



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103189523 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201180052867.6

代理人 梁晓广 关兆辉

(22) 申请日 2011.10.28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/22(2006.01)

61/408,977 2010.11.01 US

61/408,966 2010.11.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013.05.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/058257 2011.10.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02012/061227 EN 2012.05.10

(73) 专利权人 3M 创新有限公司
地址 美国明尼苏达州

(56) 对比文件
WO 2010/045517 A2, 2010.04.22,
WO 2010/045138 A2, 2010.04.22,
Anonymous. 3M(3T) Attest(TM) 1292-S
Biological Indicator for Steam 3M(3T)
Attest(TM) Auto-readers. 《URL:http://
multimedia.3m.com/mws/mediawebs_erver?mws
Id=66666UuZjcFSLXTtmxTyoxfVEVuQEcuZgVs6EVs
6e666666》. 2007, 1-16.

审查员 曲凯

(72) 发明人 塞拉嘉·常德拉帕蒂
希瑟·M·韦伯 杰弗里·C·佩德森
杰弗里·D·史密斯
露丝安·R·杜达
布赖恩·J·恩格尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

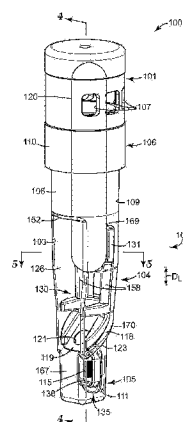
权利要求书2页 说明书55页 附图7页

(54) 发明名称

生物灭菌指示器

(57) 摘要

本发明公开了一种生物灭菌指示器 (BI)。所述 BI 可以包括壳体和设置在所述壳体中的容器。所述容器可以容纳液体,并且所述容器的至少一部分可以是易碎的。所述 BI 还可以包括第一室和第二室。所述第二室可以包括至少一个生物活性源。所述 BI 还可以包括基底,所述基底设置在所述壳体中的所述第一室与所述第二室之间。所述基底可被设置为与所述第一室和所述第二室流体连通,并且所述基底还可被设置为使得所述基底不直接接触所述生物活性源。



1. 一种生物灭菌指示器,其包括:

壳体;

容器,所述容器包含液体并且尺寸被设计为设置在所述壳体内,所述容器的至少一部分是易碎的,所述容器具有第一状态和第二状态,在所述第一状态时,所述容器是完好的并且所述液体不与所述壳体的内部流体连通,在所述第二状态时,所述容器为破碎的并且所述液体与所述壳体的内部流体连通;

位于所述壳体中的第一室,当所述容器处于所述第一状态时,所述容器设置在所述第一室中;

位于所述壳体中的第二室,当所述容器处于第一状态时,所述容器和所述液体不设置在所述第二室中,所述第二室包含生物活性源,当所述容器处于所述第一状态时所述生物活性源不与所述液体流体连通,并且当所述容器处于所述第二状态时所述生物活性源与所述液体流体连通;和

基底,所述基底设置在所述壳体中的所述第一室与所述第二室之间,所述基底被设置为与所述第一室和所述第二室流体连通,所述基底还被设置为使得所述基底不直接接触所述生物活性源;

其中所述第二室包括要进行检查以确定灭菌处理的杀菌力的空间,并且其中所述基底设置在要检查的所述空间之外;并且

其中当所述容器处于所述第二状态并且所述基底与包含抑制剂的液体流体连通时,所述基底适于集中所述抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的生物灭菌指示器,其中所述基底设置在所述第一室与所述第二室之间。

3. 根据权利要求1或2所述的生物灭菌指示器,还包括设置在所述第一室与所述第二室之间的壁,其中所述基底邻近所述壁被设置在所述第一室中。

4. 根据权利要求3所述的生物灭菌指示器,其中所述壁和所述基底相对于所述生物灭菌指示器的纵向以非零度角且非直角取向。

5. 根据权利要求1或2所述的生物灭菌指示器,其中所述基底至少部分地限定所述第一室和所述第二室。

6. 根据权利要求1或2所述的生物灭菌指示器,其中所述基底被设置为控制所述第一室与所述第二室之间的流体流动。

7. 根据权利要求1或2所述的生物灭菌指示器,其中所述基底被设置为当所述容器处于所述第二状态时限制可检测产物从所述第二室向所述第一室扩散。

8. 根据权利要求1或2所述的生物灭菌指示器,其中所述基底被设置为当所述容器处于所述第一状态时控制向所述生物活性源递送灭菌剂的速率。

9. 根据权利要求1或2所述的生物灭菌指示器,其中所述基底包括在其中形成的孔口,并且其中所述孔口的尺寸能够被设计为用于控制所述第一室与所述第二室之间的流体流动。

10. 根据权利要求1或2所述的生物灭菌指示器,其中所述抑制剂是第一指示试剂,其中当所述容器处于所述第二状态并且所述基底与包含第一指示试剂和第二指示试剂的液体流体连通时,所述基底适于选择性地集中所述第一指示试剂。

11. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物灭菌指示器,其中所述基底包含尼龙。

12. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物灭菌指示器,其中所述基底包含带电荷的尼龙。

13. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物灭菌指示器,其还包括:

第一流体路径,所述第一流体路径被设置为使所述第一室与所述第二室流体连接,当所述容器处于所述第一状态时,所述第一流体路径被设置为允许灭菌剂从所述第一室移动到所述第二室中,并且当所述容器处于所述第二状态时,允许所述液体从所述第一室移动到所述第二室中;和

第二流体路径,所述第二流体路径被设置为使所述第二室与所述生物灭菌指示器的另一个室流体连接,所述第二流体路径被设置为当所述灭菌剂或所述液体从所述第一室向所述第二室移动时,允许替换的气体从所述第一室向所述第二室移动。

14. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物灭菌指示器,其还包括设置在所述壳体中的嵌件,所述嵌件被构造用于进行保持所述容器完好和使所述容器破碎中的至少一者,其中所述基底设置在所述嵌件与所述壁之间。

15. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物灭菌指示器,其中所述生物活性源被容纳在源载体中,并且其中所述基底不直接接触所述源载体和所述生物活性源中的至少一者。

生物灭菌指示器

技术领域

[0001] 本发明总体涉及灭菌指示器,并且具体涉及生物灭菌指示器。

背景技术

[0002] 在许多行业如保健行业中,以及在其他行业应用中,可能有必要监测用来对诸如医疗器械、仪器以及其他一次性和非一次性制品的设备进行灭菌的處理的有效性。在这些装置中,通常将灭菌定义为完全消灭所有活的生物活性源(例如微生物,包括如病毒和孢子的结构)的處理。作为标准操作,医院包括无菌指示器,该无菌指示器具有一批制品来测定消毒处理的杀菌力。生物和化学无菌指示器均已被使用。

[0003] 一种标准类型的生物无菌指示器包括已知量的测试微生物,例如嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) (以前称为嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)) 或萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus*) (以前称为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)) 孢子,其抵抗具体灭菌处理的能力可比其他污染生物体大许多倍。指示器暴露于灭菌处理之后,可以在营养培养基中温育生物活性源(如孢子),以确定在灭菌处理后是否有任何源仍存活,其中源的代谢和 / 或生长指示出灭菌处理不足以消灭所有生物活性源。

[0004] 可用的化学无菌指示器可以在灭菌处理结束时立即读取。但是,结果仅表明在灭菌处理过程中存在特定的条件,如存在特定的化学剂或温度,并潜在地表明达到了该条件一段时间。与此相反,生物活性源对所有实际存在条件的响应可以是对灭菌处理如何有效实现灭菌的更直接和可靠的测试。

发明内容

[0005] 本发明的一些方面提供一种生物灭菌指示器。生物灭菌指示器可以包括壳体和容器,其中容器包含液体并且尺寸被设计为设置在壳体中。容器的至少一部分可以是易碎的,并且容器可以具有第一状态和第二状态,在第一状态时,容器是未受损的并且液体不与壳体的内部流体连通,在第二状态时,容器是破碎的并且液体与壳体的内部流体连通。生物灭菌指示器还可以包括当容器处于第一状态时容器设置在其中的壳体中的第一室和当容器处于第一状态时容器和液体不会设置在其中的壳体中的第二室。第二室可以包括生物活性源,当容器处于第一状态时生物活性源不与液体流体连通,而当容器处于第二状态时生物活性源与液体流体连通。生物灭菌指示器还可以包括设置在壳体中第一室与第二室之间的基底。基底可被设置为与第一室和第二室流体连通,并且基底还可被设置为使得基底不直接接触生物活性源。

[0006] 通过考虑具体实施方式和附图,本发明的其它特征和方面将变得显而易见。

附图说明

[0007] 图 1 为根据本发明的一个实施例的生物灭菌指示器的前透视图,该生物灭菌指示

器包括壳体,壳体包括第一部分和第二部分。

[0008] 图 2 为图 1 的生物灭菌指示器的后部透视图。

[0009] 图 3 为图 1-2 的生物灭菌指示器的前部分解图。

[0010] 图 4 为沿图 1 的线 4-4 截取的图 1-3 的生物灭菌指示器的侧剖视图,生物灭菌指示器以第一状态示出,并且生物灭菌指示器的壳体的第二部分以第一位置示出。

[0011] 图 5 为沿图 1 的线 5-5 截取的图 1-4 的生物灭菌指示器的俯视剖视图。

[0012] 图 6 为图 1-5 的生物灭菌指示器的侧剖视图,生物灭菌指示器以第二状态示出,并且生物灭菌指示器的壳体的第二部分以第二位置示出。

[0013] 图 7 为图 1-6 的生物灭菌指示器的俯视剖视图,其中为清楚起见移除了一些部分。

[0014] 图 8 为溴甲酚紫水溶液的紫外-可见吸收光谱和 4-甲基伞形酮溶液的荧光发射光谱。

具体实施方式

[0015] 在详细说明本发明的任何实施例之前,应当理解本发明在其应用中并不受限于在下文描述中提及的或下列附图中所示的结构细节和部件布置。本发明可具有其他实施例,并且能够以多种方式实践或实施。另外还应当理解,本文中所用的用语和术语的目的是为了进行说明,不应被认为是限制性的。本文中所用的“包括”、“包含”或“具有”以及它们的变化形式意在涵盖其后所列举的项目及其等同项目以及附加项目。除非另外规定或限制,否则术语“支承”和“连接”及其变型形式以其广义使用,并且涵盖直接和间接支承与连接。另外,“连接”和“联接”不限于物理或机械连接或联接。应当理解,在不脱离本发明范围的情况下,可采用其他实施例,并且可进行结构或逻辑上的改变。此外,诸如“前”、“后”、“顶部”、“底部”之类的术语仅用于描述元件彼此的关系,而决不用来描述装置的具体取向,也不用来指示或暗示装置的必要或需要的取向,或用来规定本文所述发明在使用过程中的操作、安装、显示或设置方式。

[0016] 本发明总体涉及灭菌指示器,具体涉及生物灭菌指示器。生物灭菌指示器有时也称为“生物无菌性指示器”或简称“生物指示器”。本发明的生物灭菌指示器的一些实施例是独立成套的,可用来确定灭菌处理的杀菌力。本发明整体涉及允许具有至少下列功能中的一者或多者的生物灭菌指示器构造:在灭菌过程中将液体(如,水性混合物)和一种或多种生物活性源分开容纳,并且在灭菌之后允许液体和生物活性源结合;帮助灭菌剂移动至生物灭菌指示器中容纳一种或多种生物活性源的位置(如,封闭端);固定包含液体的易碎容器(如安瓿,例如玻璃安瓿),其中在灭菌过程中,液体的位置与生物灭菌指示器中的一种或多种生物活性源是分离的;在生物灭菌指示器激活(如通过使容器破碎)期间从易碎容器释放液体;在激活期间控制和/或帮助液体移动至生物灭菌指示器中容纳一种或多种生物活性源的位置;提供基本上恒定的灭菌剂路径;收集和/或保持破碎容器的一些部分(如,抑制破碎部分移动至生物活性源附近);最大限度地减少一种或多种生物活性源和/或信号或可检测产物远离生物灭菌指示器的源位置或检测区域扩散(如,以加强检测);以及整体控制和/或帮助流体在生物灭菌指示器内流动(如,通过使用基底和一个或多个内部排放口)。

[0017] 可以用加压蒸汽或其他通用的灭菌剂对医疗保健环境中使用的设备和物资进行灭菌。可以用小型独立成套的指示器,如生物灭菌指示器检验灭菌处理的效果。这些指示

器可以是生物的并可以包含生物活性源。

[0018] 在灭菌工序之后用于培养生物活性源(如孢子)的营养培养基可以在整个灭菌工序中存在,但直到需要之前生物活性源不可触及。例如,易碎的小袋或容器(如,安瓿,例如玻璃安瓿)可以将培养基容纳“于其中”,但与生物活性源分开,并且在需要时(如,灭菌处理之后)可以将容器压碎,使得生物活性源和培养基彼此流体连通。有利于微生物生长的营养物质和营养培养基是本领域已知的,并可见于,例如,“Handbook of Microbiological Media”by Ronald Atlas, published by CRC Press, Boca Raton, FL (佛罗里达州博卡拉顿的CRC出版社出版的“微生物培养基手册”,作者 Ronald Atlas)。Matner 等人(美国专利 No. 5, 073, 488)描述了用于生物灭菌指示器中的细菌孢子的生长和检测的营养培养基,其可用于本发明的生物灭菌指示器,该专利全文以引用方式并入本文中。

[0019] 一般来讲,选择用于生物灭菌指示器中要耐受特定灭菌处理的生物活性源(如,微生物)。本发明的生物灭菌指示器包括一种或多种已知生物活性源(如,微生物菌种)的活菌数量或培养物。此类生物活性源可以是微生物孢子的形式。生物灭菌指示器中的测试源要么被成功的灭菌循环杀灭,要么如果灭菌循环出于某种原因不足够的话能存活下来。有时至少部分地使用细菌孢子而不是生物体的营养体型,因为已知营养体细菌相对容易地被灭菌处理杀灭。孢子还可以具有良好的存储特性并且能够多年保持其休眠状态。因此,在一些实施例中,对标准孢子菌株的种菌的灭菌可以提供在灭菌室中所有微生物已经发生失活的高可信度。

[0020] 仅以举例方式来说,本发明将用于生物灭菌指示器的一种或多种生物活性源描述为“孢子”,但是应当理解,要对用于生物灭菌指示器的具体实施例的源类型(如孢子)加以选择,使其对所设想的具体灭菌处理具有高度耐受性。因此,本发明的不同实施例可使用不同的生物活性源,这取决于具体实施例打算进行的灭菌处理。为简单起见,本发明全文使用了术语“孢子”,但应当理解,其他生物活性源,例如微生物(如,细菌、真菌、病毒等)、孢子(如,细菌、真菌等)、酶、酶活性底物、ATP、微生物代谢物或它们的组合均可改为用于本发明的生物灭菌指示器。

[0021] 短语“生物活性”通常是指任何具体的催化过程或与生物细胞相关的过程的组合。生物活性的非限制性例子包括分解酶活动(如,碳水化合物发酵途径)、合成代谢酶活动(如,核酸、氨基酸或蛋白合成)、偶联反应(如,代谢途径)、生物分子介导的氧化还原反应(如,电子传递体系)和生物荧光反应。“预定的”生物活性是指方法针对具体生物过程(如,酶反应)或生物过程组合(如,生物化学途径)的检测。本领域的普通技术人员将会知道,某些预定的生物活性可以与特定类型的细胞(如,癌细胞或微生物)或病理过程相关。

[0022] 相似地,应当理解,本发明使用的包括术语“孢子”的短语,例如“孢子载体”、“孢子贮存室”、“孢子区域”、“孢子生长室”等,仅为了简单起见而使用,但此类组件、元件或短语同样适用于其他生物活性源,并不旨在仅仅指孢子。例如,上述短语还可以称为“源载体”、“源区域”、“源贮存室”、“源生长室”等。

[0023] 将孢子和培养基结合在一起的过程可以称为生物灭菌指示器的“激活”。即,术语“激活”及其变型形式在相对于生物灭菌指示器使用时,可以通常是指使一种或多种生物活性源(如,孢子)与液体或培养基(如,所关注的孢子的营养培养基)流体连通。例如,当生物灭菌指示器内包含培养基的易碎容器至少部分地破碎、刺破、刺穿、压碎、破裂等,使得培养

基与一种或多种生物活性源流体连通时,可以将生物灭菌指示器描述为已被“激活”。换句话说讲,当一种或多种生物活性源暴露于此此前与该一种或多种生物活性源分开容纳的培养基时,生物灭菌指示器被激活。

[0024] 一些现有的灭菌指示器,特别是生物灭菌指示器包括壳体和包含液体(如,营养培养基)的容器,壳体限定其中的单个室,并且多种组件设置在其中,例如适于将一种或多种生物活性源设置在生物灭菌指示器中的所需位置(如,封闭端)的源载体(如,孢子条)。然而,本发明整体涉及具有在壳体内形成的不止一个室的生物灭菌指示器,使得容器和一种或多种生物活性源特别是在灭菌过程中可被彼此分开地容纳在生物灭菌指示器的单独区域。虽然本发明的生物灭菌指示器可以包括不止一个室并用于将容器和一种或多种生物活性源分开,但本发明的生物灭菌指示器被设计为使得组件之间的此类分离不会不利地影响生物灭菌指示器的其他功能。例如,本发明的生物灭菌指示器还可以有利于(1)在灭菌过程中使灭菌剂移动至一种或多种生物活性源,和/或(2)在需要时(如,灭菌之后和生物灭菌指示器激活期间)使液体移动至与一种或多种生物活性源接触。

[0025] 在一些实施例中,可以通过利用一个或多个内部排放口或排放通道促进液体流经生物灭菌指示器和/或在其内部流动。此类内部排放口可以由在生物灭菌指示器内形成的流体路径提供。术语“排放口”、“内部排放口”、“排放通道”或它们的变型形式可以通常是指此类流体路径:其被设置为当另一种流体(如,液体、气体或它们的组合)进入生物灭菌指示器的一个区域(如,室、贮存室、空间、部分等)时,允许该区域中存在的气体被替换。具体地讲,此类短语通常是指内部流体路径,其允许将生物灭菌指示器内的一个区域排放到生物灭菌指示器内的另一个区域(如,当生物灭菌指示器与外界隔离时),以有利于流体移动至生物灭菌指示器的所需区域。此外,生物灭菌指示器内的此类排放特别是在要移动的流体体积大于较小区域的体积时,可以有利于使流体从生物灭菌指示器的较大区域移动至较小区域(如,封闭端)。在一些实施例中,即使没有使用物质力,或任何外力,例如离心、摇动、轻拍等,此类内部排放也可以有利于流体在生物灭菌指示器内或贯穿生物灭菌指示器流动。

[0026] 在一些实施例中,本发明的生物灭菌指示器可以包括被设置为使第一室与第二室流体连接的第一流体路径以及被设置为使第二室与生物灭菌指示器内的另一个室(如,第一室)流体连接的第二流体路径。第一流体路径通常可用于使灭菌剂(即,灭菌期间)和/或液体(即,激活期间)从第一室移动至第二室,第二流体路径通常可用作第二室的排放口,以允许气体从第二室逸出并有利于使灭菌剂和/或液体移入第二室。在此类实施例中,第一室可用于容纳包含液体的容器,第二室可用于容纳一种或多种生物活性源。

[0027] 生物灭菌指示器暴露于灭菌循环之后,可将灭菌负载(如,包括需要灭菌的物品和生物灭菌指示器)从灭菌器中取出。处理生物灭菌指示器的第一个步骤之一可以包括激活生物灭菌指示器。在一些实施例中,激活可以包括关闭生物灭菌指示器,其可以包括使生物灭菌指示器的一部分(如,盖件)相对于生物灭菌指示器的另一部分(如,管、基部、管状主体等)移动。在一些实施例中,生物灭菌指示器的内部可以在灭菌期间一直与外界流体连通,但灭菌之后与外界隔离。例如,在一些实施例中,可以在灭菌期间将生物灭菌指示器的盖件在第一位置处联接到生物灭菌指示器的管,使生物灭菌指示器内部与外界保持流体连通。灭菌之后,可以将盖件进一步压到管(如,第二位置,其中生物灭菌指示器内部不再与外界流体连通)上,以保持无菌并降低用于支持孢子(即,如果仍是活的)的代谢活动和/或生

长的培养基(如,液体)的蒸发率。可以在灭菌期间包含培养基,并在灭菌之后将其释放到生物灭菌指示器内部。例如,可以在灭菌期间将培养基与孢子分开容纳在易碎容器中,在灭菌后的激活步骤期间(如,响应于盖件相对于生物灭菌指示器的管或基部的移动)易碎容器可以至少部分地破碎,从而使培养基与孢子流体连通,以确保孢子的适当营养。

[0028] 在本发明的一些实施例中,关闭生物灭菌指示器(如,使一部分相对于另一部分移动,以密封内部)可以包括或引起包含培养基的易碎容器的破碎,使得关闭生物灭菌指示器引起生物灭菌指示器的激活。

[0029] 本发明的生物灭菌指示器可用于多种灭菌处理,包括但不限于暴露于蒸汽(例如高压蒸汽)、干热、气体或液体试剂(例如环氧乙烷、过氧化氢、过氧乙酸、臭氧或者它们的组合)、辐射或者它们的组合。在所述灭菌处理中的至少一些中,在处理中包括或者可能遇到高温,例如 50℃、100℃、121℃、132℃、134℃等。另外,可能遇到高压和/或真空,例如 15psi (1×10^5 Pa)。

[0030] 如上所述,根据使用的灭菌处理选择特定系统中使用的生物活性源。例如,对于蒸汽灭菌处理,可以使用嗜热脂肪地芽孢杆菌或嗜热脂肪芽孢杆菌或它们的孢子。又如,对于环氧乙烷灭菌处理,可以使用萎缩芽孢杆菌(以前称为枯草芽孢杆菌)或它们的孢子。在一些实施例中,抗灭菌处理的孢子可以包括(但不限于)如下诸项中的至少一者:嗜热脂肪地芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、萎缩芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、产孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)或它们的组合。

[0031] 可适用于本发明的生物灭菌指示器的酶和底物在美国专利 5,073,488 (Matner 等人)、5,418,167 (Matner 等人)和 5,223,401 (Foltz 等人)中确定,所述专利在全部公开内容以引用方式并入本文。

[0032] 合适的酶包括水解酶类和/或衍生自产孢子微生物如嗜热脂肪芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的酶类。可用于本发明生物灭菌指示器的来自产孢子微生物的酶类可包括 β -D-葡萄糖苷酶、 α -D-葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、丁酸酯酶、辛酸酯酶、脂肪酶、肉豆蔻酸脂肪酶、亮氨酸氨基肽酶、缬氨酸氨基肽酶、胰凝乳蛋白酶、磷酸水解酶、 α -D-半乳糖苷酶、 β -D-半乳糖苷酶、酪氨酸氨基肽酶、苯丙氨酸氨基肽酶、 β -D-葡萄糖醛酸酶、 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶、N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶、 β -D-纤维二糖糖苷酶、丙氨酸氨基肽酶、脯氨酸氨基肽酶和脂肪酸酯酶。

[0033] 生物灭菌指示器的一些实施例可以包括显色和/或荧光底物,它们与酶反应形成可检测产物(M. Roth, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 17, D. Block, Ed., Interscience Publishers, New York, 1969, p. 89 (纽约 Interscience 出版社 1969 年出版、D. Block 主编的 M. Roth 的《生物化学分析方法》第 17 卷第 89 页),其以引用方式并入本文中;S. Udenfriend, *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Academic Press, New York, 1962, p. 312 (纽约学术出版社 1962 年出版的 S. Udenfriend 的《生物和医学中的荧光测定》第 312 页);以及 D. J. R. Lawrence, *Fluorescence Techniques for the Enzymologist*, *Methods in Enzymology*, Vol. 4, S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds., Academic Press, New York, 1957, p. 174 (纽约学术出版社 1957 年出版、由 S. P. Colowick 和 N. O. Kaplan 主编的《酶学方法》中 D. J. R. Lawrence 的《酶学家所用的

荧光技术》第 174 页)。这些底物根据它们产生视觉上可检测的信号或产物的方式可分为两类。第一组中的底物与酶反应形成本身发色或发荧光的酶改性产物。第二组中的底物形成酶改性产物,所述产物必须进一步与另外的一种或多种化合物反应,才能形成可生成颜色或荧光信号的可检测产物。

[0034] 因此,短语“可检测产物”可以是指可通过下文所述的任何检测方法或过程检测到的任何分子、化合物、物质、底物等,或它们的组合。例如,此类可检测产物可以是生物活性源生存能力的指示物,并且检测到此类产物可以通常表明灭菌处理失败或不足。

[0035] 在一些实施例中,活性酶源可以是 (1) 衍生自合适微生物的纯化的分离酶;(2) 微生物,其中酶是天生的,或通过基因工程添加的;和/或 (3) 微生物,其中已在孢子形成或生长期间添加酶,使得酶与微生物结合或相连,如,在孢子形成期间将酶添加到孢子中,从而结合到孢子内。在一些实施例中,可用作酶的来源的微生物包括孢子状态或营养体状态的细菌或真菌。在一些实施例中,酶来源包括芽孢杆菌属、梭菌属、脉孢菌属、假丝酵母属或者这类微生物的组合。

[0036] α -D-葡萄糖苷酶已在嗜热脂肪芽孢杆菌的孢子中鉴定,所述脂肪嗜热芽孢杆菌例如市售获自美国马里兰州洛克维尔模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, Rockville, Md.) 的“ATCC8005”和“ATCC7953”。 β -D-葡萄糖苷酶已在枯草芽孢杆菌(例如可以“ATCC9372”从美国模式培养物保藏所市售获得)中发现。

[0037] 在采用分离的酶的情况中,或者在用作酶来源的微生物不比天然污染物更耐灭菌条件的情况中,可使另一常用来监测灭菌条件的微生物随该酶来源一起暴露于灭菌循环。在这种情况下,本发明的方法可包括将灭菌循环后残留的任何活微生物与含水营养培养基一起温育以确认灭菌效果的步骤。

[0038] 一般地,监测灭菌处理的有效性可包括将本发明的生物灭菌指示器放在灭菌器中。在一些实施例中,灭菌器包括灭菌室,灭菌室可被尺寸确定成容纳多个待灭菌的制品,并且装备有从灭菌室中排出空气和/或其他气体的装置和用于向灭菌室添加灭菌剂的装置。本发明的生物灭菌指示器可被设置在灭菌器中最难以进行灭菌的区域中(例如,排出口的上方)。或者,当本发明的生物灭菌指示器置于灭菌室中时,该生物灭菌指示器可被设置在待灭菌的制品附近(或通常接近该制品)。此外,生物灭菌指示器可被设置在可用在灭菌器中的过程验证装置中。

[0039] 灭菌处理还可以包括将待灭菌的制品和生物灭菌指示器暴露于灭菌剂。在一些实施例中,可在将灭菌室中存在的任何空气或其他气体的至少一部分排放出灭菌室后,将灭菌剂加到灭菌室中。或者,也可不排放灭菌室而加入灭菌剂。一系列的排放步骤可以用来确保灭菌剂到达灭菌室中所有需要区域并且接触所有待灭菌的制品,包括生物灭菌指示器。

