

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 331**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/22

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09752928 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2344664**

54 Título: **Artículos biológicos y métodos para monitorizar procesos de esterilización**

30 Prioridad:

17.10.2008 US 196415 P

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

01.10.2013

73 Titular/es:

**3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY
(100.0%)**

**3M Center Post Office Box 33427
Saint Paul, MN 55133-3427, US**

72 Inventor/es:

**CHANDRAPATI, SAILAJA;
WEBB, HEATHER M. y
HALVERSON, KURT J.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 424 331 T3

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

DESCRIPCIÓN

Artículos biológicos y métodos para monitorizar procesos de esterilización

5 **Antecedentes**

La monitorización de la eficacia de los procesos usados para esterilizar equipos tales como dispositivos médicos, instrumentos y otros artículos no desechables se lleva a cabo de manera rutinaria en entornos sanitarios y en diversos entornos industriales. Se espera que un proceso de esterilización eficaz destruya completamente todos los microorganismos viables, que incluyen estructuras tales como virus y esporas. Los hospitales, como práctica habitual para ensayar la letalidad de un proceso de esterilización, incluyen un indicador de esterilidad con el lote de artículos a esterilizar. Se han usado indicadores de esterilidad tanto biológicos como químicos.

Un tipo habitual de indicador biológico de esterilidad incluye una cantidad conocida de microorganismos de ensayo, por ejemplo esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (anteriormente *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus atrophaeus* (anteriormente *Bacillus subtilis*), que son muchas veces más resistentes a un proceso de esterilización que la mayor parte de organismos contaminantes. Después de exponer el indicador al proceso de esterilización, las esporas se incuban en medio nutriente para determinar si alguna de las esporas ha sobrevivido al proceso de esterilización, y el crecimiento de las esporas indica que el proceso de esterilización fue insuficiente para destruir todos los microorganismos. En otro ejemplo, después de someterla a un proceso de esterilización, se determina la actividad de una enzima, que se puede correlacionar con la viabilidad de las esporas. Aunque se han hecho avances, el periodo de tiempo para determinar con seguridad si el proceso de esterilización fue eficaz o no puede ser excesivamente largo.

Los indicadores químicos de esterilidad disponibles se pueden leer inmediatamente al final del proceso de esterilización. Sin embargo, los resultados indican solamente que existió una condición particular, tal como la presencia de un producto químico particular o una temperatura durante un cierto periodo de tiempo.

Se considera en general que la respuesta de los organismos vivos a todas las condiciones realmente presentes es un ensayo más directo y fiable del grado de eficacia de un proceso de esterilización en la consecución de la esterilización. Por lo tanto, existe una necesidad continua de indicadores biológicos de esterilidad que puedan indicar la eficacia de un proceso de esterilización sin un retraso excesivo tras la finalización del proceso de esterilización.

El documento US 2004/0023319 describe la enumeración rápida de las esporas viables mediante citometría de flujo. El documento US 5795730 describe un indicador biológico de lectura rápida.

Sumario

La presente invención proporciona un indicador de esterilidad que incluye una composición, y un método para determinar la eficacia de un proceso de esterilización mediante el uso del indicador. La composición incluye esporas resistentes al proceso de esterilización y una cantidad subletal de al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular en combinación con al menos un nutriente. En caso de que cualquiera de las esporas sobreviva a un proceso de esterilización, el colorante puede interaccionar con los ácidos nucleicos presentes al menos durante la germinación (por ejemplo, durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento) de las esporas, por lo que se provoca un incremento de la intensidad de fluorescencia. En ciertas realizaciones, el incremento del contenido de ácidos nucleicos, si existe, y el incremento resultante de la intensidad de fluorescencia se pueden detectar durante o después de un tiempo de incubación corto. En ciertas realizaciones, tal incubación se puede llevar a cabo con las esporas en contacto con un medio de germinación que contiene la combinación de colorante fluorescente y al menos un nutriente. El colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular es lo suficientemente estable al menos a una temperatura para la incubación de las esporas como para producir el incremento de la intensidad de fluorescencia. En ciertas realizaciones, además, el colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular es estable en las condiciones del proceso de esterilización halladas de manera rutinaria por los indicadores biológicos de esterilización.

En una realización, se proporciona un indicador de un proceso de esterilización que comprende:

un soporte que sostiene una diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización;

un recipiente impermeable a microorganismos e impermeable a un esterilizante, y el recipiente contiene un medio de germinación que comprende una cantidad subletal de al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y al menos un nutriente para la germinación de las esporas;

en el que el al menos un colorante fluorescente con permeabilidad celular puede interaccionar con los ácidos nucleicos presentes en, y producidos por, la diversidad de esporas durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas para producir un incremento de la intensidad de fluorescencia en comparación con

una intensidad de fluorescencia anterior a la germinación de las esporas, lo que indica que existen esporas viables, y en el que el colorante fluorescente con permeabilidad celular es lo suficientemente estable al menos a una temperatura para la incubación de las esporas como para producir el incremento de la intensidad de fluorescencia.

5 en el que el soporte está en posición adyacente al recipiente y separado del medio de germinación.

En una realización adicional, se proporciona un método para determinar la eficacia de un proceso de esterilización, y el método comprende:

10 proporcionar un indicador del proceso de esterilización que comprende:

un soporte que sostiene una diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización;

15 un recipiente impermeable a microorganismos e impermeable a un esterilizante, y el recipiente contiene un medio de germinación que comprende una cantidad subletal de al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y al menos un nutriente para la germinación de las esporas;

20 en el que el al menos un colorante fluorescente con permeabilidad celular puede interaccionar con los ácidos nucleicos presentes en, y producidos por, la diversidad de esporas durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas para producir un incremento de la intensidad de fluorescencia en comparación con una intensidad de fluorescencia anterior a la germinación de las esporas, lo que indica que existen esporas viables, y en el que el colorante fluorescente con permeabilidad celular es lo suficientemente estable al menos a una temperatura para la incubación de las esporas como para producir el incremento de la intensidad de fluorescencia; y

25 en el que el soporte está en posición adyacente al recipiente y separado del medio de germinación;

colocar el indicador del proceso de esterilización en una cámara de esterilización;

30 exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante;

combinar la diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización y el medio de germinación;

incubar las esporas con el medio de germinación;

35 y

medir el incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe.

Definiciones

40 La expresión "cantidad subletal" se refiere a una cantidad, por ejemplo, una concentración, de colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular que permite la producción de una señal fluorescente suficiente sin tener un impacto adverso sobre la viabilidad de las esporas, las esporas en germinación o las células vegetativas. Con la suficiente señal fluorescente se puede detectar el incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe.

50 La expresión "con permeabilidad celular" se refiere a un colorante que se transporta o que es capaz de pasar de manera pasiva o activa a través del recubrimiento de las esporas y/o de la membrana celular lo suficiente como para entrar en contacto con los ácidos nucleicos de las esporas, las esporas en germinación, o las células vegetativas sin la ayuda de ningún agente usado para hacer el recubrimiento de las esporas y/o la membrana celular más permeable a las moléculas de colorante.

55 Los números, E5, E6, y E7 se usan de manera intercambiable en la presente memoria con 10^5 , 10^6 , y 10^7 , respectivamente.

El término "que comprende" y las variaciones del mismo (p.ej., comprende, incluye, etc.) no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y las reivindicaciones.

60 Tal como se usa en la presente memoria, "un", "una", "el", "al menos uno", y "uno o más" se usan de manera intercambiable, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera.

