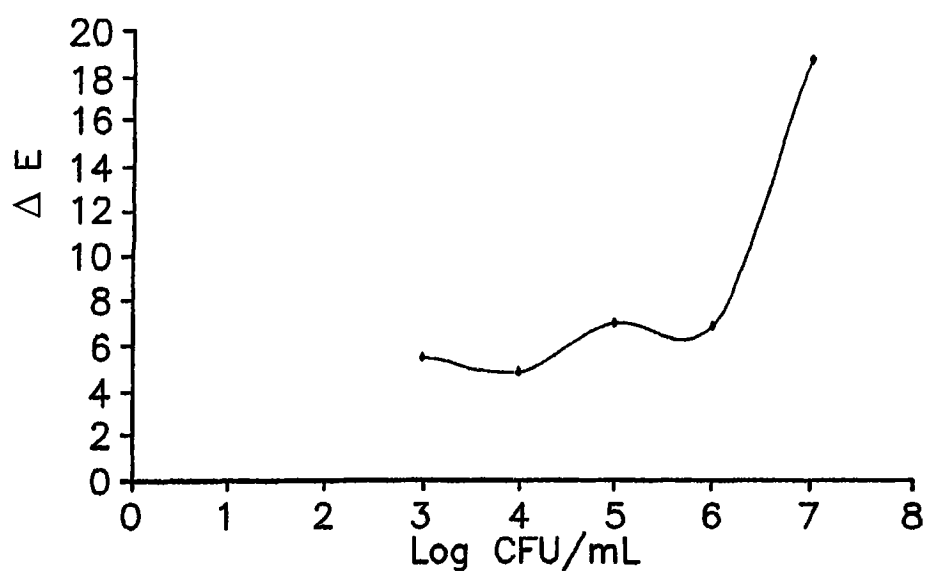


图 5

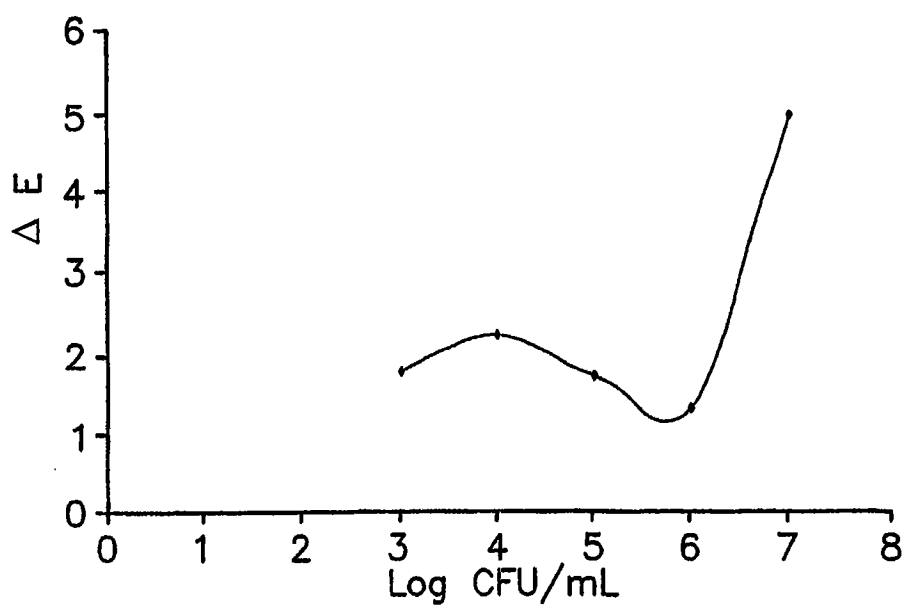


图 6

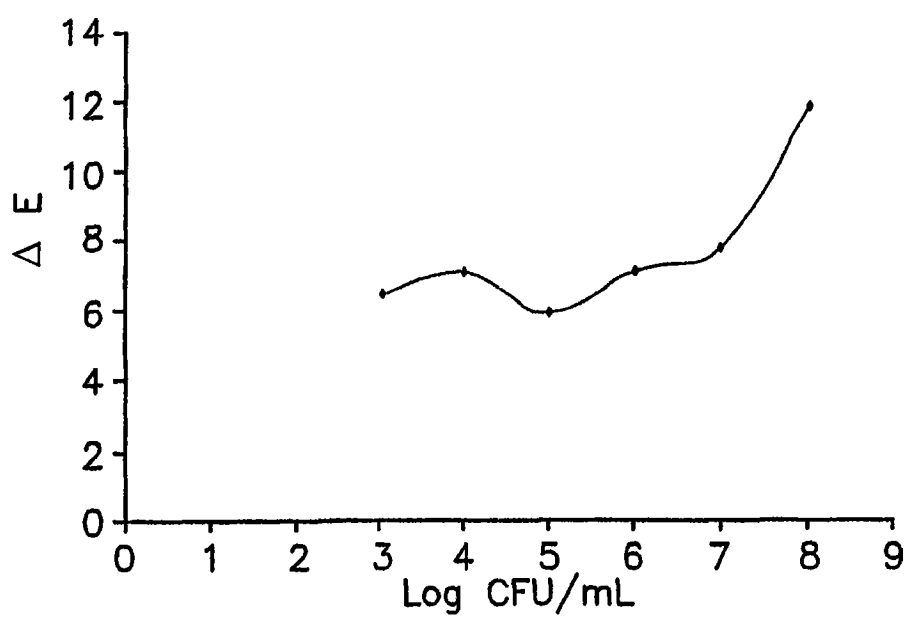


图 7