[0040] 一般地,在已将生物灭菌指示器暴露于灭菌循环后,可将液体(例如生长培养基、可与固体生长培养基混合的水等,或者它们的组合)引入到孢子。如上所述,将液体引入到孢子的步骤可以称为“激活步骤”。如果孢子经过灭菌循环之后仍存活,液体将有利于孢子的代谢活动和/或生长,并且此类活动和/或生长是可检测到的。如果观察到生长,通常认定灭菌循环是无效的。

[0041] 图 1-7 示出了根据本发明一个实施例的生物灭菌指示器 100。生物灭菌指示器的其他合适的实施例在以下专利中有所描述:共同待审的 PCT 专利公开 No. W02011/011189,

名称为“Biological Sterilization Indicator and Method of Using Same”(生物灭菌指示器及其使用方法);美国专利申请 No. 61/409,042,名称为“Biological Sterilization Indicator System and Method”(生物灭菌指示器系统和方法);美国专利申请 No. 61/408,997,名称为“Biological Sterilization Indicator System and Method”(生物灭菌指示器系统和方法);以及美国专利申请 No. 61/408,988,名称为“Biological Sterilization Indicator and Method of Using Same”(生物灭菌指示器及其使用方法);这些专利的全文以引用的方式并入本文。

[0042] 生物灭菌指示器 100 可包括壳体 102,该壳体可包括第一部分 104 和第二部分 106 (例如盖件),该第一部分和第二部分适于联接在一起以提供独立成套的生物灭菌指示器。在一些实施例中,第一部分 104 和第二部分 106 可由相同的材料形成,而在一些实施例中,第一部分 104 和第二部分 106 可由不同的材料形成。壳体 102 可以限定生物灭菌指示器 100 的贮存室 103,可以将其他组件设置在其中,并且可以在灭菌处理期间将灭菌剂引入其中。

[0043] 壳体 102 可由至少一个不透液体的壁界定,所述壁例如第一部分 104 的壁 108 和/或第二部分 106 的壁 110。应当理解,在不脱离本发明精神和范围的前提下,也可采用一件式一体壳体 102,或者第一和第二部分 104 和 106 可具有其他形状、尺寸和相对结构。壳体 102 (如,壁 108 和 110)的合适材料可以包括(但不限于)玻璃、金属(如,箔)、聚合物(如,聚碳酸酯(PC)、聚丙烯(PP)、聚丙烯(PPE)、聚乙烯(polyethylene)、聚苯乙烯(PS)、聚酯(如,聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET))、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA 或丙烯酸类树脂)、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯(ABS)、环状烯烃聚合物(COP)、环状烯烃共聚物(COC)、聚砜(PSU)、聚醚砜(PES)、聚醚酰亚胺(PEI)、聚对苯二甲酸丁二酯(PBT))、陶、瓷或它们的组合。

[0044] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 还可以包括包含液体(如,水性混合物) 122 的易碎容器 120,其尺寸被设计为容纳在生物灭菌指示器 100 内,例如,壳体 102 的至少一部分内(如,至少在壳体 102 的第一部分 104 内)。易碎容器 120 可由多种材料形成,包括但不限于金属(例如箔)、聚合物(例如以上针对壳体 102 所列举的聚合物的任何一种)、玻璃(例如玻璃安瓿)中的一种或多种以及它们的组合。在一些实施例中,容器 120 仅有一部分是易碎的,例如,容器 120 可包括易碎部分或覆盖件(如易碎阻挡件、薄膜、隔膜等)。易碎容器 120 可以具有第一状态和第二状态,第一状态时它是未受损的并且液体 122 包含在其中,第二状态时容器 120 的至少一部分是破碎的。在容器 120 的第二状态时,如,当容器 120 设置在生物灭菌指示器 100 中时,液体 122 可以与生物灭菌指示器 100 的贮存室 103 流体连通。

[0045] 如图示实施例所示,可以将容器 120 保持在生物灭菌指示器 100 内的合适位置和/或用嵌件 130 使其破碎,如下文所详述。

[0046] 壳体 102 的第一部分 104 适于容纳生物灭菌指示器 100 的大多数组件,并可以称为“管”、“管状主体”、“基部”等。壳体 102 可包括贮存室 103,该贮存室可由壳体 102 的第一部分 104 和第二部分 106 中的一者或两者界定。生物灭菌指示器 100 还可包括设置成与贮存室 103 流体连通的孢子或另一种生物活性源 115 (或孢子座位)。如图 1-3 中所示,壳体 102 的第二部分 106 可包括一个或多个孔口 107,以提供壳体 102 内部(如贮存室 103)与外界之间的流体连通。例如,该一个或多个孔口 107 可在灭菌处理过程中提供孢子 115 与外界之间的流体连通,且可充当进入生物灭菌指示器 100 的进口和充当灭菌剂路径 164 的

进口(下文有更详细的描述)。在一些实施例中,壳体 102 的第二部分 106 可联接到壳体 102 的第一部分 104 的第一(如,开口)端 101 上,且孢子 115 可被设置在壳体 102 的第一部分 104 的与第一端 101 相对的第二(如,封闭)端 105 处。

[0047] 在一些实施例中,阻挡件或过滤器(例如,无菌阻挡件;未示出)可被设置在灭菌剂路径 164 中(例如在孔口 107 所形成的进口处)以防止污染性的或外来的生物体、物体或材料进入生物灭菌指示器 100。这种阻挡件可包括能透过气体但不能透过微生物的材料,且可通过多种联接方式联接到壳体 102,所述联接方式包括但不限于粘合剂、热密封、超声波焊接等。或者,阻挡件可通过结合到壳体 102 的第一部分 104 的支撑结构(如第二部分 106)来联接到灭菌剂路径 164(例如以按扣配合式接合、螺旋配合式接合、压装配合式接合或者它们的组合的方式联接)。在暴露于灭菌剂的过程中,灭菌剂可穿过阻挡件进入灭菌剂路径 164 并与孢子 115 接触。

[0048] 在一些实施例中,如图示实施例所示,壳体 102 可包括可至少部分地被内壁(或局部壁)118、突架(ledge)、隔离件(partition)、凸缘等分开的下部分 114 和上部分 116,在其中可形成开口 117,该开口提供下部分 114 和上部分 116 之间的流体连通。在一些实施例中,壳体 102 的第一部分 104 的下部分 114(有时简单地称为“下部分 114”或“壳体 102 的下部分 114”)适于容纳孢子 115 或孢子座位。在一些实施例中,下部分 114 可称为壳体 102 的“检测部分”或“检测区域”,因为可检查下部分 114 的至少一部分确认孢子生长的迹象。另外,在一些实施例中,壳体 102 的第一部分 104 的上部分 116(为简单起见有时称为“上部分 116”或“壳体 102 的上部分 116”)适于容纳易碎容器 120 的至少一部分,特别是在激活前。

[0049] 在一些实施例中,贮存室 103 的至少部分地被壳体 102 的上部分 116 限定的部分可以称为第一室(或贮存室、区、区域或空间)109,贮存室 103 的至少部分地被壳体 102 的下部分 114 限定的部分可以称为第二室(或贮存室、区、区域或空间)111。在一些实施例中,第二室 111 可以称为“孢子生长室”或“检测室”,并可以包括要检查孢子生存能力以确定灭菌处理效果的空间。

[0050] 第一室 109 和第二室 111 可被设置为彼此流体连通,以允许灭菌剂和液体 122 从(即,穿过)第一室 109 移至第二室 111。在一些实施例中,第一室 109 和第二室 111 之间的流体连接的程度(如,连接第一室 109 和第二室 111 的开口如开口 117 的大小)可在激活步骤(即液体 122 从容器 120 释放出来)之后增加、与该激活步骤同时增加和/或响应该激活步骤而增加。在一些实施例中,对第一室 109(如上部分 116 中)和第二室 111(如下部分 114 中)之间的流体连通(或者流体连接的程度)的控制可由嵌件 130 的至少一部分提供。

[0051] 在灭菌期间和容器 120 处于未破碎的第一状态时,容器 120 可被设置和保持在第一室 109 中。当容器 120 处于第一状态时,孢子 115 可被容纳在第二室 111 中并与外界流体连通。第一室 109 和第二室 111 可被构造为使得容器 120 不存在于第二室 111 中,并且具体地讲,当容器 120 处于其未破碎的第一状态时,容器 120 不存在于第二室 111 中。当容器 120 破碎并且液体 122 被释放到壳体 102 内部时,灭菌剂可以在灭菌期间(如,经由第一室 109)移入第二室 111,并且液体 122 可以在激活期间(如,从第一室 109)移入第二室 111。

[0052] 因此,当容器 120 处于第一状态时,第一室 109 和第二室 111 可以彼此并与外界(如,灭菌期间)流体连通。例如,第一室 109 和第二室 111 可以通过一个或多个孔口 107 与

外界流体连通。在一些实施例中,第一室 109 和第二室 111 可通过以下方式与外界流体连通:灭菌剂进入生物灭菌指示器 100 时第一室 109 设置在第二室 111 上游。即,第一室 109 可以设置在灭菌剂入口(如,一个或多个孔口 107)与第二室 111 之间,并且灭菌剂入口可以设置在第一室 109 的相对侧,而不是第二室 111 的相对侧。

[0053] 如图 4 和 6 所示,在一些实施例中,特别是当容器 120 处于第一状态时,第一室 109 可被第一部分 104 和第二部分 106 中的一者或两者限定。另外,在一些实施例中,第一室 109 可以包括第一末端 112,其位置邻近壳体 102 的第一部分 104 的开口端 101,邻近壳体 102 的第二部分 106,和 / 或至少部分地被第二部分 106 限定。第一室 109 还可以包括第二末端 113,其位置邻近第二室 111 并与其流体连通,并且位置朝向壳体 102 的封闭端 105。第一室 109 的第一末端 112 可被壳体 102 的第一部分 104 和 / 或第二部分 106 限定。

[0054] 还如图 4 和 6 所示,在一些实施例中,第二室 111 可以包括第一末端 124 和第二末端 125,第一末端 124 的位置邻近第一室 109 并与其流体连通,而且位置朝向壳体 102 的开口端 101,第二末端 125 至少部分地被壳体 102 的封闭端 105 限定,包括或位置邻近封闭端 105。

[0055] 换句话讲,如图 4 和 6 所示,生物灭菌指示器 100 可以包括纵向 D_L ,并且在一些实施例中,第一室 109 可以纵向设置在第二室 111 上方。

[0056] 在一些实施例中,第二室 111 可以至少部分地被生物灭菌指示器 100 的封闭端 105 限定,可以包括或位置邻近封闭端 105。另外,在一些实施例中,第二室 111(如,体积和 / 或横截面积)可以小于第一室 109 和生物灭菌指示器 100 激活时将被释放的容器 120 中的液体 122 的体积中的至少一者。因此,在此类实施例中,第二室 111 可以具有气阻效应,即存在于第二室 111 中的气体(如空气)可以阻止流体移动到第二室 111 中。在一些实施例中,如下文所详述,允许第二室 111 中的流体排放到生物灭菌指示器 100 的另一部分的流体路径可以有利的流体移动到第二室 111 中。

[0057] 在一些实施例中,壁 118(有时称为“分隔壁”)可以是成角度的或倾斜的,例如相对于壳体 102 的纵向 D_L (例如其中纵向 D_L 沿着壳体 102 的长度延伸)以非零度和非直角的角度取向。壁 118 这样成角度或倾斜可有利于在灭菌之后和在容器 120 已被打破以释放液体 122 后液体 122 从上部分 116 移动到下部分 114。

[0058] 如图 1-3 所示,在一些实施例中,壁 118 可至少部分地通过壳体 102 的内部尺寸变化形成。例如,如图所示,可通过从第一室 109 中的第一纵向位置向第二室 111 中的第二纵向位置的横截面积的减小形成壁 118。另外,仅以举例的方式,壳体 102 的内部横截面形状可以在从第一室 109 向第二室 111 的过渡处从第一室 109 中的大致圆形(如,具有构成小于周边 50% 的一个扁平侧面))变成第二室 111 中的大致平行六面体(如,大致正方形)。

[0059] 此外,在一些实施例中,壁 118 还可以至少部分地通过壳体 102 的外部尺寸变化形成。如图 1-3 所示,在一些实施例中,壳体 102 包括梯部(或突架、悬垂部份、过渡等)123,其角度与壁 118(如果壁 118 是成角度的)一致,并且包括壳体 102 的外形和尺寸的变化。然而,应当理解,在一些实施例中,即使通过壳体 102 的内部尺寸改变形成横截面形状或尺寸与第一室 109 不同的第二室 111,壳体 102 的外形和尺寸也不需要改变或者与内部形状和 / 或尺寸的改变一致地改变。例如,在一些实施例中,梯部 123 的取向可以基本上与纵向 D_L 垂直。

[0060] 在一些实施例中,贮存室 103 的体积为至少约 0.5 毫升 (mL),在一些实施例中,至少约 1mL,而在一些实施例中,至少约 1.5mL。在一些实施例中,贮存室 103 的体积不大于约 5mL,在一些实施例中,不大于约 3mL,而在一些实施例中,不大于约 2mL。

[0061] 在一些实施例中,易碎容器 120 的体积为至少约 0.25mL,在一些实施例中,至少约 0.5mL,而在一些实施例中,至少约 1mL。在一些实施例中,易碎容器 120 的体积为不大于约 5mL,在一些实施例中,不大于约 3mL,而在一些实施例中,不大于约 2mL。

[0062] 在一些实施例中,易碎容器 120 中所含的液体 122 的体积为至少约 50 微升,在一些实施例中,至少约 75 微升,而在一些实施例中,至少约 100 微升。在一些实施例中,易碎容器 120 中所含的液体 122 的体积不大于约 5mL,在一些实施例中,不大于约 3mL,而在一些实施例中,不大于约 2mL。

[0063] 在一些实施例中,第一室 109 (即,由壳体 102 的第一部分 104 的上部分 116 形成)的体积为至少约 500 微升(或立方毫米),在一些实施例中至少约 1000 微升,在一些实施例中至少约 2000 微升,而在一些实施例中至少约 2500 微升。在一些实施例中,第一室 109 的体积不大于约 5000 微升,在一些实施例中,不大于约 4000 微升,而在一些实施例中,不大于约 3000 微升。在一些实施例中,第一室 109 具有约 2790 微升或 2800 微升的体积。

[0064] 在一些实施例中,第二室 111 (即,由壳体 102 的第一部分 104 的下部分 114 形成)的体积为至少约 5 微升,在一些实施例中,至少约 20 微升,而在一些实施例中,至少约 35 微升。在一些实施例中,第二室 111 的体积不大于约 250 微升,在一些实施例中,不大于约 200 微升,在一些实施例中,不大于约 175 微升,而在一些实施例中,不大于约 100 微升。在一些实施例中,第二室 111 具有约 208 微升或 210 微升的体积。

[0065] 在一些实施例中,第二室 111 的体积为第一室 109 的体积的至少约 5%,而在一些实施例中,为至少约 7%。在一些实施例中,第二室 111 的体积不大于第一室 109 的体积的约 20%,在一些实施例中,不大于约 15%,在一些实施例中,不大于约 12%,而在一些实施例中,不大于约 10%。在一些实施例中,第二室 111 的体积为第一室 109 的体积的约 7.5%。

[0066] 在一些实施例中,第二室 111 的体积不大于容纳在容器 120 中的液体 122 的体积的约 60%,在一些实施例中,不大于约 50%,而在一些实施例中,不大于约 25%。在一些实施例中,将第二室 111 的体积设计为基本上小于容纳在容器 120 中的液体 122 的体积可以确保额外的液体体积能够补偿意外蒸发的液体。

[0067] 在一些实施例中,第一室 109 (即,由壳体 102 的第一部分 104 的上部分 116 形成)在第一室 109 与第二室 111 之间的过渡处,或在邻近第二室 111 的位置处的横截面积(或平均横截面积)为至少约 25mm^2 ;在一些实施例中,至少约 30mm^2 ;而在一些实施例中,至少约 40mm^2 。在一些实施例中,第一室 109 在第一室 109 与第二室 111 之间的过渡处,或在邻近第二室 111 的位置处的横截面积不大于约 100mm^2 ,在一些实施例中,不大于约 75mm^2 ,而在一些实施例中,不大于约 50mm^2 。

[0068] 在一些实施例中,第二室 111 (即,由壳体 102 的第一部分 104 的下部分 114 形成)在第一室 109 与第二室 111 之间的过渡处,或在邻近第一室 109 的位置处的横截面积为至少约 5mm^2 ,在一些实施例中,至少约 10mm^2 ,而在一些实施例中,至少约 15mm^2 。在一些实施例中,第二室 111 的横截面积(或平均横截面积)不大于约 30mm^2 ,在一些实施例中,不大于约 25mm^2 ,在一些实施例中,不大于约 mm^2 。

[0069] 在一些实施例中,第二室 111 在第一室 109 与第二室 111 之间的过渡处的横截面积可以不大于第一室 109 过渡处横截面积的约 60%,在一些实施例中,不大于约 50%,在一些实施例中,不大于约 40%,而在一些实施例中,不大于约 30%。

[0070] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 还可以包括基底 119。在一些实施例中,如图 1-4 和 6 所示,基底 119 的尺寸可被设置为邻近壁 118,并且具体地讲,搁在壁 118 顶上。可将基底 119 设置在生物灭菌指示器 100 的上部分 116 (即第一室 109) 与下部分 114 (即第二室 111) 之间,而在一些实施例中,可以至少部分地限定第一室 109 和第二室 111。因此,在一些实施例中,可将基底 119 设置在容器 120 与孢子 115 之间。在一些实施例中,可将基底 119 设置在第一室 109 中,或壁 118 的第一室侧,使得基底 119 不设置在第二室 111 中。

[0071] 另外,可将基底 119 设置为最小化测定信号(如,荧光)向第二室 111 外的扩散。在一些实施例中,根据基底 119 的材料组成,基底 119 还能够吸收染料、指示试剂或溶液中会妨碍准确读取来自生物灭菌指示器 100 的信号的其他材料(即,“抑制剂”)。在一些实施例中,如图 1-4、6 和 7 所示,基底 119 可以包括一个或多个孔口 121,其可被构造成控制(即,帮助和 / 或限制,这取决于数量、尺寸、形状和 / 或位置)流体在生物灭菌指示器 100 的第一室 109 与第二室 111 之间的移动,并且具体地讲,在容器 120 破碎时,其可以帮助液体 122 向孢子 115 移动。仅以举例的方式,如图所示,当孔口 121 布置在基底 119 的中央的前面(或“前部”)时,观察到具体的有益效果或优点。在图 1-7 所示的实施例中,生物灭菌指示器 100 的“前面”或其中的组件通常可被描述为朝向平坦表面 126。通常,生物灭菌指示器 100 的“前面”可以指生物灭菌指示器 100 的将被读取设备检查的部分。

[0072] 另外,仅以举例的方式,示出的孔口 121 为环状或圆形;然而,其他横截面孔口形状也可以采用,并且也在本发明范围内。此外,仅以举例的方式,并如图 3 所示,基底 119 被成形为基本上填充在第一室 109 与第二室 111 之间的过渡处的第一室横截面积。然而,基底 119 的其他形状也可以采用,并适于适形于壳体 102、第一室 109、第二室 111、壁 118 或生物灭菌指示器 100 的其他组件。

[0073] 如上所述,第二室 111 可以包括要检查的空间。可以通过测定此类空间中孢子的生存能力,确定灭菌工序的杀菌力或效力。在一些实施例中,要检查的空间可以是第二室 111 的全部或一部分。在一些实施例中,可将基底 119 设置在要检查的空间之外,这能够将空间内可能影响测定过程的结构数量减至最低。例如,在一些实施例中,可将基底 119 设置为使得基底 119 不直接接触孢子 115、孢子载体 135 和孢子贮存室 136 中的至少一者。在一些实施例中,可将基底 119 设置为使得基底 119 不位于检测系统(如,光学检测系统,例如荧光激发源和发射检测器)与孢子 115、孢子载体 135 和孢子贮存室 136 中的至少一者之间。当容器 120 处于第一状态和 / 或第二状态时,但特别是当容器 120 处于第二状态时,基底 119 可以具有上述位置。

[0074] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 中的基底位置会影响孢子生存能力快速检测系统(如,荧光检测)与较慢(如,过夜或 24 小时)检测系统(如,能够响应于孢子生长而呈现颜色变化(如,在 24 小时内)的 pH 指示剂)之间的相关性。例如,在一些实施例中,基底 119 能够提高在多个时间点的荧光读数与 24 小时后的生长结果之间的相关性,如以下实例 1 所示。具体地讲,当基底 119 设置在“第一”位置(如本文所述并如图 1、2 和 4-7 所示)时,

荧光可以准确地与生长相互关联。如实例 1 所示,与其他基底位置和没有基底的生物灭菌指示器相比,此类相关性可以是一种改进。

[0075] 另外,可将基底 119 设置在生物灭菌指示器 100 中,使得容器 120 处于第一状态时,基底 119 不直接接触容器 120。例如,在一些实施例中,可将基底 119 设置在第一室 109 中(如,邻近第一室 109 的底端(如,第二末端 113)),但即使在此类实施例中,也可将基底 119 设置为使得基底 119 不接触容器 120。例如,如图 1-2 和 4-6 所示,在一些实施例中,当容器 120 处于第一状态时,可将嵌件 130 设置在容器 120 与基底 119 之间,使得嵌件 130 将容器 120 保持在第一状态。可将嵌件 130 或它的一部分设置为与基底 119 相邻。例如,如图示实施例中所示,可将基底 119 设置在(如,夹在)嵌件 130 与壁 118 之间。因此,在一些实施例中,可将基底 119 设置在嵌件 130 与第二室 111 之间。在一些实施例中,当容器 120 处于第二状态时,容器 120 的破碎部分或碎片可以与基底 119 接触,但在一些实施例中,容器 120 的破碎部分不与基底 119 接触。

[0076] 如上所述,在一些实施例中,基底 119 可被设置和构造成用于控制或影响生物灭菌指示器 100 中的流体流动,并且具体地讲,用于控制第一室 109 与第二室 111 之间的流体流动。例如,在一些实施例中,基底 119 可被构造成(如,将某些材料的尺寸、形状、取向和/或构造设计为)控制向第二室 111 (和向孢子 115)递送灭菌剂的速率,从而能够控制孢子 115 的“杀伤率”。例如,如果第一室 109 与第二室 111 之间不存在基底 119,灭菌剂递送速率可以小于存在基底时的递送速率。即,在一些实施例中,基底 119 能够通过选择性地保护孢子 115 来控制杀伤率。在一些实施例中,基底 119 可以用作用于控制生物灭菌指示器 100 中的流体流动,特别是用于控制灭菌剂递送的“阀门”。此外,在一些实施例中,例如,如果孢子 115 经过灭菌处理仍存活,基底 119 可以具有增强或调节孢子 115 产生的响应的特性。

[0077] 此外,在一些实施例中,基底 119 可被构造成(如,将某些材料的尺寸、形状、取向和/或构造设计为)控制可检测产物向要检查空间外扩散的速率。在一些实施例中,可检测产物可以包括指示孢子生存能力的信号(如,荧光信号),而在一些实施例中,可检测产物可以是孢子 115 本身。控制可检测产物向要检查空间外的扩散特别适用于液体 122 的体积大于第二室 111 的体积(或要检查的空间)的实施例,因为当容器 120 处于破碎的第二状态时,此类实施例中的液体 112 会在生物灭菌指示器 100 中漫延至高于第二室 111 (或要检查的空间)的水平。在此类实施例中,可检测产物可贯穿液体 122 的整个空间自由移动(即,移至要检查空间之外的空间),除非具有某种阻挡件或控制此类扩散的装置,如基底 119。例如,在一些实施例中,可将基底 119 设置在刚好在要检查空间上方的位置(即,低于液体 122 的液位),以阻止可检测产物移动到位于基底 119 上方的液体 122 部分。

[0078] 在一些实施例中,基底 119 可以通过对灭菌剂和/或可检测产物提供物理阻挡件或阻塞件控制灭菌剂递送速率(如,递送至第二室 111 中)和/或可检测产物的扩散速率(如,扩散出第二室 111)。当容器 120 处于破碎的第二状态时,此类物理阻挡件还可用于收集容器 120 的破碎部分,以阻止破碎部分移动到要检查的空间内,否则破碎部分会堵塞、折射、反射或以其他方式妨碍检测过程(如,光学检测过程)。

[0079] 另外,在一些实施例中,在液体 122 与孢子 115 形成流体连通之前或之后,液体 122 可以包括一种或多种抑制剂或可以干扰准确测定或检测过程的其他组分。在一些实施例中,抑制剂的例子可以包括下列中的至少一者:染料、指示试剂、可以抑制检测孢子生存能

力所必需的反应(如,酶反应)的其他材料或物质(如,盐,等)、可以干扰检测过程的其他材料或物质,或者它们的组合。在此类实施例中,基底 119 可被构造成用于吸收和 / 或选择性地集中来自液体 122,或至少来自要检查的液体 122 的空间的一种或多种抑制剂。可通过使包含指示试剂(或其生物衍生物)的水性培养基与基底流动地接触一段时间并分析基底是否存在该试剂(或其生物衍生物)来确定基底接收和集中指示试剂(或其生物衍生物)的情况,如实例 3 所示。

[0080] 例如,在一些实施例中,在接触孢子 115 之前或接触孢子 115 之后,液体 122 中可以存在不止一种指示试剂。在此类实施例中,虽然第一指示试剂(如,用于荧光检测)可以是孢子生存能力检测所必需的,但第二指示试剂(如, pH 指示剂)事实上可以妨碍第一指示试剂的检测。仅以举例的方式,在第二指示试剂为 pH 指示剂(如,下文所述 pH 指示剂中的一者或多者)的实施例中, pH 指示剂可以干扰或妨碍第一指示试剂的荧光读数,例如,在 pH 指示剂发射波长类似于第一指示试剂的荧光光谱带的电磁辐射(如,当 pH 指示剂呈现颜色变化时)的实施例中。在此类实施例中,当被设置为与液体 122 接触时,基底 119 可被构造成(如,由合适的材料形成)吸收和 / 或选择性地集中第二指示试剂,以降低液体 122 中,或至少要检查的液体 122 的空间中的第二指示试剂的浓度。

[0081] 多种不同来源的铬和荧光酶底物可用于检测预定生物活性的方法中,并且适合作为根据本发明的第一或第二指示试剂。其中包括多种荧光 4- 甲基伞形酮基衍生物(可水解成 4- 甲基伞形酮);7- 酰氨基 -4- 甲基 - 香豆素的衍生物,如 GB 专利 No. 1, 547, 747 和欧洲专利 No. 0, 000, 063 中所公开,所述专利全文以引用方式并入本文中;荧光素二乙酸盐衍生物;以及荧光胺。