Además en la presente memoria, las menciones de intervalos numéricos por los extremos incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (p.ej., 500 a 7000 nm incluye 500, 530, 551, 575, 583, 592, 600, 620, 650, 700, etc.).

65 El sumario anterior de la presente invención no pretende describir cada realización descrita o cada implementación

de la presente invención. La descripción siguiente ejemplifica más en particular las realizaciones ilustrativas.

Descripción breve de las figuras

5 La FIG. 1 es una vista transversal de una realización de un indicador de esterilidad de la presente invención, sin la tapa 26.

La FIG. 2 es una vista en perspectiva detallada del indicador de esterilidad de la FIG. 1, con la tapa 26 incluida.

10 Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas de la invención

Como se indicó anteriormente, se proporcionan composiciones de indicador biológico de esterilidad que pueden detectar esporas viables durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas, mediante el uso de una cantidad subletal de al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y al menos un nutriente para la germinación de las esporas. El colorante es estable al menos a una temperatura para la incubación de las esporas. Tales temperaturas se pueden hallar cuando se incuban las esporas con el medio de germinación, que incluye el al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y el al menos un nutriente. Para ciertas realizaciones, preferiblemente el colorante es estable a las temperaturas de esterilización, que pueden ser significativamente mayores que una temperatura para la incubación de las esporas.

25 Las composiciones de indicador biológico de esterilidad se pueden usar de manera ventajosa en indicadores biológicos de esterilidad, tales como los descritos en la presente memoria. Las composiciones y los indicadores que contienen las composiciones son útiles en la determinación de la eficacia de un proceso de esterilización, tal como en el método, descrito en la presente memoria, de determinación de la eficacia de un proceso de esterilización.

30 Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones de los indicadores, o métodos descritas en la presente memoria, el al menos un colorante fluorescente con permeabilidad celular puede interaccionar con ácidos nucleicos presentes en y producidos por la diversidad de esporas durante la germinación de las esporas para producir el incremento de la intensidad de fluorescencia. La interacción del colorante con los ácidos nucleicos durante la germinación proporciona una indicación temprana de las esporas viables, si existen.

35 Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones de los indicadores o métodos descritas en la presente memoria, el al menos un colorante fluorescente con permeabilidad celular puede interaccionar con ácidos nucleicos presentes en y producidos por la diversidad de esporas durante la germinación y el crecimiento de las esporas para producir el incremento de la intensidad de fluorescencia. La interacción del colorante con los ácidos nucleicos presentes también durante el crecimiento de las esporas puede ser útil también, por ejemplo, al proporcionar un incremento mayor de fluorescencia cuando existen esporas viables.

40 Actualmente se conocen y se usan varios procesos de esterilización, que incluyen, por ejemplo, la exposición a vapor, calor seco, agentes gaseosos o líquidos tales como óxido de etileno, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, y ozono, y radiación. La diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización se puede seleccionar según el proceso de esterilización a usar. Se puede usar cualquier espóra, con tal de que proporcione una resistencia suficiente a las condiciones del proceso de esterilización, de forma que las esporas son más resistentes a las condiciones del proceso de esterilización que la mayoría de los microorganismos hallados en la contaminación natural. Por ejemplo, para un proceso de esterilización con vapor, se puede usar *Gb. stearothermophilus* (anteriormente *Bacillus stearothermophilus*). En otro ejemplo, para un proceso de esterilización con óxido de etileno, se puede usar *B. atrophaeus* (anteriormente *B. subtilis*). Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de las composiciones, indicadores, y métodos, la diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización se selecciona del grupo que consiste en *Gb. stearothermophilus*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus coagulans*, y una combinación de las mismas. Para algunas de estas realizaciones, la diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización se selecciona del grupo que consiste en *Gb. stearothermophilus*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium*, y una combinación de las mismas.

55 A modo de ejemplo solamente, la presente descripción describe los microorganismos usados en el indicador biológico de esterilización como "esporas"; sin embargo, se debería entender que el tipo de microorganismo (p.ej., espóra) usado en una realización particular del indicador biológico de esterilización se selecciona por ser sumamente resistente al proceso de esterilización particular contemplado. Por lo tanto, las diferentes realizaciones de la presente descripción pueden usar microorganismos diferentes, dependiendo del proceso de esterilización para el que se destina la realización particular.

65 Mediante el uso de colorantes fluorescentes que interaccionan con ácidos nucleicos con permeabilidad celular, las presentes composiciones, indicadores, y métodos pueden detectar la presencia de ácidos nucleicos dentro de las esporas y un incremento del contenido de ácidos nucleicos dentro de las esporas cuando se da tal incremento. Durante la germinación de las esporas, el desplazamiento del estado metabólico de las esporas desde la inactividad hasta el crecimiento requiere un incremento concomitante del contenido de ácidos nucleicos.

Se sabe que los colorantes fluorescentes con permeabilidad celular son tóxicos o mutagénicos para los microorganismos. Sin embargo, se ha descubierto que los colorantes con permeabilidad celular se pueden usar en una cantidad que es subletal para los microorganismos, y que todavía proporciona un incremento de fluorescencia durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de los microorganismos. Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de las composiciones, indicadores, y métodos, la concentración del colorante fluorescente con permeabilidad celular en el medio no es mayor de 0,10 mM, 0,05 mM, o 0,01 mM. Para algunas de estas realizaciones, la concentración del colorante no es menor de 0,0001 mM, 0,0005 mM, o 0,001 mM.

En algunos, si no todos, los procesos de esterilización en uso, se incluye o se puede hallar en el proceso una temperatura elevada, por ejemplo, 50 °C, 100 °C, 121 °C, 132 °C, 134 °C, o similar. Por lo tanto, para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de las composiciones, indicadores, y métodos, los colorantes fluorescentes que interaccionan con ácido nucleico con permeabilidad celular son estables a las temperaturas de esterilización.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de indicadores, y métodos, el colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular es estable a una temperatura de hasta al menos 121 °C. Para algunas de estas realizaciones, el colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular es estable a una temperatura de hasta al menos 132 °C. Para algunas de estas realizaciones, el colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular es estable a una temperatura de hasta al menos 134 °C.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de indicadores, o métodos, el medio está esencialmente exento de fluorescencia de fondo a las longitudes de onda de emisión y excitación usadas para detectar el incremento de la intensidad de fluorescencia. Esto puede proporcionar una sensibilidad mejorada durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas viables, si existen, ya que se minimiza cualquier nivel de fluorescencia de fondo que se dé a las mismas longitudes de onda de emisión y de excitación del colorante que interacciona con un ácido nucleico.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de indicadores, o métodos, el medio está esencialmente exento de ácidos nucleicos distintos de los ácidos nucleicos presentes en y producidos por la diversidad de esporas. Esto puede proporcionar una sensibilidad mejorada durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas viables, si existen, ya que se minimiza cualquier nivel de fluorescencia de fondo que resulte de la interacción del colorante con ácidos nucleicos que no han sido producidos por la diversidad de esporas.

El colorante con permeabilidad celular tiene un nivel inferior de fluorescencia a la longitud de onda de emisión (o intervalo de longitudes de onda) cuando no está interaccionando con un ácido nucleico, y un nivel superior de fluorescencia a esta longitud de onda cuando está interaccionando con un ácido nucleico. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cuando no está interaccionando con un ácido nucleico, el colorante con permeabilidad celular tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia de menos de 0,1, preferiblemente menos de 0,05, más preferiblemente no más de 0,01. En algunas de estas realizaciones, cuando está interaccionando con un ácido nucleico, el colorante con permeabilidad celular tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia de al menos 0,1, preferiblemente al menos 0,2, más preferiblemente al menos 0,4.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de indicadores, o métodos, el colorante fluorescente con permeabilidad celular es un colorante que interacciona con ADN, ARN, o ADN y ARN. La interacción del colorante con ADN y ARN puede ser igual o diferente. El colorante al interaccionar con ADN puede tener un máximo de excitación y/o emisión diferente que el del mismo colorante al interaccionar con ARN.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de indicadores, o métodos, el colorante fluorescente con permeabilidad celular es un colorante que interacciona con los ácidos nucleicos en una diversidad de maneras conocidas en la técnica, que incluyen la intercalación, atracción electrostática, interacción de cargas, interacción hidrófila-hidrófoba, o una combinación de las mismas. Como se indicó anteriormente, esta interacción o unión del colorante con los ácidos nucleicos, que incluyen los ácidos nucleicos celulares totales, tales como ADN, ARN (mARN, rARN, tARN), y los ácidos nucleicos extracromosómicos, provoca un incremento relativamente grande de la fluorescencia del colorante. Para algunas de estas realizaciones, el colorante fluorescente con permeabilidad celular se selecciona del grupo que consiste en naranja de acridina, un colorante de cianina asimétrica sustituida, y una combinación de las mismas. El naranja de acridina unido a un ADN tiene un máximo de excitación a alrededor de 490 nm y un máximo de emisión a alrededor de 520 nm, pero cuando está unido a un ARN son de alrededor de 530 nm y 620 nm, respectivamente. Véase MacInnes, J. W y McClintock, M., Differences in Fluorescence Spectra of Acridine Orange-DNA Complexes Related to DNA Base Composition, Biopolymers. Communications to the editor, Vol 9, páginas 1407-1411 (1970). Para ciertas realizaciones, la fluorescencia en el máximo de emisión del colorante unido al ARN se puede usar para indicar la germinación de las esporas viables. Esto puede ser útil cuando la cantidad de ARN se incrementa más rápidamente que la cantidad de

ADN en las esporas en germinación, lo que permite una determinación más temprana de si existen o no esporas viables.

Los ejemplos adecuados de colorantes de cianina asimétrica sustituida incluyen colorantes disponibles con el nombre comercial SYTO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Los colorantes SYTO son permeables para muchas, si no todas, membranas celulares, pero pueden diferir entre sí, por ejemplo, en el grado de permeabilidad celular, la cantidad del incremento de intensidad de fluorescencia cuando se unen a un ácido nucleico, los máximos de excitación y emisión, la selectividad en la unión al ADN y ARN, y la afinidad de unión al ADN y ARN. Véase Tamok, Cytometry Part A, 73A, 477-479 (2008). Para ciertas realizaciones, preferiblemente el colorante de cianina asimétrica sustituida es SYTO 24 o SYTO 64. SYTO 24 tiene un máximo de excitación a 490 nm y un máximo de emisión a 515 nm. SYTO 64 tiene un máximo de excitación a 599 nm y un máximo de emisión a 619 nm.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de indicadores, y métodos, preferiblemente el incremento de la intensidad de fluorescencia es a una longitud de onda de 500 nm a 700 nm, preferiblemente 500 nm a 675 nm. Este intervalo de longitudes de onda puede ser ventajoso, ya que tal fluorescencia puede no verse ocultada o puede verse significativamente menos ocultada por la absorbancia o fluorescencia de otros componentes del medio de germinación, lo cual ocurre a menudo a longitudes de onda más cortas, tales como las longitudes de onda menores de 500 nm o menores de 400 nm.

El al menos un nutriente induce la germinación, y también puede posibilitar el crecimiento de las esporas, si son viables, con la producción simultánea de ácidos nucleicos. Además, se ha descubierto que la presencia del al menos un nutriente con el colorante reduce la toxicidad efectiva del colorante con respecto a las esporas. El nutriente incluye uno o más carbohidratos, por ejemplo, glucosa, fructosa, celibiosa, o similares. El nutriente puede incluir también una sal, tal como cloruro potásico, cloruro cálcico, o similares. El nutriente puede incluir también al menos un aminoácido, por ejemplo, al menos uno de metionina, fenilalanina, y triptófano. El medio de germinación puede incluir también otro u otros materiales con el nutriente. Se pueden usar las cantidades de tales nutrientes y materiales, así como otros nutrientes conocidos en la técnica para inducir la germinación y el crecimiento inicial de las esporas resistentes al proceso de esterilización. Los componentes de los medios y las concentraciones se conocen y se describen, por ejemplo, en el documento WO 99/05310 (Tautvydas) y Zechman et al., J. Food, Sci., 56, 5, págs. 1408-1411 (1991), mencionado como Zechman y Pflug, 1991.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones de los indicadores, o métodos descritas en la presente memoria, el medio de germinación comprende además un componente de apagamiento colisional. Tales componentes reducen la señal de fluorescencia de fondo del colorante con permeabilidad celular libre (sin unir al ácido nucleico) por medio del apagamiento colisional. Los ejemplos de especies que se sabe que apagan de manera colisional la fluorescencia incluyen los compuestos orgánicos tales como purinas, pirimidinas, aminas alifáticas, y nitróxidos, ciertos iones, por ejemplo, aniones nitrato e iones metálicos disueltos. Otras especies que se sabe que apagan de manera colisional la fluorescencia se describen, por ejemplo, en Principles of Fluorescence Spectroscopy, capítulo 9, Joseph R. Lakowicz, Plenum Press, 1983.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones de los indicadores, o métodos descritas en la presente memoria, el medio de germinación comprende además al menos un colorante de referencia. El colorante de referencia no se une a los ácidos nucleicos, pero responde de forma similar a la de los colorantes con permeabilidad celular a los cambios de temperatura o los cambios en el medio inducidos por la germinación y el crecimiento de las esporas, por ejemplo un incremento o disminución del pH, fuerza iónica, o cambio de concentración de los subproductos metabólicos que alteran la señal fluorescente. Mediante la monitorización del colorante de referencia, la señal de la unión del colorante con permeabilidad celular al ácido nucleico se puede distinguir de la señal producida a partir de un cambio de la temperatura o un cambio en el medio. El colorante de referencia preferiblemente emite fluorescencia a una longitud de onda diferente de la del colorante con permeabilidad celular.

El medio de germinación y las esporas resistentes al proceso de esterilización se mantienen por separado pero en estrecha proximidad entre sí para facilitar la combinación del medio y de las esporas cuando se desee, por ejemplo, tras la exposición a un proceso de esterilización, y después la incubación para determinar si existen o no esporas viables, tal como se indicaría mediante un incremento de la intensidad de fluorescencia, o tras la exposición a un proceso de esterilización pero sin incubación para determinar una intensidad de fluorescencia inicial o de fondo. Por ejemplo, se puede medir un nivel de fluorescencia de fondo a una longitud de onda particular. Por lo tanto, para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de las composiciones, indicadores, y métodos, la diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización y el medio de germinación están separadas entre sí y adyacentes entre sí.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de indicadores, y métodos, el medio de germinación es una disolución o suspensión acuosa. El al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y el al menos un nutriente para la germinación de las esporas se pueden disolver o suspender en el medio acuoso. La concentración del al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular en el medio depende del nivel mínimo

necesario para proporcionar un incremento de la intensidad de fluorescencia durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas, y del nivel máximo que pueden tolerar las esporas sin un efecto adverso significativo sobre la germinación de las esporas. Los ejemplos de las concentraciones de colorante que se pueden usar se describieron anteriormente, así como en los Ejemplos más adelante. Cuando existen esporas viables, el incremento de la intensidad de fluorescencia se puede dar en menos de 1 hora, preferiblemente menos de 30 minutos, más preferiblemente menos de 15 minutos.