[0082] 例如,第一指示试剂可以包括具有第一吸收光谱的试剂,因此,它吸收电磁光谱的紫外和 / 或可见波长的光。

[0083] 在一些实施例中,第一指示试剂可以是指示染料(如, pH 指示染料、氧化还原染料)。用于检测任何指定生物活性的具体指示染料将根据本领域已知的标准进行选择,包括,例如,与要检测的生物活性的相容性(如,优选地无抑制性)、溶解度以及检测系统(如,视觉和 / 或自动检测系统)。

[0084] 指示染料可以是适于检测生物活性的 pH 指示剂。可以根据本领域已知的标准选择指示染料,例如, pH 范围、与生物活性的相容性以及溶解度。在一些实施例中,可以使用 pH 指示剂的盐形式,例如,以增大 pH 指示剂在水性混合物中的溶解度。合适的 pH 指示染料的非限制性例子包括,例如,百里酚蓝、金莲橙 00、甲基黄、甲基橙、溴酚蓝、溴甲酚绿、甲基红、溴百里酚蓝、酚红、中性红、酚酞、百里酚酞、茜素黄、金莲橙 0、硝胺、三硝基苯甲酸、百里酚蓝、溴酚蓝、四溴酚蓝、溴甲酚绿、溴甲酚紫、甲基红、溴百里酚蓝、酚红、刚果红和甲酚红。

[0085] 在一些实施例中,指示染料可以是适于检测生物活性的氧化 - 还原指示剂(也称为氧化还原指示剂)。氧化 - 还原指示染料可以是 pH- 因变量或 pH- 自变量。氧化 - 还原指示染料的非限制性例子包括 2, 2' - 联吡啶(钎络合物)、硝基邻菲咯啉(铁络合物)、N- 苯基邻氨基苯甲酸、1, 10- 邻二氮杂菲(铁络合物)、N- 乙氧基菊橙、2, 2' - 联吡啶(铁络合物)、5, 6- 二甲基邻二氮杂菲(铁络合物)、o- 联茴香胺、二苯胺磺酸钠、二苯基联苯胺、二苯胺、紫罗碱、2, 6- 二溴靛酚钠、2, 6- 二氯靛酚钠、邻甲酚靛酚钠、硫堇(劳氏紫)、亚甲蓝、靛蓝四磺酸、靛蓝三磺酸、靛蓝二磺酸、靛蓝一磺酸、酚藏花红、番红花红 T, 以及中性红。

[0086] 在一些实施例中,第一指示试剂可以是磺酰类 pH 指示剂(如,溴甲酚紫),如实例 3 所示。磺酰类 pH 指示剂(如,溴甲酚紫)可以约 0.03g/l 的浓度存在于水性混合物中。磺酰类 pH 指示剂可以被基底接收或集中(如,带电荷尼龙基底,例如, MAGNAPROBE0.45 微米的带电荷尼龙膜,产品编号 NP0HY00010,得自美国明尼苏达州米尼通卡的 GE Osmonics Labstore(GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN))。基底可被构造为大致为平面的条(如,约 3mm× 约 10mm 的条)。

[0087] 第二指示试剂,例如,可转化成第二生物衍生物。第二生物衍生物包含具有第二吸收光谱的试剂。此外,第二生物衍生物具有特有的第二发射光谱(如,荧光发射光谱)。在一些实施例中,第二生物衍生物具有特有的第二吸收光谱,其包括电磁能量光谱的紫外线部分的波长。第二生物衍生物的第二发射光谱可以包括电磁能量光谱的可见光部分中的波长。

[0088] 适合用作第二指示试剂的化合物包括荧光化合物(如,荧光酶底物)。荧光酶底物包括 4- 甲基伞形酮基衍生物、7- 酰氨基-4- 甲基香豆素衍生物和荧光素二乙酸盐衍生物。

[0089] 合适的 4- 甲基伞形酮基衍生物包括,例如:4- 甲基伞形酮基-2- 乙酰氨基-4,6-0- 亚苄基-2- 脱氧- β -D- 吡喃葡萄糖苷;4- 甲基伞形酮基乙酸盐;4- 甲基伞形酮基-N- 乙酰基- β -D- 氨基半乳糖苷;4- 甲基伞形酮基-N- 乙酰基- α -D- 氨基葡萄糖苷;4- 甲基伞形酮基-N- 乙酰基- β -D- 氨基葡萄糖苷;2'-(4- 甲基伞形酮基)- α -D-N- 乙酰基神经氨酸;4- 甲基伞形酮基 α -L- 阿拉伯呋喃糖苷;4- 甲基伞形酮基 α -L- 阿拉伯糖苷;4- 甲基伞形酮基丁酸盐;4- 甲基伞形酮基 β -D- 纤维二糖糖苷;甲基伞形酮基 β -D-N, N' 二乙酰基壳二糖糖苷;4- 甲基伞形酮基反油酸盐;4- 甲基伞形酮基 β -D- 岩藻糖苷;4- 甲基伞形酮基 α -L- 岩藻糖苷;4- 甲基伞形酮基 β -L- 岩藻糖苷;4- 甲基伞形酮基 α -D- 半乳糖苷;4- 甲基伞形酮基 β -D- 半乳糖苷;4- 甲基伞形酮基 α -D- 葡萄糖苷;4- 甲基伞形酮基 β -D- 葡萄糖苷;4- 甲基伞形酮基 β -D- 葡萄糖醛酸苷;4- 甲基伞形酮基对胍基苯甲酸盐;4- 甲基伞形酮基庚酸盐;4- 甲基伞形酮基 α -D- 吡喃甘露糖苷;4- 甲基伞形酮基 β -D- 吡喃甘露糖苷;4- 甲基伞形酮基油酸盐;4- 甲基伞形酮基棕榈酸盐;4- 甲基伞形酮基磷酸盐;4- 甲基伞形酮基丙酸盐;4- 甲基伞形酮基硬脂酸盐;4- 甲基伞形酮基硫酸盐;4- 甲基伞形酮基 β -D-N, N', N''- 三乙酰壳三糖糖苷;4- 甲基伞形酮基 2,3,5- 三-o- 苯甲酰- α -L- 阿拉伯呋喃糖苷;4- 甲基伞形酮基-对三甲基肉桂酸氯化铵;以及 4- 甲基伞形酮基 β -D- 木糖苷。

[0090] 合适的 7- 酰氨基-4- 甲基香豆素衍生物包括,例如:L- 丙氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;L- 脯氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;L- 酪氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;L- 亮氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;L- 苯基丙氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;以及 7- 戊二酰苯基丙氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素。

[0091] 合适的 7- 酰氨基-4- 甲基香豆素的肽衍生物包括,例如:N-t-BOC- 异亮氨酸-谷氨酸-甘氨酸-精氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;N-t-BOC- 亮氨酸-丝氨酸-苏氨酸-精氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;N-CBZ- 苯丙氨酸-精氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基-香豆素;脯氨酸-苯丙氨酸-精氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;N-t-BOC- 缬氨酸-脯氨酸-精氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素;以及 N- 戊二酰-甘氨酸-精氨酸-7- 酰氨基-4- 甲基香豆素。

[0092] 合适的荧光素二乙酸盐衍生物包括,例如,荧光素二乙酸盐、荧光素二-(β -D- 吡

喃半乳糖苷)和荧光素二月桂酸盐。

[0093] 如果要检测的生物活性为如来自嗜热脂肪地芽孢杆菌的 α -D- 葡萄糖苷酶、胰凝乳蛋白酶或脂肪酸酯酶,则优选的荧光酶底物分别为 4- 甲基伞形酮基- α -D- 葡萄糖苷、7- 戊二酰苯基丙氨酸-7- 酰氨基 4 甲基香豆素,或 4- 甲基伞形酮基庚酸盐。如果要检测的生物活性为如衍生自枯草芽孢杆菌的 α -L- 阿拉伯呋喃糖酶,则优选的荧光酶底物为 4- 甲基伞形酮基- α -L- 阿拉伯呋喃糖苷。如果要检测的生物活性为如衍生自枯草芽孢杆菌的 β -D- 葡萄糖苷酶,则优选的荧光酶底物为 4- 甲基伞形酮基- β -D- 葡萄糖苷。

[0094] 为了检测包含酶的生物活性,操作者应了解要检测的酶活性以及将与酶反应以生成可通过其荧光、颜色等检测到的产物的酶底物(参见纽约 Interscience 出版社 1969 年出版、D.Glock 主编的 M.Roth 的《生物化学分析方法》第 7 卷 (M.Roth, Methods of Biochemical Analysis, Vol. 7, D.Glock, Ed., Interscience Publishers, New York, NY, 1969),其全文以引用方式并入本文中)。要使用的合适的酶底物将取决于要检测的生物活性。

[0095] 本发明的方法可以包括具有第一吸收光谱的第一指示试剂和通过生物活性转变成具有第二发射光谱的第二生物衍生物的第二指示试剂,其中第一吸收光谱至少部分地与第二发射光谱重叠。因此,当液体混合物中存在第一指示试剂和第二生物衍生物时,第一指示试剂可以吸收第二指示试剂发射的光的至少一部分,从而削弱了检测第二生物衍生物的能力。

[0096] 坐标图可以示出根据本发明的第一指示试剂和第二生物衍生物之间的关系。图 8 示出了示例性第一指示试剂溴甲酚紫(下文中称为“BCP”)的吸收光谱以及示例性第二指示试剂 4- 甲基伞形酮基 β -D- 葡萄糖苷的可能的生物衍生物 4- 甲基伞形酮(下文中称为“4MU”)的荧光发射光谱。如实例 7 和 8 所述获得光谱。

[0097] 线“A”示出了 BCP 的吸收光谱,其显示在约 600nm 处具有可见光范围内最大吸光度,在 425-550nm 波长范围内 BCP 的吸光度相对较低。数据显示可见光波长吸收峰在大约 600nm 处,紫外线波长吸收峰在 <330nm 处。线“B”示出了 4MU 的荧光发射光谱,其显示发射最大值位于约 450nm 处,375-425nm 和 475-525nm 范围内的发射值相对较低。从图 8 中可以看到,BCP 的吸收光谱与 4MU 的整个荧光发射峰(以约 450nm 为中心)基本上重叠。

[0098] 相关领域的普通技术人员将会认识到,包含第一指示试剂的溶液所吸收的任何特定波长的光的量将会受到溶液中的第一指示试剂的浓度和选定波长处指示试剂的摩尔消光系数的影响。技术人员还将认识到,包含第二指示试剂的生物衍生物的溶液所发射的任何特定波长的光的量将受会到溶液中第二生物衍生物的浓度和生物衍生物的荧光量子产率的影响。因此,可以结合合适的基底选择液体混合物中的第一指示试剂的浓度,以使得 i) 该基底从液体混合物中移除足够的第一指示底物,从而允许更灵敏地检测第二生物衍生物,以及 ii) 易于在基底材料上检测到第一指示试剂(或其生物衍生物)。

[0099] 溴甲酚紫和 4- 甲基伞形酮基- β -D- 葡萄糖苷的组合分别代表根据本发明的合适的第一和第二指示试剂的例子。例如,该组合可用于检测第一生物活性,例如碳水化合物发酵成酸最终产物,以及第二生物活性,例如- β -D- 葡萄糖苷酶活性。例如,这些活性可以表明在生物灭菌指示器暴露于灭菌处理后是否存在活的孢子。例如,溴甲酚紫在水性混合物中的使用浓度可以为约 0.03g/L。4- 甲基伞形酮基- β -D- 葡萄糖苷在水性混合物中的使用浓

度可以为,例如,约 0.05 至约 0.5g/L(如,约 0.05g/L、约 0.06g/L、约 0.07g/L、约 0.08g/L、约 0.09g/L、约 0.1g/L、约 0.15g/L、约 0.2g/L、约 0.25g/L、约 0.3g/L、约 0.35g/L、约 0.4g/L、约 0.45g/L、约 0.5g/L)。

[0100] 因此,根据本发明,第一指示试剂可以妨碍第二指示试剂的生物衍生物的另外可检测量的检测。本领域的普通技术人员通过进行以下简单实验可以证明任何建议的第一和第二指示试剂之间的光谱干扰。

[0101] 首先,操作者制备相对稀释、但可进行荧光检测的建议第二指示试剂的预期生物衍生物的水溶液。例如,如果第二指示试剂为 4- 甲基伞形酮基化合物,则预期的生物衍生物为 4MU。该溶液可以包含,例如,约 0.05 至 0.2 微克 / 毫升 4MU。然后,操作者加入有效量的建议第一指示试剂。例如,如果 BCP 为建议的第一指示试剂,它的添加浓度可以为在用于检测发酵微生物的微生物生长培养基中的使用浓度(如,0.04 毫克 / 毫升)。通过对有和没有 BCP 的 4MU 溶液的荧光进行比较,可以确定第一指示试剂(在该例子中,为 BCP)是否会妨碍第二指示试剂(在这种情况下,为 4MU)的生物衍生物的检测。然后操作者可以测试减少加入 4MU 溶液中的 BCP 量是否能改善相对较低浓度的 4MU 的检测。用第一和第二指示试剂的任何组合可以容易地进行此类实验。实例 9 示出了该工序的例子。

[0102] 另外,在一些实施例中(如,在壁 118 是倾斜的并且基底 119 的位置邻近壁 118 的实施例中),基底 119 可以是成角度的或倾斜的,例如,相对于壳体 102 的纵向 D_L 以非零度和非直角的角度取向。基底 119 这样成角度或倾斜可以有利于在灭菌之后和在容器 120 已被打破以释放液体 122 后,液体 122 从第一室 109 向第二室 111 移动。

[0103] 在一些实施例中,基底 119 可以由多种材料形成,以实现上述功能中的一者或多者。基底材料的例子可以包括(但不限于)棉、玻璃绒、布、非织造聚丙烯、非织造人造丝、非织造聚丙烯 / 人造丝共混物、非织造尼龙、非织造玻璃纤维或其他非织造纤维、滤纸、微孔疏水性和亲水性膜、玻璃纤维、开孔聚合物泡沫和半渗透塑料膜(如,颗粒填充膜、热致相分离 (TIPS) 膜等),以及它们的组合。例如,在基底 119 可用于选择性地集中不止一种指示试剂(如,溴甲酚紫 (BCP)) 的实施例中,基底 119 可以由带电荷尼龙(例如以商品名“MAGNAPROBE”得自宾夕法尼亚州特莱沃斯的 GE 水处理技术公司 (Water&Process Technologies, Trevose, PA) 的重探测、带电荷的转移膜(如,0.45 微米孔径、30cm×3m 卷,目录编号 NPOHY00010,材料编号 1226566))。

[0104] 可以使用基底 119 的方法和系统的实例还在名称为“Method of Detecting a Biological Activity”(检测生物活性的方法)的共同待审的美国专利申请 No. 61/408,887 和名称为“Method of Detecting a Biological Activity”(检测生物活性的方法)的美国专利申请 No. 61/408,966 中有所描述,所述专利全文以引用方式并入本文中。

[0105] 在一些实施例中,嵌件 130、壁 118 和 / 或基底 119 或其中的开口中的一者或多者的至少一部分可以提供第一室 109 (如,上部分 116 中)与第二室 111 (如,下部分 114 中)之间的流体连通,和 / 或可以(如,通过控制第一室 109 与第二室 111 之间的流体连接程度)控制第一室 109 与第二室 111 之间的流体连通。

[0106] 生物灭菌指示器 100 可以包括第一流体路径 160,其可被设置为使第一室 109 与第二室 111 流体连接,并且它可以允许灭菌剂(如,在灭菌期间,当容器 120 处于未破碎的第一状态时)和 / 或液体 122 (如,在灭菌之后和激活期间,当容器 120 处于破碎的第二状态时)

到达孢子 115。在图示实施例中,第一流体路径 160 通常可被下列中的一者或多者限定:(1) 嵌件 130,如,经由下文所述的孔口 177,在嵌件 130 中形成的开口,和/或嵌件 130 附近的任何开放空间,例如嵌件 130 (如,它的前部)与壳体 102 之间;(2) 壁 118,如,壁 118 限定的孔口 117;(3) 基底 119,如,其中形成的孔口 121,或基底 119 附近的任何开放空间,例如基底 119 (如,它的前部)与壳体 102 之间;(4) 壳体 102,如,其中形成的任何开口或空间;以及它们的组合。因此,在图 4 和 7 的图示实施例中用箭头大致示出了第一流体路径 160。

[0107] 生物灭菌指示器 100 还可以包括第二流体路径 162,其被设置为使第二室 111 与另一个室或生物灭菌指示器 100 的一部分(如第一室 109)流体连接。例如,当灭菌剂和/或液体 122 移入第二室 111 中时,第二流体路径 162 还可被设置为允许此前存在于第二室 111 中的气体被替换并离开第二室 111。因此,如下文所详述,第二流体路径 162 可以用作生物灭菌指示器 100 中的内部排放口。

[0108] 在一些实施例中,基底 119 可以提供第一室 109 与第二室 111 之间的物理阻挡件或阻塞件,其可以允许执行以下功能的至少一者:控制向第二室 111 中递送灭菌剂的灭菌剂递送速率/杀伤率;控制孢子 115 和/或可检测产物向第二室 111 外的扩散;当容器 120 处于破碎的第二状态时,控制液体 122 向第二室 111 (和向孢子 115)的递送速率;或它们的组合。

[0109] 因为,在一些实施例中,基底 119 可以在激活期间(即,当容器 120 处于第二状态时)提供向第二室 111 递送液体 122 的物理阻挡件,所以可以通过控制基底 119 中的孔口 121 和/或基底 119 的角度实现所需的液体递送速率。另外,或作为选择,第二流体路径 162 可以提供滞留在第二室 111 中的任何气体或空气的排放口,以便在需要时有利于液体 122 通过或穿过基底 119 并移动到第二室 111 中。

[0110] 另外,或作为选择,壳体 102 可被构造成(如,由合适的材料形成和/或构造有微结构化凹槽或其他物理表面修改形式)在需要时有利于液体 122 向第二室 111 移动。例如,如以下实例 2 所示,一些基底材料能够更有效地帮助液体 122 向第二室 111 中移动,可以用实例 2 中所述的轻摇测试进行测试。仅以举例的方式,在一些实施例中,与由纸(例如厄特曼纸,如 1 级 Chr 纤维素层析纸,得自新泽西州皮斯卡塔韦的美国厄特曼有限公司(Whatman Inc. USA, Piscataway, NJ))形成的基底 119 相比,由带电荷尼龙(例如上文所述的 MAGNAPROBE 尼龙,得自 GE 水处理技术公司(GE Water&Process Technologies))形成的基底 119 能够在容器 120 破碎后更有效地向第二室 111 递送液体 122。具体地讲,带电荷尼龙能够在没有额外帮助(如,不需要朝下摇动或“轻摇”生物灭菌指示器 100)的情况下更有效地使液体 122 向第二室 111 中移动。

[0111] 在一些实施例中,液体 122 可以包括用于孢子的营养培养基,例如将促进活孢子萌芽的萌发培养基。在一些实施例中,液体 122 可以包括水(或另一种溶剂),其可与营养物质混合而形成营养培养基。合适的营养物可包括促进存活的孢子的萌发和/或生长所必需的营养物,且可以以干燥形式(例如粉末形式、片剂形式、胶囊形片剂形式、胶囊形式、薄膜或涂层、包埋在小珠或其他载体中、另一合适的形状或构造或者它们的组合)提供在贮存室 103 中,例如在生物灭菌指示器 100 的靠近孢子 115 的区域中。

[0112] 营养培养基通常被选择成可引发孢子(如果是活的)的萌芽和初始生长。营养培养基可以包括一种或多种糖,包括(但不限于)葡萄糖、果糖、纤维二糖等,或者它们的组合。营

养培养基还可以包括盐,包括(但不限于)氯化钾、氯化钙等,或者它们的组合。在一些实施例中,营养物质还可以包括至少一种氨基酸,包括(但不限于)甲硫氨酸、苯基丙氨酸和色氨酸中的至少一种。

[0113] 在一些实施例中,营养培养基可以包含指示分子或试剂,例如具有随孢子的萌发或生长而变化的光学性质的指示分子。合适的指示分子或试剂可以包括(但不限于)pH 指示分子(如,实例中所示的溴甲酚紫 (BCP)、溴甲酚绿 (BCG)、氯酚红 (CPR)、溴百里酚蓝 (BTB)、溴酚蓝 (BPB)、其他磺酞染料、甲基红或它们的组合)、酶底物(如,4- 甲基伞形酮基 - α -D- 葡萄糖苷)、DNA 结合染料、RNA 结合染料、其他合适的指示分子,或它们的组合。在一些实施例中,溴甲酚紫和 4- 甲基伞形酮基 - α -D- 葡萄糖苷的组合代表可以一起使用的一对指示试剂的例子。例如,该组合可用于检测第一生物活性,如碳水化合物发酵成酸最终产物,以及第二生物活性,如 α -D- 葡萄糖苷酶活性。例如,这些活性可以表明在生物灭菌指示器暴露于灭菌处理之后是否存在活的孢子。溴甲酚紫在例如水性混合物中的使用浓度可以为约 0.03g/L。4- 甲基伞形酮基 - α -D- 葡萄糖苷在例如水性混合物中的使用浓度可以为,例如,约 0.05 至约 0.5g/L(如,约 0.05g/L、约 0.06g/L、约 0.07g/L、约 0.08g/L、约 0.09g/L、约 0.1g/L、约 0.15g/L、约 0.2g/L、约 0.25g/L、约 0.3g/L、约 0.35g/L、约 0.4g/L、约 0.45g/L、约 0.5g/L)。

[0114] 如图 1-7 中所示,生物灭菌指示器 100 还可包括嵌件 130。在一些实施例中,嵌件 130 适于保持或负载容器 120,使得容器 120 在灭菌过程中被完好保持在与孢子 115 分开的某个位置。即,在一些实施例中,嵌件 130 可包括(或者充当)容器 120 的承载件 132(参见图 3),特别是在容器 120 在激活步骤(即液体 122 从容器 120 中释放出来并被引入到孢子 115 的步骤,通常在灭菌处理之后发生)中被打破之前。在一些实施例中,嵌件 130 还适于让容器 120 至少一定程度地在壳体 102 中移动,例如相对于壳体 102 纵向移动。下文详细描述了图示实施例的嵌件 130。其他合适的嵌件和承载件的例子在共同待审的美国专利申请 No. 61/226,937(代理人案卷号 65578US002)中有所描述。

[0115] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 还可以包括孢子载体 135,如图 1-4 和 6 所示。然而,在一些实施例中,可以修改嵌件 130,使其包括适于容纳孢子 115 的部分。例如,在一些实施例中,嵌件 130 和孢子载体 135 可整体地形成一个嵌件,其包括适于在需要时保持和最后弄破容器 120 的第一部分,以及适于在灭菌期间(即破碎之前)将孢子 115 容纳在生物灭菌指示器 100 中与容器 120 分开的区域中的第二部分。

[0116] 如图 1-4 和 6 所示,孢子载体 135 可以包括孢子贮存室 136(其还可以称为凹陷、凹坑、孔、凹口等),可以将孢子 115 直接布置在贮存室中,或布置在基底上。在采用被设置在液体 122 从容器 120 中释放出来时与该液体进行混合的营养培养基的实施例中,营养培养基可被设置在孢子贮存室 136 附近或当中,且当水从容器 120 中释放出来时营养培养基可与水进行混合(例如溶于水中)。仅以举例方式来说,在其中营养培养基以干燥形式提供的实施例中,该干燥形式可存在于贮存室 103 内、孢子贮存室 136 内、孢子的基底上或者它们的组合。在一些实施例中,可以采用液体和干燥营养培养基的混合。

[0117] 在一些实施例中,孢子贮存室 136 的体积为至少约 1 微升,在一些实施例中,为至少约 5 微升,而在一些实施例中,为至少约 10 微升。在一些实施例中,孢子贮存室 136 的体积不大于约 250 微升,在一些实施例中,不大于约 175 微升,而在一些实施例中,不大于约

100 微升。

[0118] 如图 4 和 6 所示, 在一些实施例中, 生物灭菌指示器 100 还可以包括可联接到壳体 102 的壁 108 上或与壁 108 整体地形成的肋或突起 165, 其可被设置为将孢子载体 135 保持在壳体 102 中的所需位置和 / 或例如相对于读取设备 12 的检测系统(如, 光学检测系统)保持所需的角或取向。

[0119] 如图 1-4 和 6 所示, 壳体 102 的第二部分 106 适于联接到第一部分 104 上。例如, 如图中所示, 第二部分 106 可适于联接到壳体 102 的第一部分 104 的上部分 116 (如, 第一末端 101)上。在一些实施例中, 如图 1-4 中所示, 第二部分 106 可为盖件的形式, 该盖件其尺寸被确定成使其能接纳壳体 102 的第一部分 104 的至少一部分。

[0120] 如图 1-2 和 4-5 所示, 在灭菌期间和激活之前, 第二部分 106 可相对于第一部分 104 位于第一“未激活”位置 148, 并且容器 120 可处于未受损的第一状态。如图 6 所示, 壳体 102 的第二部分 106 可相对于第一部分 104 移动至第二“激活”位置 150 (如, 第二部分 106 被完全压下的位置), 并且容器 120 可处于破碎的第二状态。例如, 灭菌之后, 可以通过以下方式激活生物灭菌指示器 100: 将第二部分 106 从第一位置 148 移动至第二位置 150 (即, 足够的量), 使容器 120 破碎并从容器 120 释放液体 122, 以允许液体 122 与孢子 115 流体连通。可以在将生物灭菌指示器 100 设置在读取设备的孔中之前, 将生物灭菌指示器 100 设置在孔中之后或在将生物灭菌指示器 100 设置在孔中时(即, 生物灭菌指示器 100 可滑动到读取设备的合适位置处, 并且可以继续压迫第二部分 106, 直到它位于第二位置 150, 如, 在该位置时, 孔的底部为第二部分 106 向第二位置 150 移动提供足够的阻力)激活生物灭菌指示器 100。第二位置 150 可以比第一位置 148 更靠近生物灭菌指示器 100 的第一部分 104 的封闭端 105。

[0121] 如图示实施例所示, 在一些实施例中, 壳体 102 的第一部分 104 可以包括梯部、悬垂部分或平面向圆形的过渡 152。示出的梯部 152 在第二部分 106 位于其第一位置 148 时是暴露的, 在第二部分 106 位于其第二位置 150 时是被掩盖或覆盖的。因此, 可以通过检查梯部 152 确定第二部分 106 是位于第一位置 148 (即, 生物灭菌指示器 100 未激活)还是第二位置 150 (即, 生物灭菌指示器 100 被激活)。共同待审的美国专利申请 No. 61/409, 042 中详细描述了使用生物灭菌指示器 100 的此类特征确定生物灭菌指示器 100 的状态, 例如, 确认生物灭菌指示器 100 是否已激活。仅以举例的方式示出了梯部 152 的纵向位置; 然而, 应当理解, 梯部 152 可改为位于不同的纵向位置(如, 更靠近生物灭菌指示器 100 的封闭端 105), 或者, 在一些实施例中, 从圆形部分向平坦表面的过渡可以是逐渐的、渐缩的或倾斜的。