En una alternativa, para ciertas realizaciones, el medio de germinación está en forma seca. El al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y el al menos un nutriente se pueden secar juntos o por separado para formar una película o una capa sobre una película de soporte o sobre un material de soporte, opcionalmente con una forma deseada, o se pueden mezclar juntos o por separado en forma de sólidos secos para formar un/varios comprimido(s), comprimido(s) oblongo(s), o cápsula(s). Cualquiera de estas formas se puede mantener en posición adyacente a las esporas, y se puede añadir agua o un tampón acuoso en un momento adecuado para incubar las esporas con la suspensión o disolución de medio resultante. Cuando se resuspende o se disuelve, el medio resultante puede ser un líquido o un gel. Cualquier realización adicional de un medio en forma seca, que se puede usar en las realizaciones de las composiciones, indicadores, y métodos descritas en la presente memoria se describen en la solicitud de patente de los EE.UU. pendiente junto con la presente de N° de serie 61/196.438 (Chandrapati et al.), presentada el 17 de octubre de 2008, titulada Indicador Biológico de Esterilización, Sistema y Métodos de Uso de los Mismos.

Cuando se incuban las esporas con el medio de germinación, se puede usar una temperatura de incubación superior a la temperatura ambiente. Para ciertas realizaciones, la temperatura de incubación es al menos 37 °C. Para ciertas realizaciones, preferiblemente la temperatura de incubación es al menos 50 °C. Para ciertas realizaciones, la temperatura de incubación es 50 a 60 °C.

Como se indicó anteriormente, el indicador del proceso de esterilización proporcionado en la presente memoria comprende un soporte que sostiene una diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización. Para ciertas realizaciones, el soporte es un material laminar tal como papel, tela tejida, tela no tejida, plástico, un material polimérico, un material polimérico microporoso, hoja de metal, vidrio, porcelana, cerámica, o similares, o una combinación de los mismos. Para ciertas realizaciones, el material laminar es absorbente para el agua o se puede humedecer para ayudar a poner el medio de germinación en contacto íntimo con las esporas en el momento adecuado.

El indicador del proceso de esterilización también comprende un recipiente, que contiene el medio de germinación sin permitir que el esterilizante o cualquier microorganismo entre en el recipiente. Como se indicó anteriormente, el soporte está en posición adyacente al recipiente para facilitar la puesta en contacto con las esporas, sostenidas por el soporte, con el medio de germinación cuando se va a iniciar la incubación. El recipiente se puede abrir fácilmente para poner en contacto las esporas con el medio expulsando un tapón, aplastando o perforando el recipiente, o similares. El recipiente puede estar equipado con un tapón, o al menos una porción del recipiente puede ser de un material rompible, tal como vidrio (p.ej., una ampolla de vidrio) u otro material, que se puede romper mediante presión física, pero lo suficientemente duro como para permanecer intacto durante la fabricación, el almacenamiento, el transporte, y las condiciones de esterilización.

Se pueden usar construcciones de indicadores de un proceso de esterilización biológica conocidas, tales como las descritas en la patente de EE.UU. N° 5.073.488 (Matner et al.) con las composiciones anteriormente descritas. También se pueden usar otras construcciones de indicadores, tales como las descritas en la solicitud de patente de EE.UU. de N° de serie 61/196.438 (Chandrapati et al.), presentada el 17 de octubre de 2008, titulada Indicador Biológico de Esterilización, Sistema y Métodos de Uso de los Mismos. Una realización del indicador del proceso de esterilización descrito en la presente memoria se muestra en las FIGS. 1 y 2. El indicador incluye una caja 10 que tiene una cámara abierta 14 definida por paredes 12 impermeables a gases y líquidos. Las realizaciones alternativas para estas estructuras se muestran en la solicitud de patente de EE.UU. de N° de serie 61/196.438 (Chandrapati et al.), presentada el 17 de octubre de 2008, titulada Indicador Biológico de Esterilización, Sistema y Métodos de Uso de los Mismos. La caja se muestra como un tubo circular, pero se pueden usar otras configuraciones conocidas. Las paredes son preferiblemente transparentes o traslúcidas hasta el punto de que se puede medir una intensidad de fluorescencia a una longitud de onda particular. Los materiales adecuados para las paredes pueden incluir vidrio, policarbonato, polipropileno, poliéster, y similares. Para ciertas realizaciones, al menos una pared de la caja transmite al menos un 90% de la luz incidente en un intervalo de longitudes de onda de al menos 500 a 700 nm, preferiblemente al menos 500 a 675 nm. La cámara contiene un soporte 16, por ejemplo, una lámina de papel, vidrio, o lámina polimérica, con un número predeterminado de esporas viables resistentes al proceso de esterilización sostenidas por el soporte.

El recipiente 18, que contiene el medio de germinación 20, se muestra dentro de la cámara 14. De manera alternativa, el recipiente 18 se puede colocar fuera y en posición adyacente a la cámara 14. El recipiente 18, que está sellado, puede ser una ampolla rompible, pero de manera alternativa podría ser un recipiente equipado con un tapón, u otro mecanismo que cuando se activa permite que el medio de germinación 20 entre en contacto con el soporte 16 y las esporas sostenidas en él. El recipiente 18 se muestra como una ampolla alargada, pero también se

pueden usar otras configuraciones conocidas.

El soporte 16 se muestra entre el recipiente 18 y la pared 12 de la caja 10 para facilitar la determinación de un cambio de la intensidad de fluorescencia a través de la pared 12. De manera alternativa, se puede usar una porción de la pared 12 como soporte 16. Se pueden usar otras colocaciones para el soporte 16, por ejemplo, se puede usar la colocación en posición adyacente a la pared inferior 12A. Al soporte 16 se le puede dar una forma para ajustarse a esta colocación basándose en la forma de la caja 10, o la pared inferior 12A se puede usar por sí misma como soporte 16. Para ciertas realizaciones, el soporte 16 transmite al menos un 90% de la luz incidente dentro de un intervalo de longitudes de onda de al menos 500 a 700 nm, preferiblemente al menos 500 a 675 nm. La apertura 15 para la cámara 14 está equipada con una pieza de cierre 22 impermeable a microorganismos y transmisora de gases, que se puede adherir a la caja 10 mediante un adhesivo, un sello térmico, o similares. De manera alternativa, la pieza de cierre 22 se puede sujetar a la abertura 15 con una tapa 26 que tiene un orificio 28. Durante la exposición a un esterilizante, el esterilizante pasa a través de la pieza de cierre 22, entra en la cámara 14, y entra en contacto con las esporas del soporte 16. Se muestran realizaciones alternativas para estas estructuras de la solicitud de patente de EE.UU. de N° de serie 61/196.438 (Chandrapati et al.), presentada el 17 de octubre de 2008, titulada Indicador Biológico de Esterilización, Sistema y Métodos de Uso de los Mismos.

El método proporcionado en la presente memoria para determinar la eficacia de un proceso de esterilización incluye proporcionar cualquiera de las realizaciones anteriores de un indicador de un proceso de esterilización y colocar el indicador del proceso de esterilización en una cámara de esterilización. Los esterilizadores, muchos de los cuales están disponibles comercialmente, incluyen una cámara de esterilización, que en general tiene un tamaño para contener una diversidad de artículos a esterilizar, y están equipados con un medio para evacuar el aire y/u otros gases de la cámara y añadir un esterilizante a la cámara. El indicador biológico de esterilización se puede colocar en la parte más difícil del esterilizador (p.ej., encima del desagüe). De manera alternativa, el indicador biológico de esterilización se puede colocar en posición adyacente a un artículo a esterilizar cuando se coloca en la cámara de esterilización. Además, el indicador biológico de esterilización se puede adaptar a dispositivos de exposición al proceso antes de colocarlo en un esterilizador.

El método incluye exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante. El esterilizante se puede añadir a la cámara de esterilización después de evacuar la cámara de al menos una porción de cualquier aire u otro gas presente en la cámara. De manera alternativa, el esterilizante se puede añadir a la cámara de esterilización sin evacuar la cámara. A menudo se usa una serie de etapas de evacuación para asegurar que el esterilizante alcanza todas las áreas dentro de la cámara de esterilización y entra en contacto con todas las áreas de el/los artículo(s) a esterilizar. Cuando el esterilizante se añade a la cámara de esterilización, el esterilizante también entra en contacto con las esporas en condiciones en las que el esterilizante alcanza todas las áreas dentro de la cámara de esterilización.

El método también incluye combinar la diversidad de esporas resistentes a la esterilización y el medio de germinación, por lo que se ponen en contacto las esporas y el medio de germinación. Esto se puede realizar después de haber completado el proceso de esterilización, es decir, después de haber proporcionado condiciones para que el esterilizante alcance todas las áreas dentro de la cámara de esterilización durante un tiempo y a una temperatura que se cree que es suficiente para destruir cualquier microorganismo presente dentro de la cámara de esterilización. El medio que contiene el colorante fluorescente con permeabilidad celular se puede combinar con las esporas, y las esporas y el medio combinados se pueden incubar como se describió anteriormente. La intensidad de fluorescencia se puede monitorizar y medir continuamente o intermitentemente mientras se incuban las esporas con el medio de germinación.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de los métodos, el método comprende además determinar si existen o no esporas viables, después de exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante, midiendo el incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe, mientras se incuban las esporas con el medio de germinación, y determinar una velocidad de incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe. Para ciertas realizaciones, la germinación de las esporas resistentes a la esterilización se puede detectar como una velocidad del incremento de la intensidad de fluorescencia a lo largo de al menos una porción del tiempo de incubación. Esta velocidad puede ser lineal, exponencial, o similar, con respecto al tiempo de incubación. Se puede calcular una constante de velocidad y usarla como un indicador de la germinación de las esporas y, por lo tanto, de la presencia de esporas viables.

Las esporas viables, si existen, tras el contacto con el medio y las condiciones de incubación, experimentan una serie de cambios, que incluyen la producción *de novo* de ADN, ARN, y otros ácidos nucleicos extracromosómicos. El cambio detectable resultante del colorante al interaccionar con los ácidos nucleicos se puede medir midiendo los cambios de propiedades ópticas tales como la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda particular. Tales medidas se pueden llevar a cabo de manera conveniente mediante el uso de instrumentos conocidos tales como un fluorímetro, luminómetro, o similares. Para ciertas realizaciones, preferiblemente el cambio detectable se mide midiendo la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda particular.

En una alternativa, una porción o toda la etapa de incubación se puede llevar a cabo antes de medir cualquier

incremento de la intensidad de fluorescencia. Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de los métodos, distintas de aquellas en las que se determina una velocidad de incremento de la intensidad de fluorescencia, el método comprende además determinar si existen o no esporas viables después de exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante, midiendo el incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe, después de incubar las esporas con el medio de germinación en comparación con antes de incubar las esporas con el medio de germinación.

En otra alternativa, la incubación se puede llevar a cabo con el colorante que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular por separado del al menos un nutriente, en la que las esporas se incuban con el medio que contiene el al menos un nutriente, y posteriormente se añade un medio que contiene el colorante a las esporas incubadas. Después se puede medir cualquier incremento de la intensidad de fluorescencia por encima de un umbral.

En las realizaciones anteriores de los métodos, opcionalmente una intensidad de fluorescencia de la combinación de esporas y medio de germinación inmediatamente después de la combinación puede servir como fluorescencia inicial o umbral con la que se pueden comparar las medidas de la intensidad de fluorescencia posteriores. Una intensidad de fluorescencia que es mayor que la fluorescencia inicial durante o después de incubar la combinación puede indicar que existen esporas viables. Para ciertas realizaciones, una intensidad de fluorescencia que es al menos un 10 por ciento, preferiblemente, al menos un 5 por ciento mayor que el valor inicial indica que existen esporas viables.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de los métodos, se determina si existen o no nada más que 100 esporas viables, y en las que la incubación se lleva a cabo durante no más de 8 horas. Para algunas de estas realizaciones, preferiblemente la incubación se lleva a cabo durante no más de 1 hora. Para algunas de estas realizaciones, más preferiblemente la incubación se lleva a cabo durante no más de 30 minutos. Para algunas de estas realizaciones, aún más preferiblemente la incubación se lleva a cabo durante no más de 15 minutos.

De manera alternativa, para ciertas realizaciones, el método comprende además determinar si existen o no esporas viables después de exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante, midiendo una velocidad del cambio detectable, si existe, tal como una velocidad a la que cambia la intensidad de fluorescencia. Por ejemplo, después de combinar las esporas con el medio de germinación y comenzar la etapa de incubación, el cambio detectable se puede medir continuamente o intermitentemente a lo largo del tiempo de incubación, y se determina la velocidad del cambio detectable. Para ciertas realizaciones, se puede detectar la germinación de las esporas resistentes a la esterilización como una velocidad del incremento de la señal a lo largo del tiempo de incubación. Esta velocidad puede ser lineal, exponencial, o similar, con respecto al tiempo de incubación. La constante de velocidad se puede usar como un indicador de la germinación de las esporas.

De manera alternativa, para ciertas realizaciones, el método comprende además determinar si existen o no esporas viables, después de exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante, tomando una medida de fluorescencia final en un momento especificado, de forma que si es mayor que una fluorescencia inicial previamente establecida para el producto, se indica la presencia de esporas viables. Mayor que un valor inicial puede ser no más de un 10 por ciento mayor o no más de un 5 por ciento mayor. Por ejemplo, después de combinar las esporas con el medio de germinación y comenzar la etapa de incubación, se puede medir la fluorescencia final al final de la incubación y usarla como un indicador de la germinación de las esporas o de la ausencia de germinación.

El presente método, que usa las composiciones e indicadores descritos anteriormente, puede, por lo tanto, ser lo suficientemente sensible hacia la presencia de esporas viables como para proporcionar una indicación de la misma en un periodo corto de tiempo. Además, la indicación se puede proporcionar incluso cuando el número de esporas viables presentes es relativamente bajo.

Para ciertas realizaciones, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de los métodos, el método comprende además colocar un artículo a ser esterilizado junto con el indicador del proceso de esterilización en la cámara de esterilización. Para algunas de estas realizaciones, el método comprende además determinar si el proceso de esterilización fue eficaz o no para esterilizar el artículo. Se puede usar una indicación de inexistencia de esporas viables para determinar que el proceso de esterilización fue eficaz para esterilizar el artículo, mientras que se puede usar una indicación de esporas viables para determinar que el proceso no fue eficaz. Así, una determinación de la esterilidad de un artículo sometido a un proceso de esterilización se puede hacer en un tiempo relativamente corto mediante el uso de las realizaciones de las composiciones, indicadores, y métodos descritas anteriormente midiendo directamente la producción de ácidos nucleicos en las esporas viables.