[0122] 在壳体 102 的第一部分 104 和第二部分 106 之间可采用多种联接方式, 以让第一部分 104 和第二部分 106 可移除地互相联接在一起, 所述手段包括但不限于重力(例如一个部件可被设置在另一部件或其配合部分的顶上)、螺纹、压装配合式接合(有时也称“摩擦配合式接合”或“干涉配合式接合”)、按扣配合式接合、磁铁、粘合剂、热密封、其他合适的可移除的联接方式以及它们的组合。在一些实施例中, 生物灭菌指示器 100 不需要重新打开, 第一部分 104 和第二部分 106 不需要可移除地互相联接在一起, 而是可永久性或非永久性互相联接在一起。这些永久性或非永久性联接方式可以包括(但不限于)粘接剂、缝线、缝钉、螺钉、钉子、铆钉、平头钉、卷边、焊接(如声波(如超声波)焊接)、任何热粘结技术(例如, 向

被连接的一个或两个部件施加热量和 / 或压力)、搭扣配合、压力配合、热密封、其他合适的永久性或非永久性联接方式以及它们的组合。本领域的普通技术人员将会知道,某些永久性或非永久性联接方式也适于被拆除,反之亦然,并且仅仅是为了举例说明才按这种方式分类。

[0123] 如图 4 和 6 所示,第二部分 106 可在相对于第一部分 104 的第一纵向位置 148 与相对于第一部分 104 的第二纵向位置 150 之间移动;然而,应当理解,生物灭菌指示器 100 可改为进行不同的配置,使得第一位置 148 和第二位置 150 相对于壳体 102 的第一部分 104 和第二部分 106 中的一者或两者不一定为纵向位置。

[0124] 第二部分 106 还可以包括密封件 156 (如,突出、突起、翼、凸缘、O 形环等或者它们的组合),该密封件可被设置成接触第一部分 104 的第一末端 101,具体地讲,接触第一部分 104 的开放上端 157,从而在第二部分 106 移动到第二位置 150 并且液体 122 已从容器 120 中释放出来(即,当容器 120 处于破碎的第二状态时)之后封闭或密封(如,气密地密封)生物灭菌指示器 100。即,当容器 120 处于第二状态时,孢子 115 可以与外界隔离。密封件 156 可呈多种形式,在图 4 和 6 中以举例的方式显示为形成内环或腔体,该内环或腔体与第二部分 106 的壁 110 一起其尺寸被确定成使其能接纳壳体 102 的第一部分 104 的上端 157 以封住生物灭菌指示器 100。

[0125] 在一些实施例中,密封件 156 和上端 157 中的一者或两者还可包括被构造成分别接合上端 157 和密封件 156 中的另一者的结构(例如突起),以使壳体 102 的第二部分 106 联接到壳体 102 的第一部分 104。

[0126] 另外,在一些实施例中,可将壳体 102 的第二部分 106 联接到壳体 102 的第一部分 104,以便在激活后使生物灭菌指示器 100 与外界隔离。这种密封可防止液体 122 在从容器 120 中释放出来后受污染、蒸发或泄漏,和 / 或可防止生物灭菌指示器 100 的内部受污染。

[0127] 密封件 156 可被构造成具有方向沿着生物灭菌指示器 100 的纵向 D_L 的长度,以适应不同的封闭程度或水平。即,在一些实施例中,壳体 102 的第二部分 106 的“第二位置”150 可以为满足以下条件的任何位置:密封件 156 的至少一部分接合壳体 102 的第一部分 104 的一部分(如,上端 157),使得生物灭菌指示器 100 的内部与外界隔离。生物灭菌指示器 100 和生物灭菌指示器系统 10 可以相应地被构造成使得如果读取设备 12 检测到第二部分 106 已移至第二位置 150,则使用者知道密封件 156 已接合。

[0128] 现在将对嵌件 130 进行更详细的描述。

[0129] 如图 1-2 和 4 所示,在灭菌期间和在激活之前,第二部分 106 可相对于第一部分 104 处于第一位置 148。在第一位置 148,容器 120 可被完好保持在与下部分 114、第二室 111 或孢子 115 分开的位置,液体 122 可被包含在容器 120 内。

[0130] 如图 6 所示,在灭菌之后,生物灭菌指示器 100 可被激活以从容器 120 释放出液体 122,从而使液体 122 移动到第二室 111。也即,壳体 102 的第二部分 106 可相对于第一部分 104 移动到第二位置 150。当第二部分 106 从第一位置 148 移动到第二位置 150 时,壳体 102 的第二部分 106 的密封件 156 可以接合第一部分 104 的上端 157,以密封生物灭菌指示器 100 的贮存室 103,使其与外界隔离。在这种实施例中,第二部分 106 可以在第二位置 150 可逆地接合第一部分 104,而在一些实施例中,第二部分 106 可以不可逆地接合第一部分 104。然而,应当理解,第一部分 104 和第二部分 106 的结构和联接方式在图示实施例

中仅以举例方式示出,且任何上述联接方式可改为在壳体 102 的第一部分 104 和第二部分 106 之间采用。

[0131] 嵌件 130 适于保持或承载容器 120,使得容器 120 在灭菌过程中被完好保持在与孢子 115 分开的某个位置。即,如上所述,在一些实施例中,嵌件 130 可以包括(或者充当)容器 120 的承载件 132,特别是在容器 120 在激活步骤(即其中液体 122 从容器 120 中释放出来并被引入到孢子 115 的步骤,通常在灭菌处理之后发生)中被打破之前。

[0132] 另外,嵌件 130 适于将容器 120 完好保持在壳体 102 中的某个位置,该位置能维持容器 120 和壳体 102 之间和 / 或容器 120 和壳体 102 中的任何其他部件或结构(例如嵌件 130 的至少一部分,如承载件 132 等)之间的至少最低限度的间距(例如它们之间的空间的最低限度的横截面积),例如以在生物灭菌指示器 100 中维持基本上恒定的灭菌剂路径 164。在一些实施例中,嵌件 130 适于将容器 120 保持在壳体 102 中基本上一致的位置。

[0133] 在一些实施例中,如图 3 中所示,壳体 102 的至少一部分可包括锥形部分 146,其中壳体 102 (例如壁 108 或其内表面)通常在壳体 102 的纵向 D_L 逐渐变细。因此,壳体 102 的横截面积通常会沿着纵向 D_L 减小。

[0134] 在一些情况中,如不提供维持容器 120 周围(例如容器 120 和周围结构之间)的至少最低限度的间距的手段,则有可能容器 120 会变成在壳体 102 中(例如在锥形部分 146 中)被设置成导致它阻塞或堵住灭菌剂路径 164。但是,本发明的生物灭菌指示器 100 被设计成能防止发生这种情况。例如,在图示实施例中,嵌件 130 (特别是承载件 132)可被构造成将容器 120 保持在壳体 102 的锥形部分 146 之外,使得在激活之前在生物灭菌指示器 100 呈任何取向的情况下在容器 120 周围都保持至少最小的横截面积。例如,在图 1-5 中所示的实施例中,尽管生物灭菌指示器 100 被翻倒过来,容器 120 可能倒落而与嵌件 130 脱离接触,但在任何取向,直到生物灭菌指示器 100 被激活之前容器 120 都不会移动成更靠近锥形部分 146 或孢子 115。另外,直到激活之前,可保持容器 120 与壳体 102 和 / 或嵌件 130 之间的最低限度的间距(特别是此间距的横截面积),以提供基本上恒定的灭菌剂路径 164,例如在容器 120 周围,穿过第一流体路径 160 并进入第二室 111 的路径。

[0135] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 的各部件其相对大小和位置可被构造成使得在激活之前,容器 120 被完好保持在生物灭菌指示器 100 中基本上一致的位置。这种构造可提供基本上恒定的灭菌剂路径 164,并可将容器 120 维持在这么一个位置,在该位置,容器 120 即使在生物灭菌指示器 100 激活之前会在其中移动的话,也不能够充分移动。

[0136] 在一些实施例中,嵌件 130 的至少一部分适于允许容器 120 在壳体 102 中移动,如,相对于壳体 102 在容器 120 完好的第一(纵向)位置与容器 120 的至少一部分破碎的第二(纵向)位置之间纵向移动。仅以举例的方式,嵌件 130 可包括一个或多个突出或臂 158 (仅以举例方式示出了在容器 120 周围间隔开的两个突出 158),所述突出适于在激活之前保持和支撑容器 120 并适于在激活期间允许容器 120 在壳体 102 中移动,例如当第二部分 106 相对于壳体 102 的第一部分 104 移动时。突出 158 还适于(如,成形为和 / 或设置为)在生物灭菌指示器被激活时使容器 120 以所需方式破碎。因此,嵌件 130 有时可用于在激活前使容器 120 保持完好,并可以在激活期间用于打破容器 120。因此,嵌件 130 或它的一部分有时可以称为“承载件”(如,承载件 132)和 / 或“破坏件”。

[0137] 仅以举例的方式,突出 158 在图 1 和 3-7 中被显示为联接到适于邻接分隔壁 118

的基座或支撑件 127 上。例如,基座 127 的尺寸可被设计为使其被接纳在贮存室 103 中,且其尺寸被设计为使其能居于分隔壁 118 的顶上、邻接分隔壁 118 或者以别的方式配合或联接到分隔壁 118 上。与生物灭菌指示器 100 的内部结构的此类联接可以在需要时提供打破容器 120 的必要阻力和力。但是,在一些实施例中,嵌件 130 不包括基座 127,且突出 158 可联接到或形成壳体 102 的一部分。在一些实施例中,嵌件 130 与壳体 102 整体成形或由壳体 102 提供。

[0138] 如图所示,嵌件 130 还可以包括侧壁 131,其连接突出 158 并被成形为适形于壳体 102 的内表面和 / 或容器 120 的外表面。此类侧壁 131 可为突出 158 提供支撑和刚度,有助于以一致的方式牢靠地打破容器 120。侧壁 131 还可被成形为和尺寸被设计为在激活期间当容器 120 在壳体 102 中移动时以所需的方式引导容器 120,例如以所需的方式接触突出 158,以牢靠地破碎容器 120。侧壁 131 和 / 或壳体 102 的壁 108 (或它的内表面)还可被成形用于将生物灭菌指示器 100 的第二流体路径 162 的至少一部分限定在,例如,嵌件 130 的外表面和壳体 102 的内表面之间。例如,在一些实施例中,如图 1-2、5 和 7 所示,嵌件 130 的侧壁 131 可以包括被构造形成第二流体路径 162 的至少一部分的通道(或凹槽、凹口等) 169。

[0139] 第二流体路径 162 可以用作生物灭菌指示器 100 内的“内部排放口”或“排放通道”,其允许气体(如,被替换的气体,例如原先滞留在第二室 111(如,生物灭菌指示器 100 的封闭端 105 附近)中的空气)逸出生物灭菌指示器 100 的第二室 111。在一些实施例中,第二流体路径 162 可以在激活期间为存在于第二室 111 中的气体提供逸出或内部排放通道,以有利于液体 122 在从容器 120 中被释放出来时从第一室 109 移动到第二室 111 中。另外或作为选择,在一些实施例中,第二流体路径 162 可以在灭菌期间为存在于第二室 111 中的气体提供逸出或内部排放通道,以有利于灭菌剂移动到生物灭菌指示器 100 的第二室 111 中并移动至孢子 115,从而使灭菌剂更有效地渗透到第二室 111 中。

[0140] 仅以举例的方式,如图 2 和 7 所示,第二流体路径 162 可至少部分地被嵌件 130 的一部分(如,通道 169)和壳体 102 的壁 108 中(如,壁 108 的内表面中)形成的通道(或凹槽、凹口等)163 两者限定。然而,应当理解,在一些实施例中,第二流体路径 162 可完全由壳体 102 形成或由生物灭菌指示器 100 的其他组件的多种组合形成,使得第二流体路径 162 提供第二室 111 与生物灭菌指示器 100 的另一个内部部分或区域之间的流体连接。例如,第二流体路径 162 不一定由壳体 102 和嵌件 130 两者形成,而是可以由这些组件中的一者或其他组件形成。另外,如图 2 和 7 所示,限定第二流体路径 162 的至少一部分的通道 163 被模制在壳体 102 的外表面和内表面中,使得通道 163 在壳体 102 的内部和外部都可见。然而,壳体 102 的外表面不一定包括此类形状,相反,在一些实施例中,壳体 102 的外表面可以保持基本上相同或不变,而壳体 102 的内表面(如,壳体 102 的壁 108)可以包括通道 163。

[0141] 此外,在一些实施例中,嵌件 130 和壳体 102 都不包括各自的通道 169 或通道 163,相反,嵌件 130 和壳体 102 的形状和尺寸被设计为使得嵌件 130 与壳体 102 之间具有与第二室 111 流体连通的空间或间隙,并且此类空间或间隙用作第二流体路径 162。

[0142] 还如图 4 和 6 所示,在一些实施例中,第一流体路径 160 和 / 或第二流体路径 162 可以至少部分地被壁 118、基底 119、嵌件 130 和壳体 102 中的一者或多者限定。另外,第一流体路径 160 和第二流体路径 162 中的至少一者可以至少部分地被孢子载体 135 或它的一

部分限定。

[0143] 在一些实施例中,当容器 120 处于未破碎的第一状态时,生物灭菌指示器 100 可以包括按以下顺序布置的下列组件:生物灭菌指示器 100 的壳体 102 的封闭端 105,第二室 111,基底 119,嵌件 130,第一室 109,容器 120,壳体 102 的开口端 101 (或壳体 102 的第二部分 106)。

[0144] 如图示实施例所示,第二流体路径 162 可允许第二室 111 中的流体排放至生物灭菌指示器 100 的另一个部分,如第一室 109。在一些实施例中,第二流体路径 162 可以在第一流体路径 160 进入第二室 111 的位置上方(如,垂直上方)的位置处离开第二室 111,特别是在通过第二流体路径 162 将第二室 111 中的流体排放回第一室 109 的实施例中。换言之讲,在一些实施例中,第二流体路径 162 可以从第二室 111 延伸至生物灭菌指示器 100 中的某个位置(如,下文所述的第四水平 L_4),该位置在第一流体路径 160 进入第二室 111 的位置(如,下文所述的第一水平 L_1 或第二水平 L_2)的上方。此外,在一些实施例中,第二流体路径 162 进入第一室 109 的位置可位于第一流体路径 160 进入第二室 111 的位置上方(如,垂直上方)。

[0145] 在一些实施例中,可将第一流体路径 160 设置为使第二室 111 与生物灭菌指示器 100 的近端部分(如,位置接近或邻近第二室 111 的第一室 109 的一部分,如第一水平 L_1 和 / 或第二水平 L_2 处)流体连接,并可将第二流体路径 162 设置为使第二室 111 与生物灭菌指示器 100 的远端部分(即,位置远离第二室 111 的第一室 109 的一部分,如下文所述的第三水平 L_3 处和 / 或第四水平 L_4 处)流体连接。因此,第二流体路径 162 进入第一室 109 的位置可被设置为比第一流体路径 160 进入第二室 111 的位置更远离第二室 111。

[0146] 更具体地讲并仅以举例的方式,参照图 4 和 6,在一些实施例中,流体可以从多个位置处进入第二室 111,如大致位于嵌件 130、基底 119、壳体 102 和 / 或第二室 111 前面的第一水平、高度或位置(如,纵向位置) L_1 处,以及位于大约基底 119 中的孔口 121 的水平处的第二水平、高度或位置(如,纵向位置) L_2 处。如上所述,应当理解,第一室 109 与第二室 111 之间允许流体移入第二室 111 的各种开口和空间可以统称为第一流体路径 160。还如图 4 所示,在一些实施例中,气体(如,被替换的气体)可以在大致位于嵌件 130、基底 119、壳体 102 和 / 或第二室 111 后面的第三水平、高度或位置(如,纵向位置) L_3 处经由第二流体路径 162 离开第二室 111 (即,当流体经由第一流体路径 160 移入第二室 111 时)。

[0147] 在图 4 和 6 中所示的生物灭菌指示器 100 的垂直向上方向,第三水平 L_3 位于第一水平 L_1 和第二水平 L_2 处或两者的上方。另外,在一些实施例中,在生物灭菌指示器 100 工作时(如,在灭菌期间和 / 或激活期间居于读取设备的孔中时),第三水平 L_3 仍可以位于第一水平 L_1 和第二水平 L_2 处或两者的上方。即,在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可以在工作时倾斜(如,朝向图 4 或 6 的左手侧,朝向图 4 或 6 的右手侧,进入图 4 或 6 的页面,和 / 或离开图 4 或 6 的页面)。

[0148] 第一水平 L_1 、第二水平 L_2 和第三水平 L_3 仅以举例的方式示出;然而,应当理解,第一流体路径 160 进入第二室 111 的精确位置和 / 或第二流体路径 162 离开第二室 111 的精确位置可以与图 4 和 6 中所示的位置不同。

[0149] 如图 4 和 6 所示,第二流体路径 162 至少部分地被嵌件 130 的通道 169 和 / 或壳体 102 的通道 163 限定,在下文中通常将其简单地称为“通道”,可以将其解释为是指图示实

施例的通道 163 和 / 或通道 169 的至少一部分。在图示实施例中,通道具有入口和出口,可将入口描述为位于第二室 111 中的任何点处,或第三水平 L_3 处,出口通常设置在第四水平、高度或位置(如,纵向位置) L_4 处。如图 4 和 6 所示,例如,生物灭菌指示器 100 工作时,通道的出口位置(即,第四水平 L_4)通常位于第一流体路径 160 与第二室 111 连接的位置(即,第一水平 L_1 和 / 或第二水平 L_2) 上方。

[0150] 换句话说讲,可将第一流体路径 160 设置为使第一室 109 的第二(下)端 113 与第二室 111 的第一(上)端 124 流体连接。另一方面,可将第二流体路径 162 设置为使第二室 111 (如,第二室 111 的第一(上)端 124) 与第一室 109 的上部分(如,第一(上)端 112) 流体连接。

[0151] 此外,在一些实施例中,可将第二流体路径 162 (或通道) 与第二室 111 连接的位置或水平描述为位于当容器 120 处于破碎的第二状态时第二室 111 中最后充满液体 122 的位置处。

[0152] 在一些实施例中,当容器 120 处于破碎的第二状态,并且第二室 111 至少部分地充满液体 122 时,液体 122 可以具有水平、高度或位置(如,纵向位置) L ,并且第二流体路径 162 可以在低于水平 L 的位置与高于水平 L 的位置之间延伸。因此,当第二室 111 在容器处于第二状态时充满液体 122 的时候,第二室 111 可以通过第二流体路径 162 进行连续排放。

[0153] 在一些实施例中,第一流体路径 160 可用作第一室 109 与第二室 111 之间的主要或首要流体连通路径,并且第二流体路径 162 可用作第一室 109 与第二室 111 之间的辅助或次要流体连通路径(如,当第二流体路径 162 从第一室 109 离开,而不是从生物灭菌指示器 100 的另一部分离开时)。在此类实施例中,第二流体路径 162 的集合空间、体积和 / 或面积可以显著小于第一流体路径 160 的集合空间、体积和 / 或面积。在一些实施例中,可将第一流体路径 160 和第二流体路径 162 的至少一部分描述为基本上彼此隔离或基本上平行和不相交。在一些实施例中,第一流体路径 160 和第二流体路径 162 可以在第一室 109 与第二室 111 之间各自基本上纵向(如,基本上平行于纵向 D_L) 延伸。

[0154] 即,一般来讲,与只包括任一内部室或只包括一个连接第一室 109 和第二室 111 的流体路径的生物灭菌指示器 100 相比,包括 (1) 第一流体路径,如第一流体路径 160,其被构造适应从第一室 109 至第二室 111 的至少大部分流体运动,以及 (2) 第二流体路径,如第二流体路径 162,其被构造从第二室 111 排放气体的生物灭菌指示器 100 具有的优点是使得气体必须经由与流体进入第二室 111 相同的流体路径离开第二室 111。

[0155] 通过如图示实施例所示构造第一流体路径 160 和第二流体路径 162,在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可以至少部分地消除因试图将灭菌剂和 / 或液体 122 移入第二室 111 而产生的任何气阻效应。另外,在一些实施例中,第二流体路径 162 可允许在生物灭菌指示器 100 保持相同取向(如,基本上垂直向上的方向,如图 1-2, 4 和 6 所示)的情况下激活生物灭菌指示器 100,并允许液体 122 因重力作用而移入第二室 111 中,而无需使生物灭菌指示器 100 被翻倒过来,或者说是重新取向就能使液体 122 移入第二室 111 中。

[0156] 继续参照嵌件 130,嵌件 130 的突出 158 被描述为是相对刚性和固定的。即,在一些实施例中,当容器 120 在壳体 102 中移动时,突出 158 不适于大幅度挠曲、扭曲、变形或者说是向容器 120 倾斜。相反,在一些实施例中,如图 1-4 和 6 所示,突出 158 可以各自被构造成具有上端 159,可将容器 120 设置在上端 159 的顶上并在激活前使容器 120 保持完好。

如图 1-2 和 4 中所示, 在一些实施例中, 突出 158 可被设置为使容器 120 在其圆角末端破碎, 例如当采用椭圆形或胶囊形状的容器 120 时。

[0157] 使突出 158 形成承载件 132 的至少一部分的一个潜在优点是, 当容器 120 破碎时, 容器 120 的底部可以是无限制的, 使得液体 122 可相对容易和可靠地从容器 120 释放并向孢子 115 移动。

[0158] 在此类实施例中, 嵌件 130 可用于在与容器 120 的平坦侧面基本上垂直的方向使容器 120 破碎, 例如当采用椭圆形或胶囊形状的容器 120 时。在此类实施例中, 可实现沿着容器 120 的侧面使其破碎, 同时在容器 120 的下端周围保持一些开放空间, 以有利于在容器 120 破碎时使液体 122 从容器 120 移动到孢子 115 附近。

[0159] 如上所述, 突出 158 适于随着容器 120 被相对于壳体 102 (如, 沿着纵向 D_L) 移动而使容器 120 破碎, 所述移动是例如, 响应壳体 102 的第二部分 106 被相对于壳体 102 的第一部分 104 而移动 (如, 从第一位置 148 移动到第二位置 150) 而发生。

[0160] 在一些实施例中, 突出 158 可包括一个或多个边缘 (例如锥形边缘) 或尖端或者以别的方式被构造为使挤压力集中以增加在邻近突出 158 的区域中对容器 120 的压力, 并有利于更容易地和在一个或多个所需区域使容器 120 破碎。在一些实施例中, 这种使力量集中可减少使第二部分 106 相对于第一部分 104 移动并使容器 120 (或其一部分) 破碎所需要的总作用力或力量。

[0161] 如图 1-4 和 6 中所示, 突出 158 与嵌件 130 的基座 127 整体成形; 然而, 应当理解, 突出 158 可改为与壳体 102 的壁 108 整体成形。另外, 在一些实施例中, 突出 158 可以联接到壳体 102 上, 或者突出 158 和基座 127 可由单独的嵌件提供。在此类实施例中, 各突出 158 可各自为单独的嵌件, 或者多个突出 158 可由一个或多个嵌件提供。另外, 嵌件 130 可被构造成邻接壁 118, 以防止嵌件 130 的第一部分移动到孢子 115 的近邻 (如, 壳体 102 的下部分 114)。

[0162] 另外, 在一些实施例中, 如图 1-4 和 6 所示, 突出 158 可沿着纵向 D_L 延伸一段距离, 并且可定制突出 158 的长度和 / 或厚度 (例如其可沿着长度变化) 以控制容器 120 在壳体 102 中的所需位置和以所需的方式破碎。突出 158 的构造在图 1-7 中仅以举例方式示出。

[0163] 通常, 每个突出 158 仅以举例方式被示出为厚度沿着纵向 D_L 朝向孢子 115 增加 (例如朝着容器 120 或壳体 102 的中央向内增加)。这种构造可随着容器 120 移动朝向孢子 115 而减小对于容器 120 可用的横截面积, 所述移动例如是响应第二部分 106 移动到第二位置 150 而发生。

[0164] 此外, 生物灭菌指示器 100 在图 1-7 中仅以举例方式被显示为包括两个突出 158 和侧壁 131, 但应当理解, 可采用一个突出 158 或者在结构上可能的情况下采用尽可能多的突出, 以及其他构造。另外, 突出 158 其形状和尺寸可按需进行确定, 这取决于壳体 102 的形状和尺寸、容器 120 的形状和尺寸、嵌件 130 的形状和尺寸和 / 或取决于使容器 120 破碎所需的方式和位置。

[0165] 如上所述, 在一些实施例中, 壳体 102 的至少一部分可以是锥形的 (参见, 如图 3 中的锥形部分 146)。因此, 壳体 102 中的横截面积通常会沿着纵向 D_L 而减小。但应当理解, 壳体 102 的内部尺寸通常可沿着纵向 D_L 在锥形部分中减少, 而壳体 102 的外部尺寸则不变。在一些实施例中, 壳体 102 的外部尺寸可沿着其长度方向是相同的, 尽管壳体 102 的内部部

分沿着其长度方向逐渐变细。在一些实施例中,该一个或多个突出 158 独自可沿着纵向 D_L 改变厚度(即朝向容器 120,例如径向方向),使得随着激活过程中容器 120 在壳体 102 中移动,对于容器 120 可用的横截面积通常会减小,尽管壳体 102 的尺寸不改变(例如尽管壳体 102 不包括任何锥形部分 146,无论在内部还是在外部)。

[0166] 如图 1-7 中所示,每个突出 158 的上端 159 包括圆形的、弧形的或弓形的表面,这有利于容器 120 从其中容器 120 至少部分地居于突出 158 的上端 159 之上的第一位置 148 移动到某个位置,在该位置,容器 120 被迫至少部分地进入各突出 158 之间(或壳体 102 的壁 108 与一个或多个突出 158 之间)的较小横截面区域中。另外,圆形上端 159 可防止容器 120 过早打破,而这可防止生物灭菌指示器 100 过早激活(即液体 122 的过早释放)。

[0167] 在一些实施例中,如图 3 所示,嵌件 130 的大小和形状可被设计为允许将容器 120 保持在突出 158 上方并在邻近一个或多个突出 158 的朝内表面的任何部分的区域之外,以防止生物灭菌指示器 100 意外或过早激活。这种构造还可防止因震动或材料膨胀(例如由于灭菌处理过程中暴露于热所致)而发生的无意打破。

[0168] 可至少部分地由突出 158 的上端 159 形成的承载件 132 可被构造成保持容器 120 的底部部分,并且突出 158 可被设置成在容器 120 被设置在壳体 102 中时在容器 120 底部附近的位置使容器 120 破碎。这种构造可使得容器 120 可以在其底部附近被打破,且可有利于液体 122 从容器 120 的排出,而这可提高液体 122 对孢子 115 的可利用率,和提高液体 122 释放出来与孢子 115 (例如与孢子贮存室 136)成流体连通的可靠性。这种构造是仅以举例方式示出的,但是应当理解,突出 158 可被构造和设置成按任何所需的方式使容器 120 破碎。

[0169] 本发明的一些实施例提供了用相对较小的力打破易碎容器 120 的最佳和安全方法,所述方法同时促进液体 122 向生物灭菌指示器 100 的孢子区域(如,壳体 102 的第二室 111)转移,和 / 或增强对生物灭菌指示器 100 的孢子区域中的液体 122 的控制。另外,本发明的一些实施例能够通过操作迫使液体到达生物灭菌指示器 100 的特定区域,例如生物灭菌指示器 100 的检测室(如,第二室 111)。

[0170] 在图 1-7 所示的实施例中,嵌件 130 被示出为包括两个在容器 120 周围和 / 或侧壁 131 周围大约等距间隔的突出 158。然而,在一些实施例中,侧壁 131 可以包括一个从侧壁 131 向内径向延伸的实心(如,基本上环状或半环状)突出 158。此外,在一些实施例中,侧壁 131 可围绕壳体 102 的内表面进一步延伸到图示之外的地方。但是,采用一个或多个较窄(例如在角维度上)的突出 158,如图 1-7 中所示的那些突出,可提供围绕容器 120 的基本上恒定或基本上畅通无阻的灭菌剂路径 164。

[0171] 无论嵌件 130 是否包括一个或多个突出 158 或侧壁 131,嵌件 130 都可被构造成使容器 120 在壳体 102 中保持一致的位置,以在灭菌过程中提供基本上恒定的灭菌剂路径 164。例如,嵌件 130 可将容器 120 保持在基本上一致的位置,而不是让容器 120 在激活之前(例如在灭菌过程中)在壳体 102 中移动或转动(例如径向和 / 或纵向),这可以给灭菌剂留出在容器 120 的外表面和壳体 102 的内表面之间的基本上一致和相对畅通无阻的路径,发生无意堵住的机会极少或不存在。

[0172] 如图示实施例所示,嵌件 130 还可以包括一个或多个突出 161,其被设置为基本上水平或垂直于生物灭菌指示器的纵向 D_L (如,当嵌件 130 设置在生物灭菌指示器中时)。突

出 161 可被称为“第二突出”或“水平突出”，而用于保持和 / 或打破容器 120 的突出 158 可被称为“第一突出”或“垂直突出”。第二突出 161 不像基部 127 那样向下成角度。因此，第二突出 161 可用于多种目的。例如，第二突出 161 可以使嵌件 130 在使容器 120 破碎的力下保持稳定(如，有助于将嵌件 130 保持在生物灭菌指示器 100 的壳体 102 中的所需位置)。另外，第二突出 161 可起到在容器破碎后保留和 / 或收集容器 120 的破碎部分的作用，以防止这些破碎部分移动到生物灭菌指示器中的孢子附近，若这些破碎部分发生这种移动的话会不利地影响孢子生长和 / 或孢子生长的检测。可以采用仍允许流体向下移动至孢子 115，同时防止固体向下移动至孢子 115 的第二突出 161 的其他形状和构造。

[0173] 在一些实施例中，嵌件 130 (如，基部 127) 可适于下列中的一者或多者：有利于或允许流体(如液体 122 的移动)移动到壳体 102 的第二室 111 (即，下部分 114) 中；将破碎容器 120 的碎片或部分(如固体)向壳体 102 的第二室 111 中的移动降至最低限度，即，收集和 / 或保留破碎容器 120 的各个部分；和 / 或将孢子 115 和 / 或信号向壳体 102 的第二室 111 外的扩散降至最低限度。例如，在一些实施例中，基部 127 可被构造成充当滤栅或过滤器。在一些实施例中，通过荧光指示剂 / 分子(例如荧光团)或其他标志物来测定孢子生长。在一些实施例中，如果在激活之后生物灭菌指示器 100 中的液位在孢子 115 的位置的上方，则这种分子或标志物或者孢子 115 本身可移动或扩散离开孢子贮存室 136 或者移动或扩散到孢子贮存室 136 之外，并潜在地移动或扩散到壳体 102 的第二室 111 之外。因此，生物灭菌指示器 100 的某些部分(如，嵌件 130)可被构造成抑制多种指示剂、分子和 / 或标志物向生物灭菌指示器 100 的第二室 111 之外不期望的扩散。在一些实施例中，如上所述，基底 119 也可以抑制此类不期望的扩散。

[0174] 在图 1-4 中所示的实施例中，嵌件 130 的基部 127 通常为 U 形或马蹄形且包括中央孔口 177 (参见图 2)，该孔口有利于灭菌过程中灭菌剂向孢子 115 的移动和激活过程中液体 122 向孢子 115 的移动。基部 127 的马蹄形状可以增大壳体 102 的上部分 116 (即，第一室 109) 与下部分 114 (即，第二室 111) 之间的开口。然而，该形状仅以举例的方式示出，也可以采用其他形状。

[0175] 在一些实施例中，嵌件 130 可被描述为包括一个或多个向下延伸的突出 127，其适于邻接或者说是联接到生物灭菌指示器 100 的壁 118 或另一个内部结构上，以提供嵌件 130 的基部或支撑件，从而在激活之前抑制嵌件 130 和容器 120 相对于壳体 102 移动，和 / 或在激活期间提供有助于打破容器 120 的阻力或力。因此，在一些实施例中，基部 127 可改称为“第三突出”127。

[0176] 如图示实施例所示，在一些实施例中，嵌件 130 可被构造成完全位于生物灭菌指示器 100 的第一室 109 中，使得嵌件 130 不会延伸到第二室 111 内，如果延伸到第二室 111 内可能会妨碍检查或检测过程。此外，嵌件 130 可被构造成抑制生物灭菌指示器 100 的其他部分(如，破碎容器 120)移动到第二室 111 中。

[0177] 图示实施例的嵌件 130 通常是围绕中央纵向对称线对称的，使得具有两个相同的第一突出 158、两个相同的第二突出 161 和两个相同的第三突出 127。然而，嵌件 130 不必包括任何对称线，并且第一突出 158 不必彼此相同，第二突出 161 不必彼此相同，且第三突出 127 也不必彼此相同。嵌件 130 和多个突出 158、161 和 127 的大小和位置能够被设计为用于控制灭菌剂路径 164，例如，例如定制生物灭菌指示器 100 的杀伤 / 存活率，防止容器 120

意外破碎,有利于容器 120 在壳体 120 中移动,配合或接合壳体 102 和 / 或控制容器 120 的打破。

[0178] 仅以举例的方式,示出的嵌件 130 为至少包括下列功能的一体装置:用于在激活之前保持容器 120,在激活期间使容器 120 破碎的装置;用于允许容器 120 在壳体 102 中移动;用于提供基本上恒定的灭菌剂路径 164,用于在激活后收集和 / 或保留破碎容器 120 的各个部分(或至少部分地抑制破碎容器 120 的各个部分移动到壳体 102 的第二室 111 中);和 / 或用于在激活后将孢子 115 和 / 或信号从壳体 102 的第二室 111 向第一室 109 的扩散降至最低限度。但应当理解,在一些实施例中,嵌件 130 可包括多个部分,这些部分可能不是单个一体装置的零件,且这些部分中的每一个都可适于完成上述功能中的一个或多个。

[0179] 嵌件 130 被称为“嵌件”,是因为在图示实施例中,执行上述功能的装置是可被嵌入到壳体 102 的贮存室 103 (具体地讲,第一室 109) 中的装置。但应当理解,嵌件 130 可改为由壳体 102 本身或者生物灭菌指示器 100 的另一部件来提供,且不需要必定可嵌入到壳体 102 中。出于简便起见,在本说明书通篇中将描述到术语“嵌件”,但应当理解,该术语并不意在具有限制意义,且应认识到,可使用其他能执行一个或多个上述功能的等同结构来代替可嵌入的嵌件 130 或者与可嵌入的嵌件 130 组合使用。此外,在图示实施例中,嵌件 130 既可以嵌入壳体 102 中也可以从壳体 102 移除,具体地讲是嵌入壳体 102 的第一部分 104 (和第一室 109) 中和从中移除。但应当理解,尽管嵌件 130 可嵌入壳体 102 中,但嵌件 130 不必需可从壳体 102 中移除,而是可固定联接到壳体 102 上,使得在将嵌件 130 设置在所需的位置后防止嵌件 130 从壳体 102 移除。

[0180] 在一些实施例中,壳体 102 的至少一部分例如壳体 102 的下部分 114 可对某个电磁辐射波长或者波长范围透明(例如当采用可见光光学检测方法时,对可见光透明),这有利于孢子生长的检测。即,在一些实施例中,如图 3、4 和 6 中所示,壳体 102 的至少一部分可以包括或形成检测窗 167。

[0181] 另外,在一些实施例中,如图 3 中所示,壳体 102 的至少一部分例如下部分 114 可包括一个或多个平坦壁 168。这种平坦壁 168 可有利于孢子生长的检测(例如光学检测)。另外,如图所示和如上所述,壳体 102 的第一部分 104 的壁 108 可包括一个或多个阶梯或锥形区域,如梯部 152、梯部 123 以及锥形壁或梯部 170。锥形壁 170 可用于减小壳体 102 的下部分或检测部分 114 的总厚度和大小,使得除内部尺寸减小外,壳体 102 的外部尺寸也减小。生物灭菌指示器 100 的下部分 114 的尺寸和 / 或厚度的此类减小可以有利于检测。另外,具有一个或多个例如梯部和 / 或锥形壁 123、152、170 的特征可让生物灭菌指示器 100 以唯一一个取向联接到读数器或检测装置,使得生物灭菌指示器 100 相对于读取设备被“锁定”,这可以使用户误差减至最低并提高检测处理的可靠性。在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 的一个或多个部分可相对于读取设备锁定。

[0182] 本发明的生物灭菌指示器通常在灭菌过程中保持液体 122 和孢子 115 分开但又相对紧密近邻(例如在独立成套的生物灭菌指示器 100 内),使得液体 122 和孢子 115 在暴露于灭菌处理后可容易地组合。可在检测处理过程中温育液体 122 和孢子 115 (如,读取设备 12 可以温育生物灭菌指示器 100),或可在检测处理之前温育生物灭菌指示器 100。在一些实施例中,当将孢子与液体 122 一起温育时,可使用室温以上的温育温度。例如,在一些实施例中,温育温度为至少约 37℃,在一些实施例中,温育温度为至少约 50℃ (例如 56℃),

而在一些实施例中,至少约 60℃。在一些实施例中,温育温度不大于约 60℃,在一些实施例中,不大于约 50℃,而在一些实施例中,不大于约 40℃。

[0183] 检测处理适于用于检测孢子 115 (如,孢子贮存室 136 内)或孢子 115 周围的液体 122 中发生的可检测变化。也即,检测处理可适于检测多种特性,包括但不限于电磁辐射(例如在紫外、可见光和 / 或红外波段)、荧光、发光、光散射、电子性质(电导、阻抗等或者它们的组合)、浊度、吸收、拉曼光谱、椭圆光度法等或者它们的组合。对这些特性的检测可通过荧光计、分光光度计、比色计等或者它们的组合中的一种或多种来进行。在一些实施例中,例如在测量荧光、可见光等的实施例中,通过以特定的波长进行检测来测量可检测变化。

[0184] 由于作为孢子生存能力的标志的生化反应,孢子和 / 或液体 122 可适于(例如被标记成)产生一个或多个上述特性。结果,没有检测到变化(例如,与基线或背景读数相比)可表示有效的消毒处理,而检测到变化则可表示无效的消毒处理。在一些实施例中,可检测的变化可包括一个或多个上述特性的变化率(例如,增加的荧光、降低的浊度等)。

[0185] 在一些实施例中,孢子生存能力可以通过利用酶活性来确定。如在 Matner 等人的标题为“Rapid Method for Determining Efficacy of a Sterilization Cycle and Rapid Read-out Biological Indicator”(测定灭菌循环的有效性的快速方法及快速读出生物指示器)的美国专利 No. 5, 073, 488 (其以引用方式并入本文)中所述,对于特定类型的孢子可进行酶类的鉴定,在所述孢子中该酶具有特别有用的特性,可利用该特性测定灭菌处理的有效性。此类特性可以包括以下特性:(1) 当经受足以将 1×10^6 的测试微生物的总数减少大约 6 个对数单位(即,减少至大约为零,如缺乏测试微生物长出时测得的那样)的灭菌条件时,酶具有与通过与酶底物系统反应所测量的“背景”相等的残留活性;和(2) 当经受仅仅足以将 1×10^6 的测试微生物的总数减少至少 1 个对数单位但小于 6 个对数单位的灭菌条件时,酶具有的酶活性大于通过与酶底物系统反应所测量的“背景”。酶底物系统可包括底物或底物的混合物,底物受到酶的作用而产生可检测的酶改性产物,通过可检测变化而显见。

[0186] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可以单侧模式进行测试,其中生物灭菌指示器 100 仅包括一个设置成例如靠近孢子 115 的检测窗(例如如图 3 的检测窗 167)。但是,在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可包括超过一个检测窗(例如由壳体 102 的下部分 114 的两个平行壁 168 的全部或一部分所形成的窗),使得生物灭菌指示器 100 可通过超过一个检测窗进行测试。在采用多个检测窗的实施例中,检测窗可并排设置(类似于单侧模式),或者检测窗可相对于彼此成角度(例如 90 度、180 度等)取向。

[0187] 一般地,孢子 115 被设置在与贮存室 103 成流体连通的孢子贮存室 136 内。在一些实施例中,孢子贮存室 136 形成贮存室 103 的一部分(如,第二室 111 的一部分)。如图 4 中所示,贮存室 103 在灭菌过程中与周围环境成流体连通(例如通过孔口 107),以让灭菌剂在灭菌处理的过程中进入贮存室 103 来对孢子 115 进行灭菌。容器 120 可被设置成在灭菌过程中包含液体 122,以防止液体 122 在灭菌过程中与孢子 115、贮存室 103 和灭菌剂成流体连通。

[0188] 现在将更详细地描述孢子 115 和 / 或孢子贮存室 136 的多个细节。

[0189] 在一些实施例中,孢子 115 可被直接设置在壳体 102 的下部分 114 中,或者孢子 115 可被设置在孢子贮存室如孢子贮存室 136 中(例如,由孢子载体 135 提供)。无论孢子 115 被直接设置在壳体 102 的下部分 114 中还是在孢子贮存室中,孢子 115 都可以以多种

方式提供。在一些实施例中,孢子 115 可在孢子悬浮液中,该孢子悬浮液可被设置在生物灭菌指示器 100 中的所需位置并被干燥。在一些实施例中,孢子 115 可在基底(未显示)上提供,该基底可被设置和 / 或紧固在生物灭菌指示器 100 中的所需位置。一些实施例可包括以干燥形式提供的孢子 115 和在基底上提供的孢子 115 的组合。

[0190] 在一些实施例中,基底可被设置成支撑孢子 115 和 / 或帮助将孢子 115 保持在所需位置。这种基底可包括多种材料,包括但不限于纸张、聚合物(例如以上针对壳体 102 所列举的聚合物的任何一种)、粘合剂(例如丙烯酸酯、天然或合成橡胶、硅树脂、硅树脂聚脲、异氰酸酯、环氧树脂或者它们的组合)、织造布、非织造布、微孔材料(例如微孔聚合物材料)、反射材料(例如金属箔)、玻璃、瓷、陶、凝胶形成材料(例如瓜尔豆胶)或者它们的组合。除此之外,或者作为另外一种选择,这种基底可包括或被联接到亲水涂层,以有利于使液体 122 与孢子 115 密切接触(例如当所采用的液体 122 为含水液体时)。除此之外,或者作为另外一种选择,这种亲水涂层可施加到任何设置成使液体 122 和孢子 115 成流体结合(fluidly couple)的流体通道。在一些实施例中,除了亲水涂层,或者代替亲水涂层,可将疏水涂层施加到壳体 102 的其他部分(如壳体 102 的下部分 114)和 / 或孢子贮存室 136,使得液体 122 优先移动到与孢子 115 接触。

[0191] 生物灭菌指示器 100 的一些实施例不包括孢子载体 135。相反,孢子贮存室 136 由壳体 102 的下部分 114 本身提供,孢子 115 可被设置在下部分 114 中、吸附到下部分 114 的内表面或壁上、或者这两种情况的组合。在一些实施例中,孢子 115 可在被设置在壳体 102 的下部分 114 中的基底上提供。

[0192] 在一些实施例中,孢子 115 可被设置在一个孢子座位中或者在多个孢子座位中,这些座位都可被设置在贮存室 103 中、壳体 102 的下部分 114 中和 / 或孢子贮存室 136 中。在一些实施例中,具有多个孢子座位的话可最大程度地使孢子暴露于灭菌剂和暴露于液体 122,可改进制造过程(例如通过将每个孢子座位放置在生物灭菌指示器 100 内的凹部,可有利于孢子的放置),且可改进检测特性(例如因为处于一个大的孢子座位的中间的孢子可能不那么容易检测)。在采用多个孢子座位的实施例中,每个孢子座位都可以包括单独的、已知数量的孢子,和 / 或每个孢子座位都可以包括不同的孢子,使得可以测试多种孢子类型。通过采用多种类型的孢子,生物灭菌指示器 100 可以用于各种灭菌处理,并且针对特定的灭菌处理可以分析特定的孢子座位,或者多种类型的孢子可以用来进一步测试灭菌处理的有效性或者说可信度。

[0193] 另外,在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可包括多个孢子贮存室 136,且每个孢子贮存室 136 可包括一个或多个孢子座位 115。在采用多个孢子贮存室 136 的一些实施例中,所述多个孢子贮存室 136 可被设置成与贮存室 103 成流体连通。

[0194] 在一些实施例中,孢子 115 可用适于装在孢子 115 和 / 或孢子贮存室 136 中或之上的覆盖件(未显示)覆盖。这种覆盖件可有助于在制造、灭菌和 / 或使用过程中将孢子维持在生物灭菌指示器 100 的所需区域内。如果采用覆盖件的话,其可由基本上不会妨碍检测处理和 / 或至少部分地能透过目标电磁辐射波长的材料形成。另外,取决于覆盖件的材料构成,在一些实施例中,覆盖件可有利于顺着孢子 115 芯吸液体 122(例如营养培养基)。在一些实施例中,覆盖件还可包含有利于流体流入孢子贮存室 136 中(或流至孢子 115)的特征,如毛细管通道、亲水性微孔纤维或膜等,或者它们的组合。此外,在一些实施例中,覆盖

件可以隔离信号,或增强信号,这可以有助于检测。无论孢子 115 被设置在孢子贮存室 136 内还是直接设置在壳体 102 的下部分 114 中,都可以采用这种覆盖件。另外,这种覆盖件可在采用多个孢子座位的实施例中采用。覆盖件可以包括各种材料,包括(但不限于)纸张、聚合物(例如,以上对壳体 102 所列举的聚合物中的任一种)、粘合剂(例如,丙烯酸酯、天然或合成橡胶、硅树脂、硅树脂聚脲、异氰酸酯、环氧树脂,或者它们的组合)、织造布、非织造布、微孔材料(例如,微孔聚合物材料)、玻璃、瓷、陶、凝胶形成材料(例如,瓜耳豆胶),或者它们的组合。

[0195] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 还可以包括改性的内表面,如反射表面、白色表面、黑色表面、或适合于使表面的光学性质最优化的另一种表面改性。反射表面(例如由金属箔提供)可被设置成将被从测试或检测装置输送到孢子贮存室 136 的信号反射回到测试装置和/或将孢子贮存室 136 内产生的任何信号反射回到测试装置。因此,反射表面可起到改进来自生物灭菌指示器 100 的信号(例如改进信号的强度)的作用。此类反射表面可由壳体 102 的内表面;联接到壳体 102 内表面上的材料;孢子贮存室 136 的内表面;联接到孢子贮存室 136 内表面上的材料;等提供;或者反射表面可以形成孢子基底的一部分或联接到孢子基底上;或它们的组合。

[0196] 类似地,在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 还可包括白色和/或黑色表面,所述表面设置成增强和/或降低被从测试装置输送到孢子贮存室 136 中的特定信号,和/或设置成增强和/或降低孢子贮存室 136 内产生的特定信号。仅以举例方式来说,白色表面可用来增强信号,黑色表面可用来减少信号(例如噪声)。

[0197] 在一些实施例中,孢子 115 可被设置在官能化表面上,以促进孢子 115 在期望的表面的固定化。例如,这种官能化表面可由壳体 102 的内表面、孢子贮存室 136 的内表面来提供,可形成孢子基底的一部分或者联接到孢子基底,等等,或者它们的组合。

[0198] 在一些实施例中,孢子 115 被设置(例如通过涂覆或别的施加方法施加)在微结构化或微复制表面上(例如诸如 Halverson 等人的 PCT 专利公开 No. W02007/070310、Hanschen 等人的美国专利公开 No. US2003/0235677 和 Graham 等人的 PCT 专利公开 No. W02004/000569 中所公开的那些微结构化表面,所有这些专利都以引用方式并入本文)。例如,此类微结构化表面可由壳体 102 的内表面、孢子贮存室 136 的内表面来提供,可形成孢子基底的一部分或者联接到孢子基底,等等,或者它们的组合。

[0199] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 还可包括凝胶形成材料,该凝胶形成材料设置成在液体 122 从容器 120 中释放出来时与孢子 115 和液体 122 组合。例如,凝胶形成材料可被设置在孢子 115 附近(例如在孢子贮存室 136 中)、在壳体 102 的下部分 114 中,可形成孢子基底的一部分或者联接到孢子基底,等等,或者它们的组合。当液体 122 与孢子接触时,这种凝胶形成材料可以形成包含孢子和营养物质的凝胶(例如,水凝胶)或基质。凝胶形成材料(例如,瓜耳豆胶)可能特别有用,因为它具有在水合时形成凝胶的能力,能有助于使信号(例如,荧光)局部化,能将孢子 115 固定就位,能帮助使孢子 115 的扩散和/或来自孢子贮存室 136 的信号的扩散减至最低,和/或能增强检测。

[0200] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 还可以包括吸收剂或芯吸材料。例如,芯吸材料可被设置在孢子 115 附近(例如在孢子贮存室 136 中),可形成孢子基底的一部分或者联接到孢子基底,等等,或者它们的组合。这种芯吸材料可包括多孔的芯吸垫、浸泡垫等,或

者它们的组合,以有利于使液体 122 与孢子紧密接触。

[0201] 在一些实施例中,易碎容器 120 可被构造成有利于以所需的方式使易碎容器 120 破碎。例如,在一些实施例中,易碎容器 120 的下部分可由较薄和 / 或较弱的材料形成,使得下部分优先于易碎容器 120 的另一部分破碎。另外,在一些实施例中,易碎容器 120 可包括多个设置成有利于以所需的方式使易碎容器 120 破碎的特征,包括但不限于薄的和 / 或弱化的区域、刻线、穿孔等,或者它们的组合。

[0202] 易碎容器 120 可以具有第一封闭状态和第二开放状态,在第一封闭状态时,液体 122 被包含在易碎容器 120 内,而在第二开放状态时,易碎容器 120 发生破碎,液体 122 被释放到贮存室 103 和 / 或孢子贮存室 136 中,并与孢子 115 流体连通。

[0203] 在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可以手动方式进行激活(例如可将第二部分 106 移动到第二位置 150)。在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可被读取设备激活(如,当生物灭菌指示器 100 设置在读取设备中时)。在一些实施例中,可以用独立于此类读取设备的装置(如,激活装置)激活生物灭菌指示器 100,例如,通过在将生物灭菌指示器 100 设置在读取设备的孔中之前将生物灭菌指示器 100 设置在该装置中。在一些实施例中,生物灭菌指示器 100 可由读取设备、独立于读取设备的装置和手动激活中的两者或更多者的组合来激活。

[0204] 生物灭菌指示器 100 和另一装置(如读取设备)中的一者或两者可进一步被构造成防止易碎容器 120 的过早或意外破碎。例如,在一些实施例中,生物灭菌指示器 100、激活装置或读取设备可包括锁或锁闭机制,该锁或锁闭机制被设置成防止壳体 102 的第二部分 106 在有需要之前移动到第二位置 150 中。在这种实施例中,直到该锁移动、移除或解锁之前,生物灭菌指示器 100 不能被激活。除此之外,或者作为另外一种选择,在一些实施例中,生物灭菌指示器 100、激活装置和 / 或读取设备可包括被设置成防止在激活之后壳体 102 的第二部分 106 从第二位置 150 移动回到第一位置 148 中的锁或锁闭机制。

[0205] 在一些实施例中,如图示实施例所示,壳体的至少一部分可以是平坦的(例如平行壁 168),且可以相对于孢子贮存室 136 基本上是平坦的,而且各平行壁 168 中的一个或两个或者它们的部分(例如检测窗 167)其大小可被确定成使得壁 168 (或检测窗 167)的至少一个维度基本上匹配孢子贮存室 136 和 / 或孢子座位 115 的至少一个维度。换句话说,壁 168 或其部分(例如检测窗 167)可包括与孢子贮存室 136 和 / 或孢子座位 115 的横截面积基本上相同大小的横截面积。壁 168/ 检测窗 167 和孢子贮存室 136 和 / 或孢子座位 115 之间的这种大小匹配可使在检测或测试处理的过程中检测到的信号最大化。作为另外一种选择,或者除此之外,壁 168 或检测窗 167 其大小可被确定成使其匹配贮存室 103 (例如至少一个维度或横截面积的大小可被确定成匹配)。各检测区域之间的这种大小匹配可改进孢子测试和检测。

[0206] 对于图 1-7 中所示的生物灭菌指示器 100,至少该生物灭菌指示器 100 的设置孢子 115 的部分是相对薄的(即“z 维度”被减至最低),使得从孢子到壁 168 (或检测窗 167)的光学路径被减至最低和 / 或干扰性物质在液体 122 (或营养培养基)中的任何效应被减至最低。

[0207] 在使用时,可将生物灭菌指示器 100 与一批要灭菌的物品放在一起进行灭菌处理。灭菌期间,灭菌剂主要通过灭菌剂路径 164 与贮存室 103 (即,第一室 109 和第二室

111)、孢子贮存室 136 和孢子 115 流体连通,使得灭菌剂可以到达孢子,以产生无菌孢子。如上所述,第一流体路径 160 和第二流体路径 162 的合作可以有利于灭菌剂向第二室 111 中,具体地讲,向生物灭菌指示器 100 的封闭端 105 中移动。另外,在灭菌期间,易碎容器 120 处于封闭状态,至少部分地被嵌件 130 的承载件 132 保持完好。当易碎容器 120 处于封闭状态时,液体 122 与灭菌剂是隔开的,并且不与贮存室 103 (具体地讲,至少部分地由壳体 102 的下部分 114 形成的第二贮存室 111)、孢子贮存室 136、孢子 115 或灭菌剂路径 164 流体连通。

[0208] 灭菌还可以包括当容器 120 处于第一状态时使灭菌剂从第一室 109 经由第一流体路径 160 向第二室 111 移动,以及响应于灭菌剂从第一室 109 向第二室 111 的移动,或者有利于灭菌剂从第一室 109 向第二室 111 的移动,使被替换的气体(如,滞留空气)经由第二流体路径 162 向第二室 111 外移动。