Los objetivos y las ventajas de esta invención se ilustran adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, pero no se debería interpretar que los materiales y las cantidades particulares de los mismos enumerados en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, limiten excesivamente esta invención.

Ejemplos

Suspensiones de Esporas

5 Se prepararon suspensiones de esporas de *Gb. stearothermophilus* (también conocido como *Bacillus stearothermophilus*) mediante métodos conocidos, tal como se describe en el Ejemplo 1 de la patente de EE.UU. N° 5.418.167 (Matner et al.). También se pueden usar las modificaciones de estos métodos y métodos alternativos conocidos para los expertos en la técnica para preparar estas suspensiones.

10 Ejemplo 1

Los Colorantes Fluorescentes que Interaccionan con Ácido Nucleico con Permeabilidad Celular Detectaron la Germinación de Esporas

15 Se ensayaron colorantes con permeabilidad celular representativos de las siguientes clases: colorantes fluorescentes verdes para ácido nucleico, colorantes fluorescentes rojos para ácido nucleico, y Naranja de Acridina con esporas de *Gb. stearothermophilus*. De manera específica, se combinaron 100 microlitros de la suspensión de esporas descrita anteriormente con 200 microlitros de una dilución 1: 5000 del colorante con Agua Estéril para Irrigación (Baxter, Deerfield, IL) o con los nutrientes glucosa, fructosa, y cloruro potásico en agua (1 mg/ml, 1 mg/ml, y 3,3 mg/ml, respectivamente), valina 0,2 M, isoleucina 0,04 M, metionina 0,2 M, 4 mg/ml de inosina, y alanina 0,4 M. La intensidad de fluorescencia de cada una de las suspensiones resultantes se monitorizó a una temperatura de incubación de 50 °C, mediante el uso de los siguientes colorantes a las concentraciones y longitudes de onda de excitación y emisión indicadas a continuación:

25 SYTO 24: 1,0 µM (micromolar); excitación a 485 nm, emisión a 530 nm;
Naranja de Acridina: 6,6 µM; excitación a 485 nm, emisión a 530 nm;
SYTO 64: 1,0 µM; excitación a 530 nm, emisión a 620 nm.

30 Los colorantes están disponibles de Invitrogen, (Carlsbad, CA). La fluorescencia se monitorizó en un fluorímetro Biotek FL600 o en un lector de placas Biotek Synergy 4 (Biotek, Winooski, VT). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Intensidad de Fluorescencia respecto del Tiempo de la Suspensión de Esporas con Colorante y con Colorante y Nutrientes.

35

Tiempo (min)	SYTO 24	SYTO 24 con nutrientes	SYTO 64	SYTO 64 con nutrientes	Naranja de Acridina	Naranja de Acridina con nutrientes
0	448	950	5060	3977	2005	2687
10	592	1376	4514	4913	2665	2777
20	697	2022	4254	6262	4069	4241
30	714	3653	4181	7660	5655	7842
40	754	4834	4218	8954	7091	11708

Se descubrió un incremento de la intensidad de fluorescencia con cada uno de los colorantes anteriores en presencia de las esporas con nutrientes.

40 Ejemplo 2

Los colorantes fluorescentes que interaccionan con ácido nucleico con permeabilidad celular conservaron su capacidad de generar fluorescencia en presencia de ADN y/o ARN dentro de las esporas, después de haber expuesto al colorante a las temperaturas de esterilización.

45

Las diluciones de una suspensión de esporas de *Gb. stearothermophilus* descritas anteriormente se sometieron a tratamiento de choque térmico a 80 °C durante 10 min. Las diluciones se prepararon mediante el uso de Agua Estéril para Irrigación (Baxter, Deerfield, IL) y se ensayaron a una población final de 1×10^6 y 0 esporas. Las diluciones de esporas (100 microlitros) se combinaron con 200 microlitros de medio, que consistió en Naranja de Acridina y nutrientes como se describió en el Ejemplo 1, que se había sometido a un ciclo asistido por vacío de 15 min a 121 °C (250 °F) en un esterilizador de vapor AMSCO Scientific SG-120 Eagle/Century Series (Steris, Mentor OH), y cada una de las mezclas resultantes se añadió a un pocillo de una placa. Se usó un medio sin tratamiento en autoclave como control. La placa se colocó posteriormente en un lector de placas precalentado (lector de placas BioTek Synergy 4, Winooski, VT) a 50 °C y se incubó durante 60 min, durante lo cual se tomaron lecturas de la intensidad de fluorescencia mediante el uso de excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. El experimento se llevó cabo tanto con esporas sometidas a choque térmico como con esporas que no se sometieron a choque térmico. A continuación se enumera un resumen de los datos normalizados en las Tablas 2a-2c.

55

Tabla 2a. Naranja de Acridina con Esporas Sometidas a Choque Térmico de *Gb. stearothermophilus*.

Tiempo (min)	Naranja de Acridina Tratado en Autoclave		Naranja de Acridina sin Tratar en Autoclave	
	0 esporas	E6 esporas en germinación	0 esporas	E6 esporas en germinación
0	0	0	0	0
30	522,25	6211,5	813	1623,75
60	588,75	8652,5	875,75	17121,25
90	779,75	9955,5	996,25	18928,25
120	870	10376,5	1099	19653,75
150	886,5	10694,25	1114,5	19884,5
180	960,5	10803	990,25	20008,25

Tabla 2b. Naranja de Acridina con Esporas sin Choque Térmico de *Gb. stearothermophilus*.

5

Tiempo (min)	Naranja de Acridina Tratado en Autoclave		Naranja de Acridina sin Tratar en Autoclave	
	0 esporas	E6 esporas en germinación	0 esporas	E6 esporas en germinación
0	0	0	0	00
14	-212	609	-334	597
30	-263	2599	-456	2878
44	-278	4753	-484	5314
58	-287	6508	-476	7289

Tabla 2c. SYTO 24 con Esporas sin Choque Térmico de *Gb. stearothermophilus*.

Tiempo (min)	SYTO 24 Tratado en Autoclave		SYTO 24 sin Tratar en Autoclave	
	0 esporas	E6 esporas	0 esporas	E6 esporas
0	0	0	0	0
14	-33	1244	-37	3039,5
30	-29	3483	-52	4704
44	-53,5	4833	-67	5060
58	-41	5344	-82	5259

10 Se descubrió que el SYTO 24 conservaba su capacidad de generar fluorescencia incluso después de haber sido expuesto a los procesos de esterilización.