[0209] 在灭菌之后,可使用生物灭菌指示器 100 来测定灭菌处理的有效性。如果壳体 102 的第二部分 106 此前被锁定在第一位置 148,则可以将其解锁,使其从第一位置 148(参见图 3)向第二位置 150 (参见图 4)移动,以激活生物灭菌指示器 100。第二部分 106 的这种移动可造成易碎容器 120 在壳体 102 中(例如沿着纵向 D_L)从突出 158 的上端 159 上方的位置移动到突出 158 的内部当中的某个位置,这可造成易碎容器 120 破碎。使易碎容器 120 破碎,可使易碎容器 120 从其封闭状态变成其开放状态,从而使液体 122 释放到贮存室 103 中并使其与孢子贮存室 136 和孢子 115 成流体连通。液体 122 可包含孢子的营养培养基(例如萌发培养基),或者液体 122 可接触干燥形式(例如粉末形式或片剂形式)的营养培养基以形成营养培养基,使得形成包含经灭菌的孢子和营养培养基的混合物。然后可在检测或测定处理之前或期间将该混合物进行温育,并可检查生物灭菌指示器 100 确认孢子生长的迹象。

[0210] 激活还可以包括当容器 120 处于第二状态时使液体 122 从第一室 109 经由第一流体路径 160 向第二室 111 移动,以及响应于液体 122 从第一室 109 向第二室 111 的移动,或者有利于液体 122 从第一室 109 向第二室 111 的移动,使被替换的气体(如,滞留空气)经由第二流体路径 162 向第二室 111 外移动。

[0211] 为了检测孢子 115 中的可检测变化,可在液体 122 和孢子 115 进行了组合后立即测试生物灭菌指示器 100 以获得基线读数。之后,可检测任何偏离基线读数的可检测变化。生物灭菌指示器 100 可连续地或间断地进行监测和测量。在一些实施例中,可以在测量可检测变化之前执行温育步骤的一部分或全部。在一些实施例中,温育可在一个温度下(例如在 37℃、在 50-60℃下,等等)进行,而可检测变化的测量可在另一不同的温度(例如在室温、25℃或 37℃下)进行。

[0212] 生物灭菌指示器 100 的读取时间(即用来测定灭菌处理的有效性的时间)可以在一些实施例中少于 8 小时、在一些实施例中少于 1 小时、在一些实施例中少于 30 分钟、在一些实施例中少于 15 分钟、在一些实施例中少于 5 分钟以及在一些实施例中少于 1 分钟。

[0213] 实施例

[0214] 实施例 1 为生物灭菌指示器,包括:

[0215] 壳体;

[0216] 包含液体的容器,该容器的尺寸被设计为使其能设置在壳体中,所述容器的至少

一部分是易碎的,该容器具有第一状态和第二状态,在第一状态时容器是完好的并且液体不与壳体的内部流体连通,在第二状态时容器是破碎的并且液体与壳体的内部流体连通;

[0217] 位于壳体中的第一室,当容器处于第一状态时,容器设置在第一室中;

[0218] 位于壳体中的第二室,当容器处于第一状态时,容器和液体不设置在第二室中,第二室包含生物活性源,当容器处于第一状态时生物活性源不与液体流体连通,当容器处于第二状态时生物活性源与液体流体连通;和

[0219] 设置在壳体中第一室与第二室之间的基底,该基底被设置为与第一室和第二室流体连通,该基底还被设置为使得基底不直接接触生物活性源。

[0220] 实施例 2 为实施例 1 所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第一状态时或当容器处于第二状态时,基底不直接接触生物活性源。

[0221] 实施例 3 为实施例 1 或 2 所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第一状态时,基底不直接接触容器。

[0222] 实施例 4 为实施例 1-3 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第二室包括要进行检查以确定灭菌处理的杀菌力的空间,并且其中基底设置在要检查的空间之外。

[0223] 实施例 5 为实施例 1-4 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底不设置在第二室中。

[0224] 实施例 6 为实施例 1-5 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底设置在第一室中。

[0225] 实施例 7 为实施例 1-6 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底设置在第一室中,不设置在第二室中。

[0226] 实施例 8 为实施例 1-7 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中生物活性源被容纳在设置在第二室中的源载体中,并且其中基底不直接接触源载体。

[0227] 实施例 9 为实施例 1-8 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底相对于生物灭菌指示器的纵向以非零度角且非直角取向。

[0228] 实施例 10 为实施例 1-9 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第一状态时,基底设置在容器与生物活性源之间。

[0229] 实施例 11 为实施例 1-10 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底至少部分地限定第一室和第二室。

[0230] 实施例 12 为实施例 1-11 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第一状态和第二状态时第一室和第二室流体连通。

[0231] 实施例 13 为实施例 1-12 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底被设置用于控制第一室与第二室之间的流体流动。

[0232] 实施例 14 为实施例 1-13 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第二状态时,基底被设置用于限制可检测产物从第二室向第一室扩散。

[0233] 实施例 15 为实施例 1-14 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第一状态时,基底被设置用于控制向生物活性源递送灭菌剂的速率。

[0234] 实施例 16 为实施例 1-15 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底包括在其中形成的孔口,并且其中孔口的尺寸能够被设计为用于控制第一室与第二室之间的流体流动。

[0235] 实施例 17 为实施例 1-16 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第二状态时基底适于集中指示试剂,并且基底与包含指示试剂的液体流体连通。

[0236] 实施例 18 为实施例 1-17 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第二状态时基底适于选择性地集中第一指示试剂,并且基底与包含第一指示试剂和第二指示试剂的液体流体连通。

[0237] 实施例 19 为实施例 1-18 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底包含尼龙。

[0238] 实施例 20 为实施例 1-19 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中基底包含带电荷的尼龙。

[0239] 实施例 21 为实施例 1-20 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第一室和第二室各自具有体积,并且其中第二室的体积不大于第一室的体积的 20%。

[0240] 实施例 22 为实施例 1-21 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第一室和第二室各自具有体积,并且其中第二室的体积不大于第一室的体积的 10%。

[0241] 实施例 23 为实施例 1-22 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第一室和第二室各自具有平均横截面积,并且其中第二室的平均横截面积不大于第一室的平均横截面积的 50%。

[0242] 实施例 24 为实施例 1-23 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第一室和第二室各自具有平均横截面积,并且其中第二室的平均横截面积不大于第一室的平均横截面积的 40%。

[0243] 实施例 25 为实施例 1-24 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第二室至少部分地被壳体的封闭端限定。

[0244] 实施例 26 为实施例 1-25 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第一状态时第一室通过壳体中的至少一个孔口与外界流体连通,所述至少一个孔口被设置为邻近第一室与第二室相对的一端。

[0245] 实施例 27 为实施例 1-26 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第一室包括设置为朝向壳体的第一末端的第一末端和设置为朝向壳体的第二末端的第二末端,并且其中第二室包括与第一室的第二末端流体连通的第一末端和由壳体的第二末端限定的第二末端。

[0246] 实施例 28 为实施例 1-27 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中壳体包括开口端和封闭端,并且其中第一室被设置为邻近开口端,第二室被设置为邻近封闭端。

[0247] 实施例 29 为实施例 1-28 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中壳体包括

[0248] 第一部分,和

[0249] 适于联接到第一部分上的第二部分,当联接到第一部分上时,第二部分适于相对于第一部分在第一位置与第二位置之间移动。

[0250] 实施例 30 为实施例 29 所述的生物灭菌指示器,其中响应于壳体的第二部分从第一位置移至第二位置,容器从第一状态变为第二状态。

[0251] 实施例 31 为实施例 29 或 30 所述的生物灭菌指示器,其中当壳体的第二部分位于第二位置时,壳体的内部与外界隔离。

[0252] 实施例 32 为实施例 29-31 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中响应于壳体的第二部分从第一位置移至第二位置,液体移动到第二室中。

[0253] 实施例 33 为实施例 29-32 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当壳体的第二部

分位于第一位置时,生物活性源与外界流体连通。

[0254] 实施例 34 为实施例 29-33 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当壳体的第二部分位于第二位置时,生物活性源不与外界流体连通。

[0255] 实施例 35 为实施例 1-34 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中容器包括玻璃安瓿。

[0256] 实施例 36 为实施例 1-35 中任一项所述的生物灭菌指示器,还包括设置在第一室与第二室之间的壁。

[0257] 实施例 37 为实施例 36 所述的生物灭菌指示器,其中基底被设置为邻近壁。

[0258] 实施例 38 为实施例 36 或 37 所述的生物灭菌指示器,其中基底设置在壁的第一室侧,使得基底设置在第一室中,而不是设置在第二室中。

[0259] 实施例 39 为实施例 36-38 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中壁相对于生物灭菌指示器的纵向以非零度角且非直角取向。

[0260] 实施例 40 为实施例 1-39 中任一项所述的生物灭菌指示器,还包括设置在壳体中的嵌件,嵌件被构造用于进行保持容器完好和使容器破碎中的至少一者。

[0261] 实施例 41 为实施例 40 所述的生物灭菌指示器,其中基底设置在嵌件与第二室之间。

[0262] 实施例 42 为实施例 40 或 41 所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第一状态时嵌件设置在容器与基底之间。

[0263] 实施例 43 为实施例 40-42 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中嵌件被设置为邻近基底。

[0264] 实施例 44 为实施例 40-43 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中嵌件设置在第一室中。

[0265] 实施例 45 为实施例 1-44 中任一项所述的生物灭菌指示器,还包括:

[0266] 壁,其被设置为将第一室与第二室分开;和

[0267] 嵌件,其设置在壳体中并被构造用于进行保持容器完好和使容器破碎中的至少一者,

[0268] 其中基底设置在嵌件与壁之间。

[0269] 实施例 46 为实施例 1-45 中任一项所述的生物灭菌指示器,还包括:

[0270] 被设置为使第一室和第二室流体连接的第一流体路径,第一流体路径被设置为当容器处于第一状态时允许灭菌剂从第一室移动到第二室中,以及当容器处于第二状态时,允许液体从第一室移动到第二室中;和

[0271] 被设置为使第二室与生物灭菌指示器的另一个室流体连接的第二流体路径,第二流体路径被设置为当灭菌剂或液体从第一室向第二室移动时允许替换的气体从第一室向第二室移动。

[0272] 实施例 47 为实施例 46 所述的生物灭菌指示器,其中壳体包括纵向,其中第一室设置在第二室上方,并且其中第一流体路径和第二流体路径在第一室与第二室之间基本上纵向地延伸。

[0273] 实施例 48 为实施例 46 或 47 所述的生物灭菌指示器,其中基底限定第一流体路径和第二流体路径中的至少一者的至少一部分。

[0274] 实施例 49 为实施例 46-48 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第二流体路径的至少一部分由壳体的内表面限定。

[0275] 实施例 50 为实施例 46-49 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第二流体路径被设置为使第二室与第一室流体连接,第二流体路径被设置为允许替换的气体从第二室向第一室移动。

[0276] 实施例 51 为实施例 50 所述的生物灭菌指示器,在生物灭菌指示器工作时,其中第一流体路径从第一位置处进入第二室,其中第二流体路径从第二位置处进入第一室,并且其中第二位置位于第一位置上方。

[0277] 实施例 52 为实施例 50 或 51 所述的生物灭菌指示器,其中第一流体路径被设置为使第二室与第一室的近侧部分流体连接,并且其中第二流体路径被设置为使第二室与第一室的远侧部分流体连接。

[0278] 实施例 53 为实施例 46-52 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第二状态时第二室至少部分地充满液体,其中液体具有液位,并且其中第二流体路径在低于液体液位的位置与高于液体液位的位置之间延伸。

[0279] 实施例 54 为实施例 46-53 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第二流体路径至少部分地由从第二室向生物灭菌指示器的某一位置延伸的通道限定,所述位置在第一流体路径进入第二室的位置上方。

[0280] 实施例 55 为实施例 46-54 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中第二流体路径从第二室向生物灭菌指示器中的某个位置延伸,所述位置在第一流体路径进入第二室的位置上方。

[0281] 实施例 56 为实施例 46-55 中任一项所述的生物灭菌指示器,在生物灭菌指示器工作时,其中第一流体路径在第一位置处连接至第二室,其中第二流体路径在第二位置处连接至第二室,并且其中第二位置垂直地位于第一位置处或之上。

[0282] 实施例 57 为实施例 46-56 中任一项所述的生物灭菌指示器,其中当容器处于第二状态时,第二流体路径在第二室最后充满液体的水平处连接至第二室。

[0283] 以下可用实例旨在说明本发明而不是限制本发明。

[0284] 实例

[0285] 制备实例 - 制备的用于实例的生物灭菌指示器 (BI)

[0286] 为了对本发明进行举例说明,根据上文提供的说明并如图 1-4 所示制备了若干生物灭菌指示器 (BI)。下文提供了用于实例的 BI 的某些细节。

[0287] 如图 1-4 所示,生物灭菌指示器 100 包括壳体 102,其包含联接在一起以提供独立成套的生物灭菌指示器的第一部分 104 (如,中空管)和第二部分 106 (如,盖件)。盖件由聚丙烯模制而成,其大致尺寸为长大约 21mm,直径 14mm。第一部分 104 (中空管)由聚碳酸酯模制而成,其大致尺寸为长约 52mm,顶部直径 12mm,具有图 1-3 所示的形状。第一部分 104 (如,中空管)的总体积为大约 3mL。

[0288] 如图 1-3 所示,壳体 102 的第二部分(盖件) 106 包括 6 个孔口或开口 107,其提供壳体 102 的内部(如,贮存室 103)与外界之间的流体连通。用作阻挡件的滤纸材料(图 1-3 中未示出)设置在灭菌剂路径中孔口 107 的上方并用具有压敏粘合剂背衬的纸标签将其保持在合适位置。滤纸材料与目前可用的用于蒸汽灭菌器(得自明尼苏达州圣保罗的 3M 公司

(3M Company, St. Paul, MN) 的 3M ATTEST1291 快速读取生物指示器的盖件中存在的材料相同。

[0289] 生物灭菌指示器 100 还包括包含液体生长培养基 122 的易碎容器 120。易碎容器 120 由硼硅酸盐玻璃制成并包含孢子生长培养基。培养基由包含 pH 指示剂溴甲酚紫的改性的胰酶大豆肉汤 (TSB) 和荧光酶底物 4- 甲基伞形酮基 - α -D- 葡萄糖苷组成。安瓿长大约 40mm, 直径约 4mm, 并容纳大约 500 μ L 的培养基液体。液体生长培养基 122 与目前用于蒸汽灭菌器以 3M ATTEST1291 快速读取生物指示器得自 3M 公司的产品中使用的培养基相同。

[0290] 如图 1-4 所示, 液体培养基容器 120 被嵌件 130 保持在生物灭菌指示器 100 中的合适位置。嵌件 (也称为破碎器) 130 用于将容器 120 保持在合适位置并且在 BI 的激活步骤中当通过向下推第二部分 106 以打破液体培养基容器 120 时用于帮助容器 120 受控制地破碎。嵌件 130 为模制的聚碳酸酯结构, 其大概尺寸为 22mm 长 $\times$ 9mm 宽。

[0291] 第二部分 106 具有密封突出 156, 其被设置为在第一部分 104 的开口上端 157 处接触第一部分 104 的第一末端 101, 以便在激活后封闭或密封 (如, 气密地密封) 生物灭菌指示器 100。

[0292] 生物灭菌指示器 100 还包括被设置为与第一部分 104 流体连通的嗜热脂肪地芽孢杆菌孢子 (ATCC7953) 115。孢子 115 放置在聚丙烯孢子载体 135 (9mm $\times$ 4mm) 的孢子贮存室 136 中。孢子 115 直接放置在聚丙烯表面上, 孢子贮存室 136 具有大约 15 μ L 的体积。

[0293] 壳体 102 包括下部分 114 (其至少部分地限定第一室 109) 和上部分 116 (其至少部分地限定第二室 111), 它们被部分内壁或突架 118 部分地分开, 在其中形成提供第一室 109 与第二室 111 之间的流体连通的开口 117。第二室 111 适于容纳孢子 115。第一室 109 适于容纳易碎容器 120, 特别是在激活之前。壁 118 为成角度的或倾斜的, 相对于壳体 102 的纵向为非零度角和非直角, 如图 1-4 所示。

[0294] 第二室 111 也被称为“孢子生长室”或“检测室”, 其包括要检查孢子生存能力以确定灭菌处理效果的空间。

[0295] 在灭菌期间和容器 120 未破碎时, 液体培养基容器 120 被设置和保持在第一室 109 中。孢子 115 被容纳在第二室 111 中并在灭菌期间与外界流体连通。在灭菌期间灭菌剂 (如, 经由第一室 109) 移动到第二室 111 中。然后, 在激活期间, 当容器 120 破碎并且液体 122 被释放到壳体 102 内部时, 液体培养基 122 (如, 从第一室 109) 移动到第二室 111 中。

[0296] 第一室 109 具有约 2800 微升的体积 (没有任何内部组件)。壁 118 正上方的第一室 109 的横截面积为大约 50mm²。第二室 111 具有约 210 微升的体积。壁 118 正下方的第二室 111 的横截面积为大约 20mm²。

[0297] 生物灭菌指示器 100 还包括基底 119。基底 119 的尺寸为大约 9mm $\times$ 8mm, 并且其尺寸被设计为搁置在壁 118 的顶上。基底 119 设置在生物灭菌指示器 100 的第一室 109 与第二室 111 之间。基底 119 包括穿过其形成的直径为约 3.2mm (0.125 英寸) 的孔口 121, 孔口大约在基底的中央。基底 119 设置在嵌件 130 与壁 118 之间 (如, 夹在它们之间)。基底 119 由带电荷的尼龙形成, 具体地讲为以商品名 “MAGNAPROBE” (0.45 微米孔径、30cm $\times$ 3m 卷, 目录号 NP0HY00010, 材料编号 1226566) 得自宾夕法尼亚州特莱沃斯的 GE 水处理及工艺过程处理公司 (GE Water&Process Technologies, Trevose, PA) 的重探测、带电荷的转移膜。

[0298] 生物灭菌指示器 100 具有如图 4 所示的排放特征物 162, 其被设置为使第二室 111

与第一室 109 流体连接。还如图 4 所示,生物灭菌指示器 100 具有肋或突起 165,它与壳体 102 的壁 108 整体成形,并被设置为将孢子载体 135 保持在壳体 102 中的所需位置。

[0299] 壳体 102 是锥形的(参见,如,图 3 中的锥形部分 146),使得壳体 102 中的横截面积沿着纵向 D_L逐渐减小。

[0300] 实例 1 - 荧光读数与 24 小时后生长的相关性

[0301] 用 $\sim 1 \times 10^7$ CFU 的嗜热脂肪地芽孢杆菌 ATCC7953 孢子作物构建图 1-4 中所示和上文制备实例中所述设计的生物指示器 (BI)。将带电荷尼龙基底材料放置在:(1) 图 1-4 所示和上文所述的“第一”部位或位置,或 (2) “第二”部位或位置,其位于壳体 102 的第一室 109 中,邻近易碎容器 120,但在嵌件 130 上方。制备另外的其中没有放置基底的 BI 样品。液体生长培养基 122 与用于蒸汽灭菌器的 3M ATTEST1291 快速读取生物指示器(得自明尼苏达州圣保罗的 3M 公司 (3M Company, St. Paul, MN))中所用的液体生长培养基相同。然后让每个 BI 在 H&W 蒸汽阻力计(得自纽约州罗切斯特市的 H&W 技术有限责任公司 (H&W Technology LLC, Rochester, NY))中在 270 °F /132°C 重力蒸汽下经受不同时间长度的分别为 1 分钟、1 分钟 45 秒、2 分钟、2 分钟 15 秒、2 分钟 30 秒和 3 分钟的蒸汽灭菌循环。灭菌之后,让 BI 冷却并在类似于 290AUTOREADER 读取设备(得自 3M 公司 (3M Company))的 490AUTOREADER 读取设备(得自明尼苏达州圣保罗的 3M 公司 (3M Company, St. Paul, MN))中激活。490AUTOREADER 读取设备的某些特征在共同待审的美国专利申请 No. 61/409042 (代理人案卷号 66175US002)和 61/408997 (代理人案卷号 66176US002)中有所描述。在 60 分钟内每隔 1 分钟取一次激发 / 发射 365/460nm 处的荧光读数。如果检测到荧光,则报告为“是”;如果未检测到荧光,则报告为“NF”(即,无荧光)。另外,在读取设备中温育 24 小时后,取出 BI 并根据培养基中从紫色到黄色的颜色变化评价其生长情况。如果观察到颜色变化,则报告为“是”;如果未观察到颜色变化,则报告为“否”。

[0302] 以下表 1 和表 2 中所示的结果表明,对于暴露于所有时间长度的灭菌循环的所有 BI 而言,当基底设置在第一位置时,荧光结果与 24 小时生长确认结果之间具有良好的相关性。

[0303] 以下表 3 和表 4 中所示的结果表明,当基底位于第二位置,而不是在培养基路径中时,观察到 BI 具有不一致的结果,特别是在 2 分钟 30 秒和 3 分钟的循环时间处。

[0304] 以下表 5 和表 6 中所示的结果表明,当不存在基底时观察到 BI 具有不一致的结果,特别是在 2 分钟 15 秒、2 分钟 30 秒和 3 分钟的循环时间处。

[0305] 表 1. 基底位于第一位置 - 荧光

循环时间	荧光: n=5				
1:00	是	是	是	是	是
1:45	是	是	是	是	是
2:00	是	是	是	是	是
2:15	无荧光	是	无荧光	是	是
2:30	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光
3:00	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光

[0307] 表 2. 基底位于第一位置 - 24 小时后的生长

[0308]

循环时间	24 小时后的生长； n=5				
1:00	是	是	是	是	是
1:45	是	是	是	是	是
2:00	是	是	是	是	是
2:15	否	是	否	是	是
2:30	否	否	否	否	否
3:00	否	否	否	否	否

[0309] 表 3. 基底位于第二位置 - 荧光

[0310]

循环时间	荧光； n=5				
1:00	是	是	是	是	是
1:45	是	是	是	是	是
2:00	是	是	是	是	是
2:15	是	是	是	是	是
2:30	无荧光	无荧光	无荧光	是	无荧光
3:00	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光

[0311] 表 4. 基底位于第二位置 - 24 小时后的生长

[0312]

循环时间	24 小时后的生长； n=5				
1:00	是	是	是	是	是
1:45	是	是	是	是	是
2:00	是	是	是	是	是
2:15	是	是	是	是	是
2:30	否	否	是	是	否
3:00	否	否	否	否	否

[0313] 表 5. 无基底 - 荧光

[0314]

循环时间	荧光； n=5				
1:00	是	是	是	是	是
1:45	是	是	是	是	是
2:00	是	是	是	是	是
2:15	是	无荧光	无荧光	是	是
2:30	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光
3:00	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光

[0315] 表 6. 无基底 - 24 小时后的生长

[0316]

循环时间	24 小时后的生长； n=5				
1:00	是	是	是	是	是
1:45	是	是	是	是	是
2:00	是	是	是	是	是
2:15	否	否	是	是	是
2:30	否	否	否	否	否
3:00	否	否	否	否	否

[0317] 实例 2- 培养基流动轻摇测试

[0318] 制备以下 4 组生物指示器 (BI) 样品：

[0319] 如上文制备实例中所述制备实例 2A)BI。

[0320] 如上所述制备实例 2B)BI, 不同的是基底 119 中没有孔口 121。

[0321] 如上所述制备实例 2C)BI, 不同的是厄特曼纸 (Whatman Paper)* (而不是尼龙)用作基底并且基底中包括 3.2mm 的孔口。* (厄特曼 1 级 Chr 纤维素层析纸, 得自新泽西州皮斯卡塔韦的美国厄特曼有限公司 (Whatman Inc. USA, Piscataway, NJ))

[0322] 如上所述制备实例 2D)BI, 不同的是厄特曼纸 * 用作基底, 并且基底中没有孔口。

[0323] 将轻摇测试 BI 放到管座中并向下推盖件以激活 BI, 从而压碎包含液体生长培养基 122 的易碎容器 120。通过目视检查评价液体生长培养基 122 的移动。如果培养基未完全移动到检测室 111 中(由气泡的存在证明), 那么通过单次向下摇动“轻摇”BI。每次轻摇之后, 再次对检测室进行视觉检查。记录使所有培养基移动至检测室并去除所有气泡所需的轻摇次数。轻摇次数较多表明液体生长培养基向检测室 111 的流动不畅。结果示于上表 7 中。

[0324] 表 7. 培养基流动轻摇测试 - 使培养基移动至检测室的轻摇次数

	2A GE 尼龙 有孔	2B GE 尼龙 没有孔	2C 厄特曼纸 有孔	2D 厄特曼纸 没有孔
[0325] 平行样品#1	0	0	0	0
平行样品#2	0	0	2	1
平行样品#3	0	0	2	1
平行样品#4	0	1	1	1

[0326] 实例 3 - 基底对液体培养基中的溴甲酚紫 (BCP) 的吸附作用

[0327] 制备孢子生长培养基溶液, 该溶液中每升水包含 17g 细菌蛋白胨、0.17g L- 丙氨酸和 0.03g 溴甲酚紫 pH 指示染料。用 0.1N 氢氧化钠将营养培养基溶液的 pH 值调至 7.6。

[0328] 向 60 个硼硅酸盐玻璃管 (12mL, VWR 目录号 53283-802) 的每一个中加入 1.0mL 制备的生长培养基并用无衬旋盖 (VWR 目录号 66010-680) 封口。

[0329] 评价两种不同的基底材料: GE 带电荷尼龙 (MAGNAPROBE0.45 微米带电荷尼龙膜, 产品编号 NPOHY00010, 得自美国明尼苏达州米尼通卡的 GE Osmonics Labstore 公司 (GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN)) 和纸 (厄特曼 1 级 Chr 纤维素层析纸, 得自新泽西州皮斯卡塔韦的美国厄特曼有限公司 (Whatman Inc. USA, Piscataway, NJ))。

[0330] 分别将两种基底材料各 20 条切割成 4mm×10mm 的尺寸。通过以下方法对所有条进行预灭菌: 将它们放入 Propper CHEX-ALL II 即时密封袋 (纽约州长岛市的 Propper 制造公司 (Propper, Manufacturing Inc., Long Island City, NY)) 中并在 AMSCO 灭菌器 (俄亥俄州门托市的思泰瑞公司 (Steris, Mentor, OH)) 中在 121℃ 的蒸汽液体循环中灭菌 30 分钟。

[0331] 从袋中无菌地取出灭菌后的基底条并将其转移到玻璃管中, 20 个管中各放入五条尼龙基底, 另外 20 个管中各放入 5 条纸基底。

[0332] 从拆开的用于蒸汽灭菌器的 3M ATTEST1292 快速读取生物指示器 (包含嗜热脂肪地芽孢杆菌孢子 (ATCC7953); 得自 3M 公司 (3MCompany)) 中获得孢子条。将孢子条切割成四等分, 每条大约 6.4mm×6.4mm, 并根据表 8 和下文所述将其加入玻璃管中。向各自包含 5 片尼龙基底和生长培养基的 10 个玻璃管中各加入一片 (6.4mm×6.4mm) 1292ATTEST 孢子条。向各自包含 5 片厄特曼纸和生长培养基的 10 个玻璃管中各加入一片孢子条。向 10 个玻璃管中各加入一片孢子条, 其中每个管只包含生长培养基, 没有基底。剩余的 30 个管中不加孢子条: 其中 10 个管各包含 5 片尼龙基底, 10 个管各包含 5 片纸基底, 10 个管没有基底。

[0333] 表 8. 实例 3 样品的制备

[0334]

样品	管编号	生长培养基	5 条基底	孢子条
1. 尼龙 + 孢子	10	是	尼龙	是

2. 尼龙, 无孢子	10	是	尼龙	无
3. 纸 + 孢子	10	是	纸	是
4. 纸, 无孢子	10	是	纸	无
5. 对照 - 无基底 + 孢子	10	是	无	是
6. 对照 - 无基底, 无孢子	10	是	无	无

[0335] 从上述样品中各选择两个管用于进行 1 分钟时间点处的下列观察和分析。将尼龙或纸基底材料在管中时的颜色与周围液体生长培养基的颜色进行比较, 观察基底比培养基颜色深还是浅。将基底从包含生长培养基的玻璃管中取出时, 观察并记录基底材料的颜色。

[0336] 用 X-Rite530P 光密度计(密歇根州大急流的爱色丽公司(X-Rite, Grand Rapids MI))读取光密度读数之前, 将尼龙和纸基底条从管中取出并放到 KIMWIPE(金百利克拉克公司(Kimberly-Clark))上。将 X-Rite530P 光密度计上的光密度设置为“颜色”, 以提供“V”过滤结果。将 X-Rite 光密度计设置为“比较”, 将基底的 ΔE 结果与选择的 Pantone2665U 和 102U 进行比较。用 CIE76 公式计算每个 Pantone 处的 ΔE 。 ΔE 值为 L^*A^*B 颜色空间中从测量点至基准值(Pantone 颜色)的距离。较低的 ΔE 表明测得的颜色更接近基准值。约 2.5 的 ΔE 值为人眼区分颜色的约最小阈值。使用的两个基准值为 Pantone2665U(淡紫色)和 Pantone102U(明黄色)。要注意的是, 因为这两个值在“色轮”上不是完全相反的, 所以 ΔE 在 2665U 处的增大不一定意味着 ΔE 在 102U 处的确切减小。换言之, 2665U 处的 ΔE 只表明与“紫色”相关的变化, 而 102U 处的 ΔE 只表明与“黄色”相关的变化。

[0337] 还观察和记录了每个管中的培养基的颜色。将一式三份的量为 200 μ L 的培养基从每个管中取出并放入 96 孔板(具有透明底部的 COSTAR CLS-3603-48EA 黑色组织培养物处理过的 96 孔板)中, 然后用带有 Gen5 软件的 SYNERGY4 分光光度计测量 590nm 和 430nm 处的光密度。用单色仪(佛蒙特州威努斯基的 BioTek 公司(BioTek, Winooski, VT))提取光密度(OD)测量值。

[0338] 剩余的管在 56°C 下进行温育。在以下每个温育时间: 30 分钟、1 小时、4 小时和 24 小时; 从温育器中取出每种样品的 2 个管, 如上所述进行视觉观察和仪器测量。

[0339] 表 9. 培养基的颜色观察

[0340]

样品	1 分钟	30 分钟	1 小时	4 小时	24 小时
1. 尼龙 + 孢子	紫色	紫色	紫色	紫色	黄色
3. 纸 + 孢子	紫色	紫色	紫色	紫色	黄色
5. 对照 - 无基底 + 孢子	紫色	紫色	紫色	紫色	黄色
2. 尼龙, 无孢子	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色

4. 纸,无孢子	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色
6. 对照 - 无基底,无孢子	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色

[0341] 直到 4 小时读数之后,所有小瓶中的培养基都保持紫色。那些没有孢子的样品在 24 小时后仍是紫色。具有孢子的所有样品经过 24 小时在视觉上变成黄色,这是由于细胞生长导致培养基的 pH 值降低,由溴甲酚紫 (BCP) pH 指示染料指示,从而从紫色变成黄色。

[0342] 在每个时间间隔处,从培养基中取出基底之前,将基底的颜色与培养基的颜色进行比较。报告基底颜色与培养基颜色之间的相对差值。在所有情况下,当尼龙基底用作基底时,基底显示出比周围培养基深的色调。在所有情况下,当纸用作基底时,基底显示出比周围培养基浅的色调。这些结果显示,在接收和集中指示试剂方面,尼龙基底优于纸基底。

[0343] 表 10. 基底颜色与培养基颜色的对比

[0344]

样品	1 分钟	0.5 小时	1 小时	4 小时	24 小时
1. 尼龙 + 孢子	较深	较深	较深	较深	较深的黄色
2. 尼龙,无孢子	较深	较深	较深	较深	较深
3. 纸 + 孢子	较浅	较浅	较浅	较浅	较浅的黄色
4. 纸,无孢子	较浅	较浅	较浅	较浅	较浅

[0345] 在大部分情况下,“较深”是指基底为比培养基明显更深的紫色,例外情况是 24 小时具有孢子的尼龙,其为较深的黄色。在大部分情况下,“较浅”是指基底为比培养基明显更浅的紫色,例外情况是 24 小时具有孢子的纸,其为较浅的黄色。

[0346] 对于具有孢子的样品而言,24 小时时 590nm 处光密度 (OD) 测量值未显示出黄色强度差值。因此,只评价 24 小时时 430nm 处取得的 OD 值。

[0347] 表 11. 24 小时时 430nm 处的培养基平均光密度

[0348]

样品	24 小时
1. 尼龙 + 孢子	0.271
3. 纸 + 孢子	0.827
5. 对照 - 无基底 + 孢子	0.835

[0349] 有孢子且存在纸基底的培养基样品和有孢子但没有基底的培养基样品(对照)在 430nm 处的 24 小时读数均具有类似的 OD 值,分别为 0.827 和 0.835,如表 11 所示。然而,有孢子且存在尼龙基底的培养基样品仅具有 0.271 的 OD 值,比对照或有纸基底的样品小 0.50D 单位。这显示,由于尼龙基底吸收和集中指示试剂,存在尼龙的培养基的黄色强度降低。

[0350] 表 12. 590nm 处的培养基平均光密度

[0351]

样品	1 分钟	30 分钟	1 小时	4 小时	24 小时
1. 尼龙, 有孢子	1. 124	1. 122	0. 698	1. 063	***
3. 纸, 有孢子	1. 404	1. 786	1. 440	1. 697	***
5. 对照 - 无基底有孢子	1. 402	1. 801	1. 463	1. 776	***
2. 尼龙, 无孢子	1. 158	1. 136	0. 653	1. 102	1. 122
4. 纸, 无孢子	1. 435	1. 716	1. 468	1. 863	1. 708*
6. 对照 - 无基底, 无孢子	1. 345	1. 797	1. 465	1. 828	1. 812

[0352] 所有值表示 n=6 (3 个读数 × 2 个管)。

[0353] *n=5 个读数 : 管 1 的 3 个读数和管 2 的 2 个读数。

[0354] *** 样品的颜色为黄色, 因此 590nm 处的 OD 未准确测得培养基的颜色。

[0355] 将没有基底的对照(有和没有孢子)在 1 分钟时的吸光度视为培养基的初始基线 OD 测量值。表 12 显示, 即使在 1 分钟时, 有孢子、存在尼龙的样品培养基在 590nm 处的 OD(1. 124) 也小于有孢子、存在纸的样品培养基的 OD(1. 404) 或有孢子的对照的 OD(1. 402)。该差值表明, 由于尼龙基底快速吸收和集中 BCP 指示试剂, 培养基的紫色强度已降低。在 24 小时时, 存在尼龙、没有孢子的样品培养基在 590nm 处的 OD 为 1. 122, 该值远低于存在纸的培养基的 OD(1. 708) 或没有孢子的对照样品的 OD(1. 812)。

[0356] 表 13. 24 小时时基底的 Pantone 颜色

[0357]

1. 尼龙基底 + 孢子	黄色	Pantone102U
2. 尼龙基底, 无孢子	紫色	Pantone1345U
3. 纸基底 + 孢子	黄色	Pantone100U
4. 纸基底, 无孢子	紫色	Pantone256U
初始紫色培养基颜色	紫色	Pantone2665U
黄色培养基颜色	黄色	Pantone102U

[0358] 表 14. 使用 V 滤光器获得基底的平均光密度读数

[0359]

样品	0 分钟	1 分钟	0. 5 小时	1 小时	4 小时	24 小时
1. 尼龙 + 孢子	0. 05	0. 17	0. 30	0. 22	0. 26	***

2. 尼龙, 无孢子	0.05	0.20	0.24	0.28	0.26	0.26
3. 纸 + 孢子	0.11	0.12	0.26	0.16	0.12	***
4. 纸, 无孢子	0.11	0.11	0.15	0.14	0.11	0.18

[0360] ***24 小时具有孢子的基底样品为黄色, V 滤光器未准确测得基底的颜色。

[0361] 表 15. 基底的平均光密度读数: ΔE (Pantone2665U) (紫色)

[0362]

样品	0 分钟	1 分钟	0.5 小时	1 小时	4 小时	24 小时
1. 尼龙 + 孢子	68.18	64.48	63.57	64.36	56.42	***
2. 尼龙, 无孢子	68.18	66.37	58.47	74.45	54.62	57.49
3. 纸 + 孢子	66.23	68.18	61.27	67.06	66.96	***
4. 纸, 无孢子	66.23	68.70	65.29	63.69	67.45	59.31

[0363] ***24 小时具有孢子的基底样品为黄色, V 滤光器未准确测得基底的颜色。

[0364] 表 16. 基底的平均光密度读数: ΔE (Pantone102U) (黄色)

[0365]

样品	0 分钟	24 小时
尼龙基底 + 孢子	83.78	56.83
纸基底 + 孢子	83.67	76.15

[0366] 表 13-16 显示, 基底暴露于培养基(有和没有孢子)之后的光密度读数随时间长度而变化。将基底样品放入培养基中之前, 每个基底在时间 0 处的读数为初始光密度读数。当评价紫色的基底时, V 滤光器和 ΔE (Pantone2665U) 显示最大的差别。表 14 中所示的用 V 滤光器获得的尼龙基底的平均光密度读数增大并在整个实验中保持升高(唯一的例外是, 对于“具有孢子”样品而言, 当基底在 24 小时时间点为黄色时)。相比之下, 纸基底的光密度读数在各个时间点都一直相当恒定。同样, 表 15 中所示的尼龙基底 ΔE (Pantone2665U) 值通常在整个实验中都下降(唯一的例外是, 对于“具有孢子”样品而言, 当基底在 24 小时时间点为黄色时)。这表明, 尼龙基底吸收和集中 BCP 指示试剂。而相比之下, 纸基底的 ΔE (Pantone2665U) 值一直相当恒定。

[0367] 表 16 显示, 在 24 小时时间点, 尼龙基底的 ΔE (Pantone102U) 值显著低于纸基底的 ΔE (Pantone102U) 值, 这表明尼龙基底比纸基底更接近 pantone102U 色(更明亮的黄色)。

[0368] 实例 4 - 两个 24 小时温育后尼龙基底对液体培养基中的 BCP 的吸附作用

[0369] 实例 4 中使用的培养基和组分与实例 3 相同。向 4 个玻璃管中各加入 1.0mL 制备的生长培养基。将切成大约 6.4mm×6.4mm 的一片 1292ATTEST 孢子条加入每个玻璃管中。

将管放入温育器中,在 56℃下温育 24 小时,以促进嗜热脂肪地芽孢杆菌细胞的生长。24 小时温育之后,将五 (5) 条(每条都切割成 4mm×10mm)尼龙基底加入两 (2) 个管中。另外两个剩余的对照管中不加入尼龙基底材料。将管放入温育器中,在 56℃下再温育 24 小时。在管的第二个 24 小时温育周期(添加尼龙基底后 24 小时)之后,进行以下分析:(1) 从每个管中提取三等份 200 μL 培养基并将其置于 96 孔板中,再用 SYNERGY4 分光光度计测量培养基在 430nm 处的光密度;(2) 将尼龙基底片从管中取出,放到 KIMWIPE 上吸干,并用 X-Rite530P 光密度计取得基底条的光密度读数。

[0370] 表 17. 48 小时 430nm 处的培养基平均 OD ;加入尼龙基底 24 小时后

[0371]

样品	平均 OD
培养基, 包含尼龙基底 + 孢子	0.365
对照培养基 - 无基底 + 孢子	1.241

[0372] n=12 (从 4 个管各取得 3 个读数)

[0373] n=3 (从对照管取得 3 个读数)

[0374] 表 17 显示,与未加入基底的对照相比,管中加入尼龙基底 24 小时后培养基在 430nm 处的 OD 减小。两个样品之间的 OD 测量值差值表明样品培养基中存在的黄色的量有差异。这显示,由于尼龙基底吸收和集中指示试剂,所以在尼龙存在下培养基的黄色强度有所降低。

[0375] 表 18. 基底的平均光密度读数 : ΔE (Pantone102U) (黄色)

[0376]

样品	平均 ΔE(102U)
尼龙基底 + 加入培养基中 24 小时后的孢子	37.86
尼龙基底, 加入培养基中之前	83.78

[0377] n=10 (5 条尼龙基底 × 2 个管)

[0378] 表 18 示出了将尼龙基底加入具有已温育 24 小时的孢子的培养管中 24 小时之后的尼龙基底 ΔE(102U) 值。这与未放入培养基中的尼龙基底进行了比较。两个样品之间的 ΔE 测量差值表明,与未暴露于培养基的基底相比,暴露于供生长的(黄色)培养基的基底更接近 pantone102U (明黄色)的颜色。换句话讲,在 24 小时的温育和生长之后,尼龙基底仍能够吸收和集中指示试剂。

[0379] 实例 5- 多种基底材料对液体培养基中的 BCP 的吸附作用

[0380] 制备孢子生长培养基溶液,其中每升水包含 17g 细菌蛋白胨 C、0.17g L- 丙氨酸和 0.03g 溴甲酚紫 (BCP) pH 指示染料。用 0.1N 氢氧化钠将营养培养基溶液的 pH 值调至 7.6。

[0381] 向每个硼硅酸盐玻璃管 (12mL, VWR 目录号 53283-802) 中加入 1.0mL 制备的生长培养基并用无衬旋盖 (VWR 目录号 66010-680) 封口。

[0382] 评价四种不同的基底材料:(1)GE 带电荷尼龙 (MAGNAPROBE0.45 微米带电荷尼

龙膜,产品编号 NPOHY00010,得自美国明尼苏达州米尼通卡的 GE Osmonics Labstore (GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN);(2) 带正电的、具有季铵基团的 BIO-RAD 高强度尼龙膜(ZETA-PROBE GT Genomics, 目录号 162-0196,得自加利福尼亚赫尔克里士的 BIO-RAD 生命科学公司 (BIO-RAD LifeSciences, Hercules, CA));(3) 0.2 μ M 硝化纤维 (目录号 LC-2000,得自加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司 (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)),以及 (4) 0.2 μ M 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (目录号 LC-2002,得自加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司 (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA))。将若干条每种基底材料各切成以下尺寸:4mm $\times$ 10mm,足够每个玻璃管中放一 (1) 条。

[0383] 通过以下方法对所有条进行预灭菌:将它们放入 ProperCHEX-ALL II 即时密封袋(纽约州长岛市的 Proper 制造公司 (Propper, Manufacturing Inc., Long Island City, NY))中并在 AMSCO 杀菌器(俄亥俄州门托市的思泰瑞公司 (Steris, Mentor, OH))中在蒸汽液体循环中(121 $^{\circ}$ C下)灭菌 30 分钟。

[0384] 然后将条无菌地转移到各个管中。对每种基底的两个管以及两个不含基底的对照管进行评价。

[0385] 在 0、30 分钟、1 小时、4 小时和 24 小时时间点进行以下观察和分析:(1) 将每个管中的基底材料的颜色与同一管中的周围培养基的颜色进行比较,以确定基底比周围培养基更深还是更浅,(2) 将基底材料从管中取出,放到 KIMWIPE 上吸干,然后如上所述用 V 滤光器取得光密度读数,(3) 从每个管中取出 200 μ L 培养基并将其一式三份转移到 96 孔板(具有透明底部的 COSTAR CLS-3603-48EA 黑色组织培养物处理过的 96 孔板)中,并用带有 Gen5 软件的 SYNERGY4 分光光度计测量培养基在 590nm 处的光密度。用单色仪(佛蒙特州威努斯基的 BioTek 公司 (BioTek, Winooski, VT))取得光密度 (OD) 测量值。

[0386] 剩余的管在 56 $^{\circ}$ C 下进行温育。在以下每个温育时间:30 分钟、1 小时、4 小时和 24 小时;从温育器中取出每种样品的 2 个管,如上所述进行视觉观察和仪器测量。

[0387] 表 19. 多种基底的基底颜色与培养基颜色的比较

时间点	GE MAGNAPROBE	Bio-Rad	Invitrogen	Invitrogen
	尼龙	ZETA-PROBE 尼龙	硝化纤维	PVDF
0 小时	较浅	较浅	较浅	较浅
[0388] 0.5 小时	较深	较深	较浅	较浅
1 小时	较深	较深	较浅	较浅
4 小时	较深	较深	较浅	较浅
24 小时	较深	较深	较浅	较浅

[0389] 较深 = 基底为比培养基明显更深的紫色

[0390] 较浅 = 基底为比培养基明显更浅的紫色

[0391] 在每次从培养基中取出基底之前进行读数时,对培养基的颜色和基底的颜色进行视觉比较。观察基底颜色与培养基颜色之间的差异并在上表中报告。与培养基接触 30 分钟后,两种尼龙基底材料均比培养基明显更深并在整个实验过程中一直较深。

[0392] 表 20. 与具有 BCP 的培养基接触后多种基底的平均光密度读数“V”

时间点	GE MAGNAPROBE 尼 龙	Bio-Rad ZETA-PROBE 尼龙	Invitrogen 硝化纤维	Invitrogen PVDF
0 小时	0.300	0.425	0.050	0.035
0.5 小时	0.965	0.735	0.195	0.030
1 小时	0.930	0.785	0.255	0.025
4 小时	1.035	0.720	0.220	0.035
24 小时	1.015	0.735	0.240	0.040

[0394] 上表示出了暴露于培养基不同时间长度后基底材料的光密度读数。每种基底的时间 0 读数为将基底放入培养基中 30 秒内的初始光密度读数。在所有情况下,尼龙基底的光密度读数在 30 分钟内增大并在整个实验过程中保持升高。

[0395] 表 21. 在多种基底材料存在下培养基在 590nm 处的 OD

时间点	GE MAGNAPROBE 尼龙	Bio-Rad ZETA-PROBE 尼龙	Invitrogen 硝化纤维	Invitrogen PVDF	对照 (只有培养基)
0 小时	1.972	1.952	2.012	1.988	1.957
0.5 小时	1.535	1.762	1.981	1.985	1.965
1 小时	1.166	1.662	2.143	1.970	1.990
4 小时	1.108	1.704	2.071	1.995	1.958
24 小时	0.935	1.842	2.217	2.329	2.156

[0397] 表 21 示出了在指定时间从包含每种基底材料的管中取出的培养基的平均光密度(OD) 读数。值得注意的是,在每个时间点,存在任一尼龙基底的培养基的 OD 低于包含硝化纤维或 PVDF 的培养基的 OD 读数。另外,硝化纤维或 PVDF 显示 OD 读数变化非常小,并非常类似于对照的 OD 值。

[0398] 实例 6 尼龙基底对液体培养基中的甲基红的吸附作用

[0399] 制备孢子生长培养基溶液,其中每升水包含 17g 细菌蛋白胨、0.17g L- 丙氨酸和 0.03g 甲基红 pH 指示染料。用 0.1N 盐酸将营养培养基溶液的 pH 值调至 4.2。

[0400] 向每个硼硅酸盐玻璃管(12mL, VWR 目录号 53283-802)中加入 1.0mL 制备的生长培养基并用无衬旋盖(VWR 目录号 66010-680)封口。

[0401] 评价两种不同的基底材料:GE 带电荷尼龙(MAGNAPROBE 0.45 微米带电荷尼龙膜,产品编号 NP0HY00010,得自美国明尼苏达州米尼通卡的 GE Osmonics Labstore(GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN)),和带正电的、具有季铵基团的 BIO-RAD 高强度尼龙

膜(ZETA-PROBE GT Genomics, 目录号 162-0196, 得自加利福尼亚赫尔克里士的 BIO-RAD 生命科学公司 (BIO-RAD LifeSciences, Hercules, CA))。将若干条每种基底材料切成以下尺寸: 4mm×10mm, 足够在每个玻璃管中放入一 (1) 条。

[0402] 通过以下方法对所有条进行预灭菌: 将它们放入 ProperCHEx-ALL II 即时密封袋 (纽约州长岛市的 Proper 制造公司 (Propper, Manufacturing Inc., Long Island City, NY)) 中并在 AMSCO 灭菌器 (俄亥俄州门托市的思泰瑞公司 (Steris, Mentor, OH)) 中在蒸汽液体循环 (121℃ 下) 中灭菌 30 分钟。

[0403] 然后将条无菌地转移到各个管中。

[0404] 在 0、30 分钟、1 小时、4 小时和 24 小时时间点对每种基底的两个管进行以下观察和分析: (1) 将基底材料从管中取出, 放到 KIMWIPE 上吸干, 然后如上所述用 V 滤光器取得光密度读数, (2) 将每个管中的基底材料的颜色与同一管中的周围培养基的颜色进行比较, 以确定基底比周围培养基更深还是更浅。

[0405] 剩余的管在 56℃ 下进行温育。在以下每个温育时间: 30 分钟、1 小时、4 小时和 24 小时; 从温育器中取出每种样品的 2 个管, 如上所述进行视觉观察和仪器测量。

[0406] 表 22. 加入甲基红后尼龙基底的平均光密度读数, V 滤光器

时间点	GE MAGNAPROBE 尼龙	Bio-Rad ZETA-PROBE 尼龙
0 小时	0.160	0.200
0.5 小时	0.285	0.330
1 小时	0.325	0.376
4 小时	0.205	0.450
24 小时	0.405	0.470

[0408] 表 22 示出了暴露于培养基不同时间长度后尼龙基底材料的光密度读数。每种基底的时间 0 读数为将基底放入培养基中 30 秒内的初始光密度读数。在所有情况下, 尼龙基底的光密度读数在 30 分钟内增大并在整个实验过程中保持升高。

[0409] 表 23. 加入甲基红后尼龙基底颜色与培养基颜色的比较

时间点	GE MAGNAPROBE 尼龙	Bio-Rad ZETA-PROBE 尼龙
0 小时	较浅	较浅
0.5 小时	较深	较深
1 小时	较深	较深
4 小时	较深	较深
24 小时	较深	较深

[0411] 较深 = 基底比培养基明显更深

[0412] 较浅 = 基底比培养基明显更浅

[0413] 在每次从培养基中取出基底材料之前进行读数时,对培养基的颜色和基底的颜色进行视觉比较。观察并报告基底颜色与培养基颜色之间的差异。与培养基接触 30 分钟后,两种尼龙基底材料均比介质培养基明显更深并在整个实验过程中一直较深。

[0414] 实例 7- 溴甲酚紫 (BCP) 的吸收光谱

[0415] 可购自密苏里州圣路易斯西格玛化学公司 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)) 的溴甲酚紫 (BCP) (目录号 B-5880)溶解于 pH 为 7.3 的磷酸盐缓冲液中,其浓度为 0.004。将该溶液放入石英比色杯中并用配有 TECAN Infinity M200 酶标仪 (北卡罗莱纳州达勒姆美国帝肯公司 (Tecan US, Durham, NC))的 1cm 光析槽应接器扫描 UV- 可见吸收光谱。扫描参数见于表 24 中。

[0416] 图 8 的曲线图中示出了结果。可以看到,吸收峰在约 300nm、约 380nm 和约 600nm 波长处。

[0417] 表 24. BCP 吸收光谱的扫描参数

[0418]

模式	荧光顶部读数
发射波长开始	380nm
发射波长结束	650nm
发射波长步长	2nm
发射扫描次数	136
激发波长	350nm
带宽 (Em)	280... 850:20nm
带宽 (Ex) (范围 1)	230... 295:5nm
带宽 (Ex) (范围 2)	296... 850:9nm
增益	80 手动
读取次数	10
积分时间	20ms
滞后时间	0ms
稳定时间	0ms

[0419] 实例 8-7- 羟基 -4- 甲基香豆素 (4- 甲基伞形酮) 的发射光谱

[0420] 将目录号 m1381、可购自密苏里州圣路易斯西格玛化学公司 (Sigma Chemical

Co., St.Louis, MO)) 的 4- 甲基伞形酮 (4MU) 溶解于 pH7.3 的磷酸盐缓冲液中, 其浓度为 0.004mg/mL。将该溶液放入石英比色杯中并用配有 TECAN Infinity M200 酶标仪的 1cm 光析槽应接器记录发射光谱。扫描参数见于表 25 中。

[0421] 结果示于图 8 的曲线图中。可以看到发射峰在约 450nm 的波长处。

[0422] 表 25. 4- 甲基伞形酮 (4MU) 发射光谱的扫描参数。

[0423]

模式	吸光度
波长开始	250nm
波长结束	800nm
波长步长	2nm
扫描次数	276
带宽(范围 1)	230... 295:5nm
带宽(范围 2)	296... 1000:9nm
增益	80 手动
读取次数	10
稳定时间	0ms
板的部分	B1-B1

[0424] 实例 9-BCP 对 4MU 检测的影响

[0425] 将如实例 8 所述制备的 4- 甲基伞形酮 (4MU) 储备溶液在磷酸盐缓冲液中连续稀释至表 26 中所示的浓度。如实例 7 所述在磷酸盐缓冲液中制备溴甲酚紫 (BCP) 储备溶液。将溴甲酚紫 (0.03mg/mL 最终浓度) 与表 26 中所示的对应的 4MU 溶液混合。将对应的每种溶液一式三份 (100 微升 / 孔) 装入 96- 孔板中并用 TECAN Infinity M200 酶标仪测量每个孔中的荧光。激发波长为 350nm, 在 420nm 处检测。表 26 中示出了以相对荧光单位 (RFU) 列出的结果。数据显示, 对于测试的 4MU 的每种浓度而言, 溶液中存在溴甲酚紫会导致可测量荧光减少。

[0426] 表 26- 在存在或不存在 BCP 的情况下 4MU 的荧光检测

[0427]

4MU 浓度 (mg/mL)	4MU, 无 BCP RFU	4MU, 有 BCP RFU
0.004	9725	5761
0.0004	927	582
0.00004	128	94
0.000004	50	40
0	41	37

[0428] 结果为三次重复检测的平均值。所有值都以相对荧光单位 (RFU) 报告。

[0429] 实例 10 用 BCP 和甲基红抑制吡啶橙检测

[0430] 制备孢子生长培养基溶液, 其包含 17g 细菌蛋白胨和 0.17g L- 丙氨酸。将 200 微升 (μL) 生长培养基加入两 (2) 个 96 孔板的每个孔中。