Ejemplo 3

15 Los colorantes fluorescentes que interaccionan con ácido nucleico con permeabilidad celular no tuvieron más que un nivel de fondo de fluorescencia cuando se sometieron a un proceso de esterilización que fue exactamente suficiente para disminuir una población de al menos 1xE6 esporas hasta cero

20 Un vial de vidrio que contenía 1 mL de suspensión de esporas de 1 x E7 *Gb. stearothermophilus* descrita anteriormente y un vial de vidrio que contenía 1 mL de medio que contenía un colorante fluorescente con permeabilidad celular como se describió en el Ejemplo 1 se colocaron en un esterilizador, y se hizo funcionar en un ciclo asistido por vacío de 15 min a 121 °C (250 °F) en un esterilizador de vapor AMSCO Scientific SG-120 Eagle/Century Series (Steris, Mentor OH), y posteriormente se ensayaron 100 microlitros de las suspensiones de esporas y medio tratados en autoclave. Se ensayaron simultáneamente suspensiones de esporas sin tratar en autoclave que se sometieron a un tratamiento de choque térmico a 80 °C durante 10 min como control. Las suspensiones de esporas (100 microlitros) se combinaron con 200 microlitros de medio, que consistió en colorante de naranja de Acridina y nutrientes como se describió en el Ejemplo 1, que se sometieron al mismo ciclo de esterilización con vapor que las esporas, y cada mezcla resultante se añadió a un pocillo de una placa. La placa se colocó posteriormente en un lector de placas precalentado (Synergy 4, BioTek, Winooski, VT) a 50 °C y se incubó durante 180 min, durante lo cual se tomaron lecturas de la intensidad de fluorescencia mediante el uso de longitudes de onda de excitación y emisión de 520 y 580, respectivamente, durante un total de 19 lecturas. Se enumera un resumen de los datos normalizados en la Tabla 3.

35

Tabla 3. Intensidad de Fluorescencia respecto del Tiempo de la Suspensión de Esporas con Esporas Vivas y Muertas (Esterilizadas) y con Colorante de Naranja de Acridina y Medio Nutriente Tratados con las Mismas Condiciones de Esterilización.

Tiempo (min)	Esporas Tratadas en Autoclave		Esporas Vivas	
	0	E6	0	E6
0	0	0	0	0
30	375,25	-1468,25	522,25	6211,5
60	1347,25	-103,5	588,75	8652,5
90	1533,75	-9,25	779,75	9955,5
120	1491,25	-49,25	870	10376,5
180	1427,75	-307	886,5	10694,25

Los resultados demuestran que las esporas muertas que fueron el resultado del proceso de esterilización no tuvieron niveles detectables de fluorescencia en presencia del colorante fluorescente con permeabilidad celular. Las esporas vivas, por otra parte, fueron capaces de producir grandes cantidades de fluorescencia medida en presencia del colorante fluorescente con permeabilidad celular.

Ejemplo 4

La fluorescencia basada en el colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular se detectó tras la exposición de las esporas de *Gb. stearothermophilus* a un ciclo de esterilización subletal.

Se prepararon ochenta indicadores biológicos (IBs) mediante el revestimiento de una suspensión de esporas de *Gb. stearothermophilus* a una concentración de 1x E5 sobre un soporte de polipropileno. Tras el secado a 37 °C durante 20 min, los IBs se expusieron a condiciones de esterilización usadas normalmente como se describe más adelante en las Tablas 4a, 4b, y 4c. Tras la esterilización, los IBs se activaron con un medio, expuesto a las mismas condiciones de esterilización que las esporas y que contenía una dilución 1: 5000 de Naranja de Acridina junto con glucosa, fructosa, y cloruro potásico en agua (1 mg/ml, 1 mg/ml, y 3,3 mg/ml, respectivamente), alanina 0,02 M, valina 0,01 M, isoleucina 0,002 M, 0,2 mg/ml de inosina, y una pequeña cantidad de Púrpura de Bromocresol. La combinación del medio con las esporas sobre el soporte, sometido a procesos de esterilización letal y subletal mostrados en las Tablas 4a-4c, se incubó a 50 °C durante 60 min, y se tomaron lecturas de la intensidad de fluorescencia a los 30 y 60 min mediante el uso de excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. Se enumeran resúmenes de los cambios de la fluorescencia tras la normalización en las Tablas 4a-4c.

Tabla 4a. Cambio de la Fluorescencia Basada en Naranja de Acridina (485/530 nm) a Intervalos de 30 y 60 Minutos Después de 1 ó 3 Minutos en un Ciclo Asistido por Vacío a 132 °C (270 °F) en un Recipiente de un Resistómetro Evaluador de Indicadores Biológicos (BIER) de Vapor Joslyn (Steris, Mentor, OH).

Tiempo en el esterilizador	Cambio medio de la Fluorescencia a los 30 min	Cambio medio de la Fluorescencia a los 60 min
1 min	2607	2762
3 min	279	386

Tabla 4b. Cambio de la Fluorescencia Basada en Naranja de Acridina (485/530 nm) a Intervalos de 30 y 60 Minutos Después de 1 ó 3 Minutos en un Ciclo de Gravedad a 132 °C (270 °F) en un Esterilizador de Vapor AMSCO EAGLE Modelo 2013 (Steris, Mentor, OH).

Tiempo en el recipiente BIER	Cambio medio de la Fluorescencia a los 30 min	Cambio medio de la Fluorescencia a los 60 min
1 min	1462	1808
3 min	201	22

Tabla 4c. Cambio de la Fluorescencia Basada en Naranja de Acridina (485/530 nm) a Intervalos de 30 y 60 Minutos Después de 5 ó 15 Minutos en un Ciclo Asistido por Vacío a 121 °C (250 °F) en un Recipiente de un Resistómetro Evaluador de Indicadores Biológicos (BIER) de Vapor Joslyn (Steris, Mentor, OH).

Tiempo en el recipiente BIER	Cambio medio de la Fluorescencia a los 30 min	Cambio medio de la Fluorescencia a los 60 min
5 min	2774	3347
15 min	383	353

Todas las muestras que se sometieron a condiciones de esterilización subletales (p.ej., 1 min a 132 °C, 5 min a 121

°C) mostraron un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia y tornaron el medio púrpura a amarillo, lo que indica el crecimiento y la producción de ácido, lo que proporcionó una prueba independiente de esporas viables.

Ejemplo 5

5 El colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular mostró actividad a lo largo de un intervalo de concentraciones de colorante en la disolución.

10 Se prepararon diluciones mediante el uso de Agua Estéril para Irrigación (Baxter, Deerfield, IL) y se ensayaron a una población final que osciló entre 1×10^6 y 0 esporas. Las diluciones de esporas (100 microlitros) se combinaron con 200 microlitros de medio, que consistió en Naranja de Acridina y nutrientes como se describió en el Ejemplo 1, con concentraciones de Naranja de Acridina a 1:5000 (0,0066 mM), 1:1000 (0,033 mM) y 1:500 (0,066 mM), y cada una de las mezclas resultantes se añadió a un pocillo de una placa. La placa se colocó posteriormente en un lector de placas precalentado (lector de placas BioTek Synergy 4, Winooski, VT) a 50 °C y se incubó durante 60 min, durante lo cual se tomaron lecturas de la intensidad de fluorescencia mediante el uso de excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. A continuación se enumera un resumen de los datos normalizados en las Tablas 5a-5c.

Tabla 5a. Naranja de Acridina a una concentración de 0,0066 mM con concentraciones decrecientes de esporas.

Tiempo	0	E3	E4	E5	E6
0:00:00	0	0	0	0	0
0:15:00	711	2033	3754,5	5224	12024,5
0:30:00	886,5	2271,5	4088	5364	15320
0:45:00	1027	2396	4174	5373	16514,5
1:00:00	1147,5	2484,5	4268	5406	17130,5

20 Tabla 5b. Naranja de Acridina a 0,033 mM con concentraciones decrecientes de esporas.

Tiempo	0	E3	E4	E5	E6
0:00:00	0	0	0	0	0
0:15:00	740	2022,5	3467	5012	14427,5
0:30:00	958	2281	3640,5	5029	19073,5
0:45:00	1143,5	2437	3724	4999	20802,5
1:00:00	1280	2558,5	3810,5	5068	21688

25 Tabla 5c. Naranja de Acridina a 0,066 mM con concentraciones decrecientes de esporas.

Tiempo	0	E3	E4	E5	E6
0:00:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0:15:00	815,5	3420,0	3261,5	3422,5	13727,5
0:30:00	1026,0	3716,0	3464,0	3533,0	15331,5
0:45:00	1184,5	3902,5	3586,5	3606,0	15529,5
1:00:00	1287,5	4000,5	3626,5	3616,0	15629,0

La detección de E3 esporas se demostró con todas las concentraciones de Naranja de Acridina. Cuanto mayor fue la concentración usada de naranja de Acridina, mayor fue la señal.