[0431] 制备 pH 指示溶液甲基红 (MR) 和溴甲酚紫 (BCP) 的一系列稀释液, 从 4.8g/L 开始, 稀释至 0.75g/L。制备吡啶橙的一系列稀释液, 从 1:50 开始, 稀释至 1:800。

[0432] 在 1 号板中, 向板的每行中加入 20 μL 合适的 BCP 稀释液, 向 1 号板的每列中加入 20 μL 合适的吡啶橙 (AO) 稀释液。在 2 号板中, 向板的每行中加入 20 μL 合适的甲基红稀释液, 向 2 号板的每列中加入 20 μL 合适的吡啶橙 (AO) 稀释液。1 号板和 2 号板的安排参见表 27。

[0433] 表 27 1 号 96 孔板 BCP 和 2 号板 MR 的安排

[0434]

列: OA 的初始稀释液 行: BCP 或 MR 的初始浓度	A 1:50 AO	B 1:100 AO	C 1:200 AO	D 1:400 AO	E 1:800 AO	F 无 AO
行 1: 4.8g/L BCP 或 MR	-	-	-	-	-	-
行 2: 2.4g/L BCP 或 MR	-	-	-	-	-	-
行 3: 1.2g/L BCP 或 MR	-	-	-	-	-	-
行 4: 0.6g/L BCP 或 MR	-	-	-	-	-	-
行 5: 0.3g/L BCP 或 MR	-	-	-	-	-	-
行 6: 0.15g/L BCP 或 MR	-	-	-	-	-	-
行 7: 0.075g/L BCP 或 MR	-	-	-	-	-	-
行 8: 无 pH 指示剂	-	-	-	-	-	-

[0435] 将 1 号板和 2 号板放入 SYNERGY4 分光光度计中, 在 590nm 处取得吸光度读数。另外, 还收集 435nm/530nm 处的荧光激发 / 发射读数。

[0436] 表 28A. 用 BCP 抑制吡啶橙检测

[0437]

行	1:50 AO		1:100 AO		1:200 AO	
初始[BCP]	590nm	435/530nm	590nm	435/530nm	590nm	435/530nm
4.8g/L BCP	**	94.5	**	111.0	**	88.0
2.4g/L BCP	3.709	173.0	**	176.5	3.991	163.0
1.2g/L BCP	2.189	267.0	2.243	299.5	2.427	338.0
0.6g/L BCP	1.244	399.0	1.236	505.5	1.305	531.5
0.3g/L BCP	0.726	552.0	0.713	717.0	0.645	717.0
0.15g/L BCP	0.401	635.0	0.408	821.0	0.400	904.5
0.075g/L BCP	0.264	670.5	0.274	912.0	0.241	958.0
0 BCP	0.139	758.5	0.128	1059.0	0.101	1114.5

[0438] ** 高于仪器检测阈值的信号

[0439] 表 28B :用 BCP 抑制吡啶橙检测

[0440]

行	1:400		1:800		无 AO	
初始 [BCP]	590	435/530	590	435/530	590	435/530
4.8g/L BCP	**	73.5	**	45.5	**	7.5
2.4g/L BCP	**	105.5	**	80.5	**	16.0
1.2g/L BCP	2.194	255.5	2.488	184.0	2.190	29.5
0.6g/L BCP	1.325	445.0	1.318	289.0	1.223	48.5
0.3g/L BCP	0.684	607.0	0.653	418.0	0.696	67.5
0.15g/L BCP	0.389	746.5	0.373	486.5	0.402	84.5
0.075g/L BCP	0.269	838.0	0.234	535.0	0.278	97.0
0 BCP	0.117	941.0	0.098	635.5	0.123	116.0

[0441] ** 高于仪器检测阈值的信号

[0442] 对于所有吡啶橙浓度而言,当溶液中的溴甲酚紫量减少时,吡啶橙产生的信号增大。换句话讲,BCP 的存在遮蔽了吡啶橙信号。例如,与具有 0BCP 的行相比,对于具有 0.3g/L 的初始 BCP 浓度的行而言,介于约 27% 至 36% 的吡啶橙荧光信号丢失。

[0443] 表 29A. 用甲基红抑制吡啶橙检测

[0444]

行	1:50 AO		1:100 AO		1:200 AO	
初始[MR]	590nm	435/530nm	590nm	435/530nm	590nm	435/530nm
4.8g/L MR	**	364.0	**	473.5	**	540.5
2.4g/L MR	2.211	484.5	3.835	434.5	1.848	470.0
1.2g/L MR	2.466	462.0	1.102	672.5	0.889	579.0
0.6g/L MR	0.733	656.0	1.238	768.5	1.075	612.0
0.3g/L MR	0.571	722.0	0.412	996.0	1.693	882.0
0.15g/L MR	1.123	664.0	0.644	940.5	0.882	891.5
0.075g/L MR	0.588	694.0	0.377	1036.0	0.367	1066.5
0 MR	0.566	741.5	0.390	1048.5	0.303	1053.5

[0445] ** 高于仪器检测阈值的信号

[0446] 表 29B. 用甲基红抑制吡啶橙检测

[0447]

行	1:400 AO		1:800 AO		无 AO	
初始[MR]	590nm	435/530nm	590nm	435/530nm	590nm	435/530nm
4.8g/L MR	0.517	390.0	**	329.0	**	27.0
2.4g/L MR	1.806	476.5	3.764	248.0	3.236	35.0
1.2g/L MR	3.938	401.5	2.821	327.0	2.488	48.5
0.6g/L MR	1.883	599.0	1.571	456.5	1.604	71.0
0.3g/L MR	0.892	733.0	1.398	478.5	0.879	81.5
0.15g/L MR	0.751	741.5	0.441	543.0	0.330	93.5
0.075g/L MR	0.292	891.5	0.293	622.0	0.245	109.0
0 MR	0.275	876.0	0.232	658.0	0.247	116.5

[0448] ** 高于仪器检测阈值的信号

[0449] 与 BCP 一样, 甲基红也遮蔽了吡啶橙荧光信号。甲基红的浓度越高, 可检测到的吡啶橙荧光信号越低。例如, 与没有甲基红的行相比, 对于具有 0.3g/L 的初始甲基红浓度的行而言, 介于约 3% 至 27% 的吡啶橙荧光信号丢失。

[0450] 上面描述并在附图示出的实施例仅以举例的方式呈现, 并无意于作为对本发明的概念和原则的限制。这样, 本领域的普通技术人员应当理解, 在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以对各元件及其结构和安排进行各种改变。以下权利要求书描述了本发明的各种特征和方面。

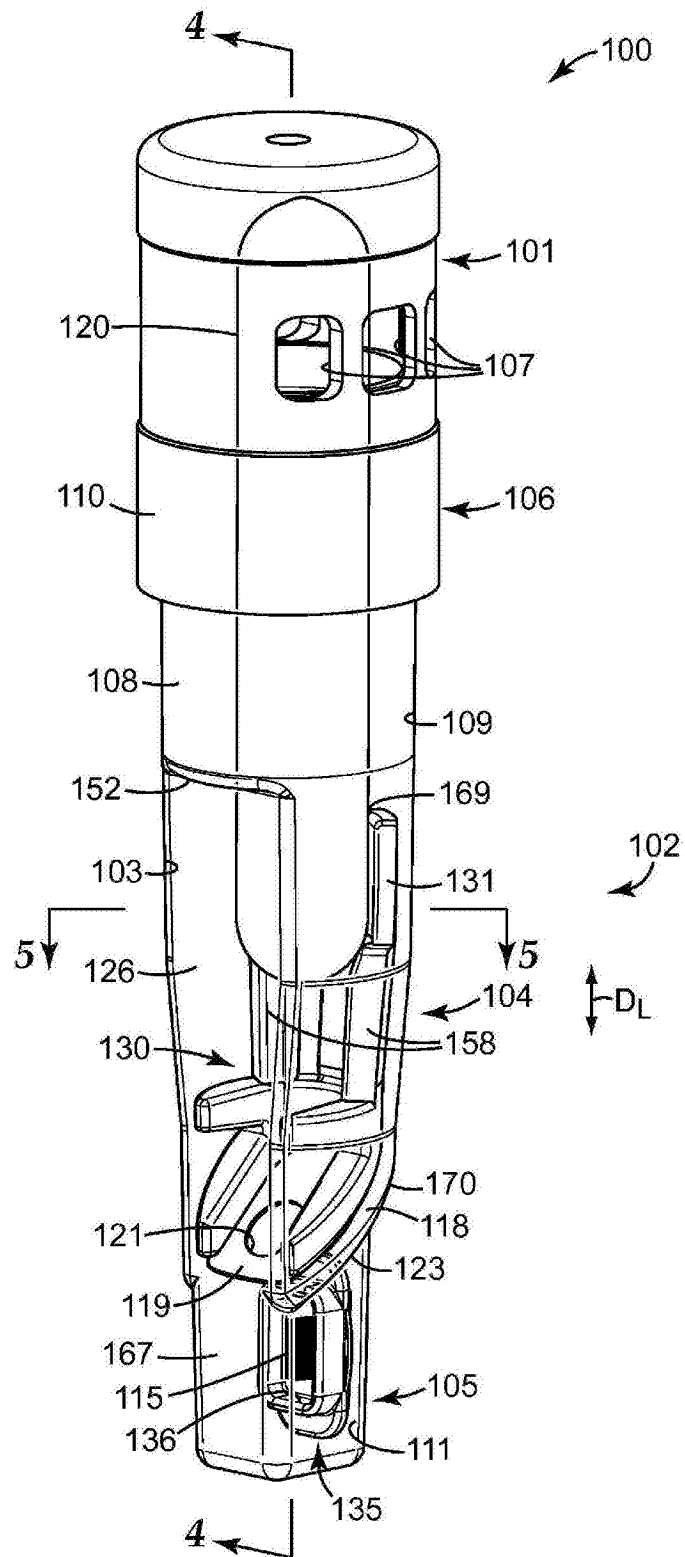


图 1

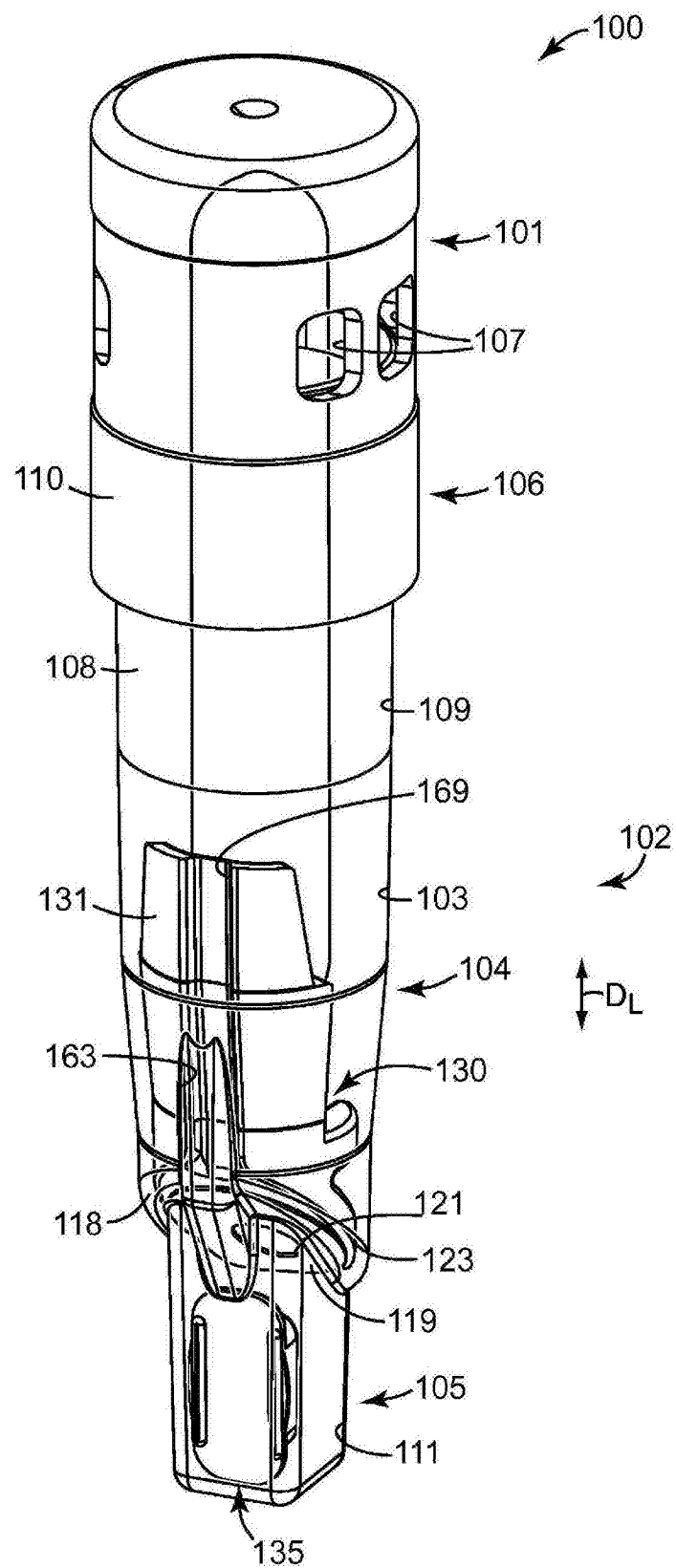


图 2

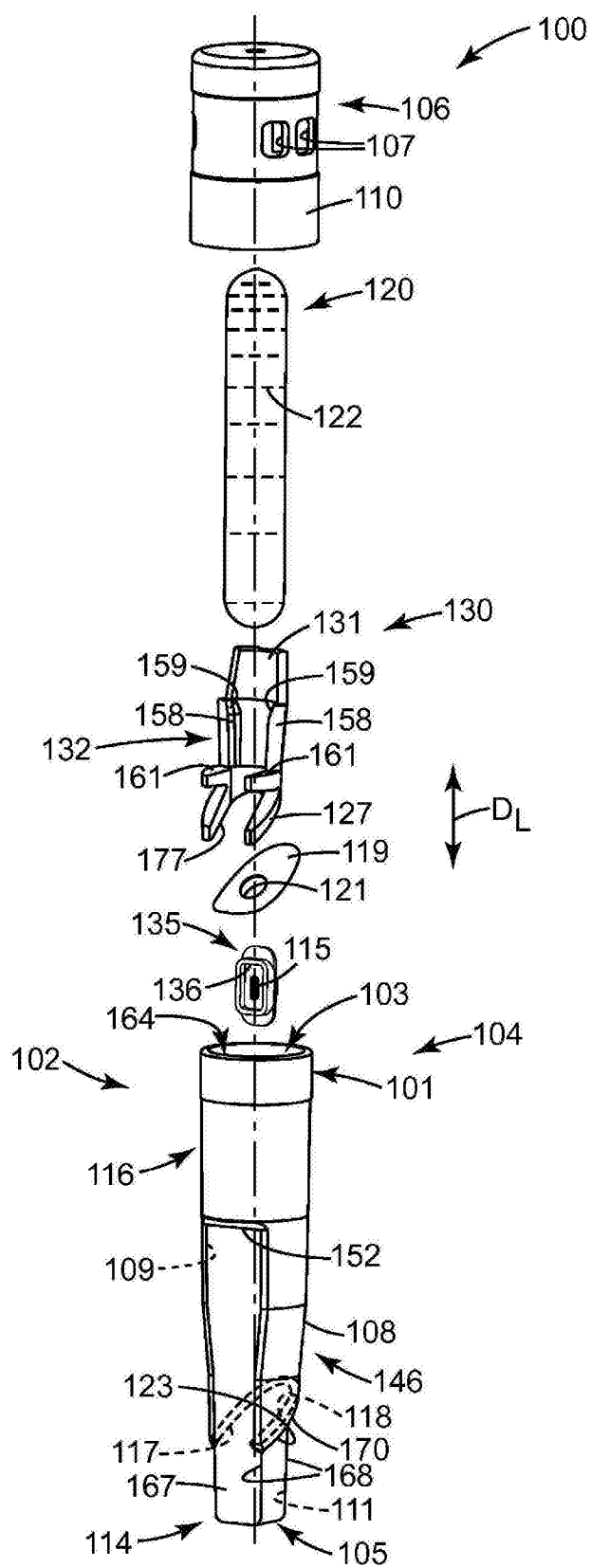


图 3

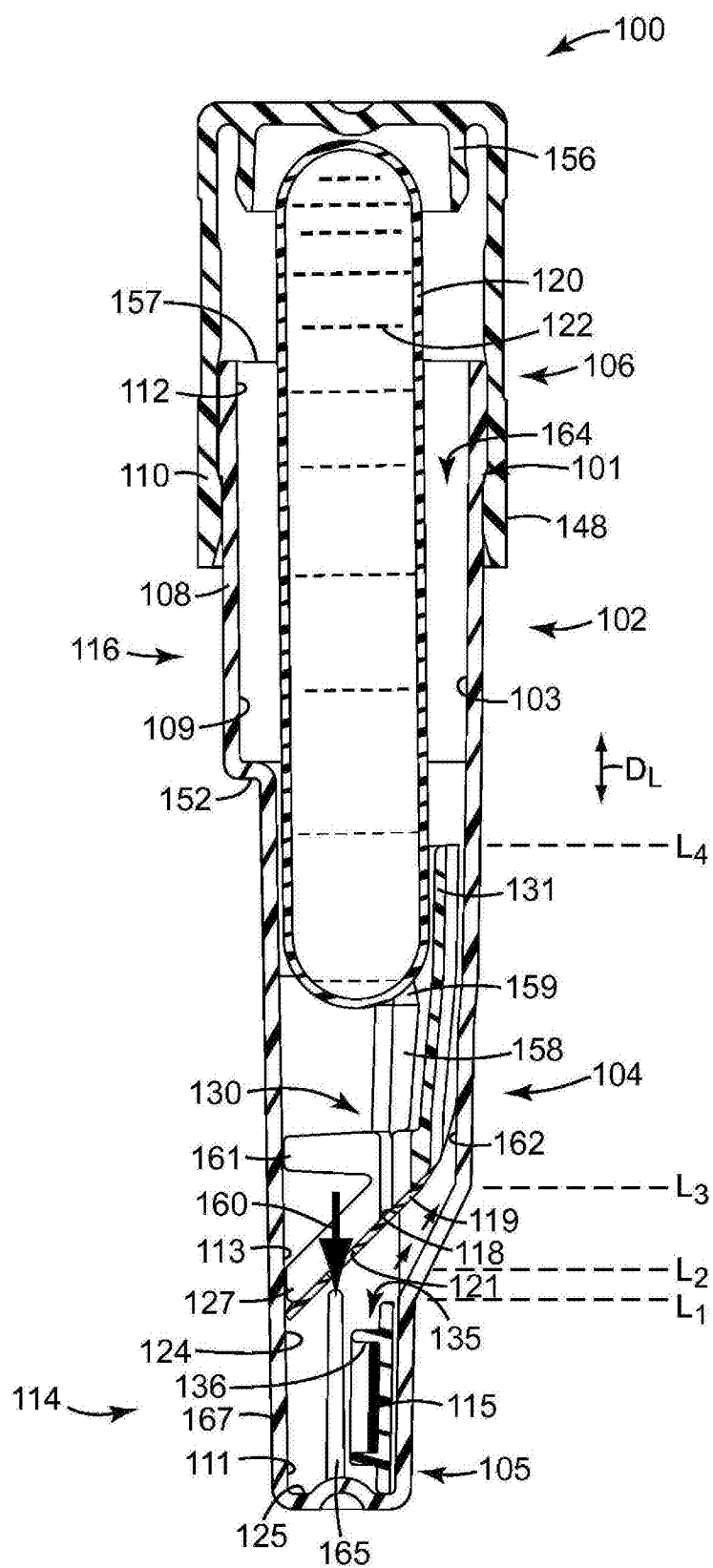


图 4

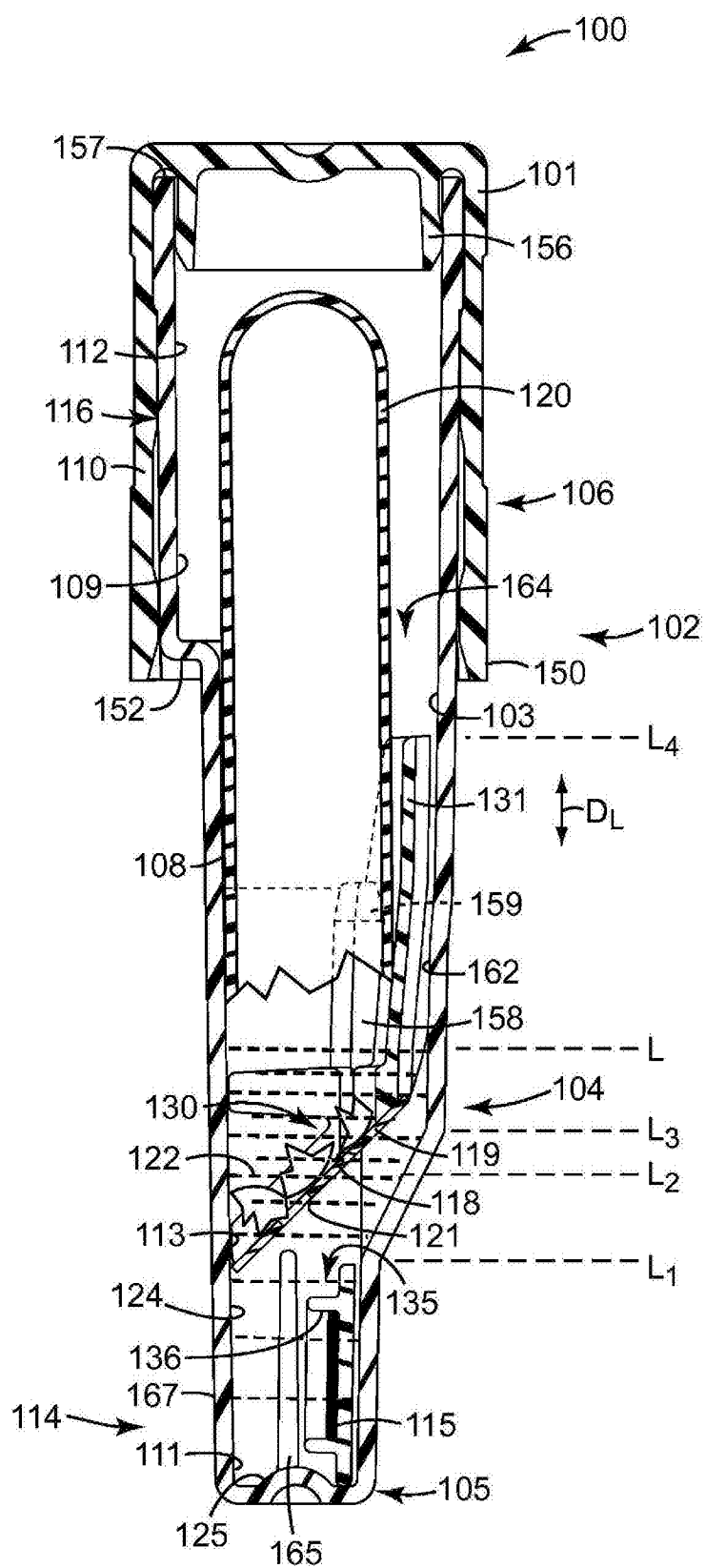


图 6

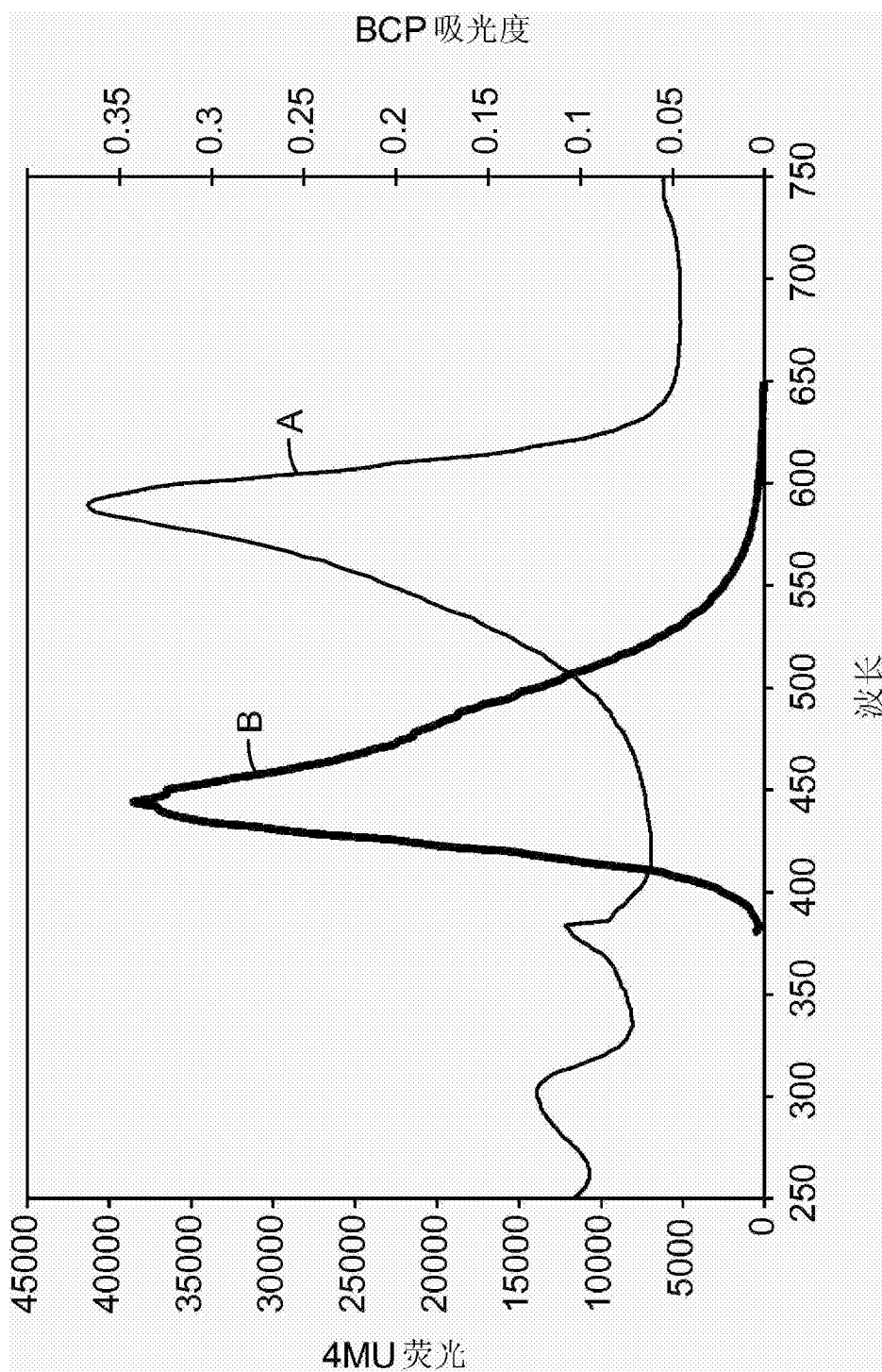


图 8