REIVINDICACIONES

1. Un indicador de un proceso de esterilización que comprende:
- 5 un soporte que sostiene una diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización;
- un recipiente impermeable a microorganismos e impermeable a un esterilizante, y el recipiente contiene un medio de germinación que comprende una cantidad subletal de al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y al menos un nutriente para la germinación de las esporas;
- 10 en el que el al menos un colorante fluorescente con permeabilidad celular puede interaccionar con los ácidos nucleicos presentes en, y producidos por, la diversidad de esporas durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas para producir un incremento de la intensidad de fluorescencia, lo que indica que existen esporas viables, y en el que el colorante fluorescente con permeabilidad celular es lo suficientemente estable
- 15 al menos a una temperatura para la incubación de las esporas como para producir el incremento de la intensidad de fluorescencia.
- en el que el soporte está en posición adyacente al recipiente y separado del medio de germinación.
- 20 2. El indicador de la reivindicación 1, en el que el colorante fluorescente con permeabilidad celular es suficientemente estable a una temperatura de esterilización.
3. El indicador de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el colorante fluorescente con permeabilidad celular es un colorante que interacciona con los ácidos nucleicos mediante intercalación, atracción electrostática,
- 25 una interacción de cargas, interacciones hidrófobas-hidrófilas, o una combinación de las mismas.
4. El indicador de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el incremento de la intensidad de fluorescencia es a una longitud de onda de 500 a 675 nm.
- 30 5. El indicador de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio de germinación comprende además un componente de apagamiento colisional.
6. El indicador de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de germinación comprende además
- 35 al menos un colorante de referencia.
7. Un método para determinar la eficacia de un proceso de esterilización, y el método comprende:
- proporcionar un indicador de un proceso de esterilización que comprende:
- 40 un soporte que sostiene una diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización;
- un recipiente impermeable a microorganismos e impermeable a un esterilizante, y el recipiente contiene un medio de germinación que comprende una cantidad subletal de al menos un colorante fluorescente que interacciona con ácidos nucleicos con permeabilidad celular y al menos un nutriente para la germinación de las esporas;
- 45 en el que el al menos un colorante fluorescente con permeabilidad celular puede interaccionar con los ácidos nucleicos presentes en, y producidos por, la diversidad de esporas durante la germinación o durante la germinación y el crecimiento de las esporas para producir un incremento de la intensidad de fluorescencia, lo que indica que existen esporas viables, y en el que el colorante fluorescente con permeabilidad celular es lo suficientemente estable
- 50 al menos a una temperatura para la incubación de las esporas como para producir el incremento de la intensidad de fluorescencia; y
- en el que el soporte está en posición adyacente al recipiente y separado del medio de germinación;
- 55 colocar el indicador del proceso de esterilización en una cámara de esterilización;
- exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante;
- combinar la diversidad de esporas resistentes al proceso de esterilización y el medio de germinación;
- 60 incubar las esporas con el medio de germinación;
- y
- 65 medir el incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe.

8. El método de la reivindicación 7, que comprende además determinar si existen o no esporas viables, después de exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante, midiendo el incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe, mientras se incuban las esporas con el medio de germinación, y determinando una velocidad del incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe.

5
9. El método de la reivindicación 7, que comprende además determinar si existen o no esporas viables, después de exponer el indicador del proceso de esterilización a un esterilizante, midiendo el incremento de la intensidad de fluorescencia, si existe, después de incubar las esporas con el medio de germinación en comparación con antes de incubar las esporas con el medio de germinación.

10
10. El indicador de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la concentración del colorante fluorescente con permeabilidad celular no es mayor de 0,10 mM.

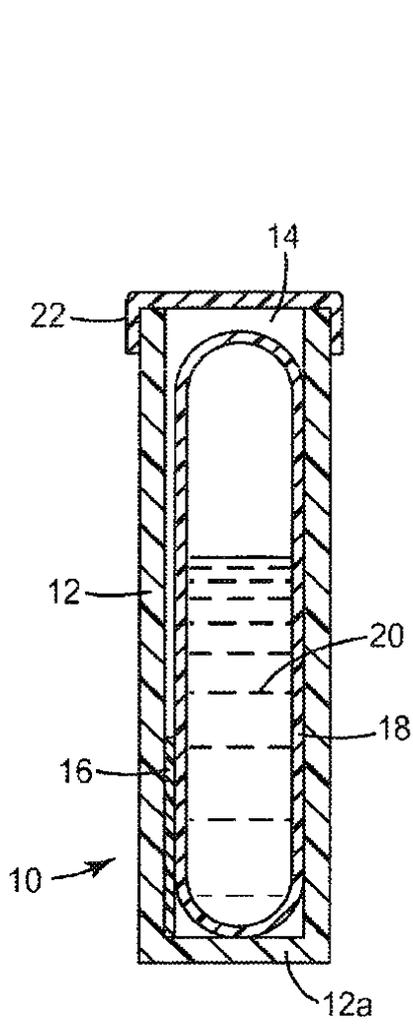


FIG. 1

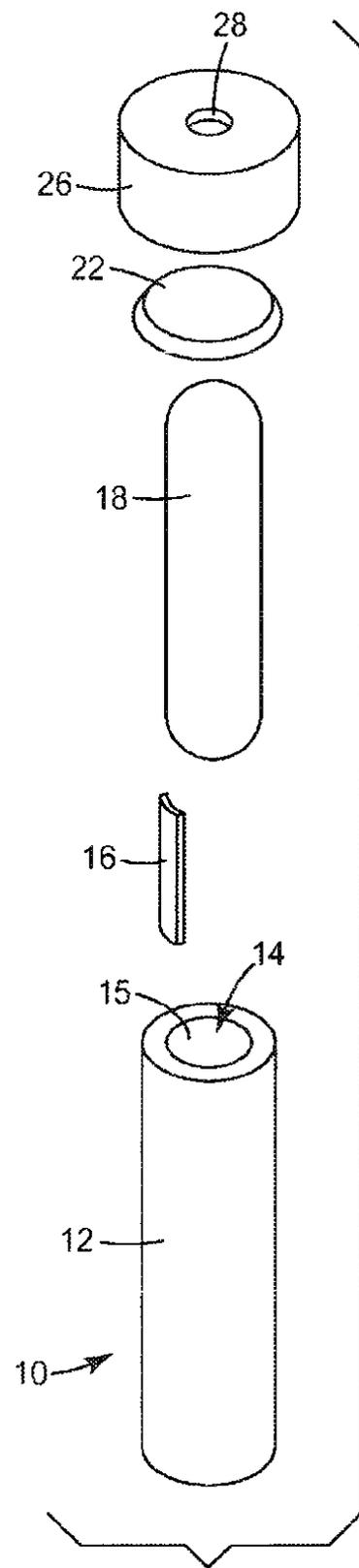


FIG. 2