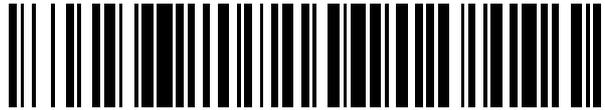


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 491**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2006 E 11158073 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2325641**

54 Título: **Indicador biológico**

30 Prioridad:

24.05.2005 US 135719

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

27.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CREGGER, TRICIA A.;
FRANCISKOVICH, PHILLIP P.;
DUDA, MARK J. y
BELLOW, ROBERT E. JR.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 513 491 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).

DESCRIPCION

Indicador biológico

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La invención se refiere a un indicador biológico estéril para el control de la esterilidad o desinfección, etc., que presenta una superficie de soporte que contiene grupos funcionales que están ligados de modo covalente con uno o varios microorganismos a través de un reagente de reticulación. De manera deseada, el indicador contiene una población de microorganismos uniforme y consistente que puede ser utilizada para valorar varios tratamientos de esterilización de dispositivos médicos y accesorios, instrumentos, soluciones, superficies, ropa y similares, para 15 indicar el grado de éxito de la esterilización con respecto a los artículos que van a ser utilizados otra vez o esterilizados en su estado terminal.

Descripción del estado de la técnica

20 Los indicadores biológicos se utilizan para comprobar y/o determinar la eficacia de los procesos de esterilización. Un indicador biológico típico contiene una población calibrada de microorganismos con una resistencia elevada al proceso de esterilización que se está investigando. Después de ser expuestos al proceso de esterilización, los indicadores biológicos son incubados en un medio de cultivo para estimular el crecimiento de cualquier microorganismo viable restante. Los indicadores biológicos autónomos contienen el medio de cultivo en el interior del indicador, de modo típico en una redoma quebrantable. Los indicadores biológicos en tira con esporas son 25 combinados con un contenedor separado de medio de cultivo después del proceso de esterilización supervisado. El crecimiento posterior de microbios, tal como se demuestra por un cambio de color o turbiedad del medio de crecimiento, es una indicación de que el proceso de esterilización process ha sido ineficaz.

30 De modo habitual, las esporas bacteriales son preferidas para los indicadores biológicos, debido al hecho que las esporas microbianas son aceptadas como siendo más resistentes a los procesos de esterilización que la mayoría de los demás tipos de microorganismos, y por lo tanto se asume que un proceso de esterilización process que matará las esporas microbianas matará también cualquier otro microorganismo contaminante.

35 La selección de las esporas bacterianas depende del modo de esterilización, del tipo de esterilización y de la técnica a ser valorada. Por ejemplo, las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* se utilizan para supervisar los sistemas de esterilización que emplean calor húmedo, ácido peracético, peróxido de hidrogeno y otros compuestos de peroxido, tanto en el estado líquido como en el estado vaporoso, porque estas esporas de indicador son altamente resistentes a sustancias químicas oxidativas. De manera similar, las esporas de *Bacillus subtilis* se emplean para 40 controlar la esterilización de oxido de etileno y los sistemas de esterilización que emplean calor seco.

45 De modo general, los microorganismos son soportados sobre un portador o sustrato, tal como una tira o un disco. El sustrato es formado a partir de un material que es compatible con el proceso de esterilización y que no contiene aditivos que puedan influir sobre la valoración de la esterilidad. Materiales tal como papel de filtro, papel cromatográfico, papel secante, fibras de vidrio, plásticos de polímero, cerámicos, acero inoxidable y artículos de oxidos metalicos se utilizan frecuentemente como sustrato o portador.

50 Para distribuir los organismos sobre el sustrato, de manera convencional una suspensión de microorganismos en agua o alcohol es bombeada hacia una aguja que es suspendida encima de una vía del papel u otro material de sustrato. El papel es desplazado por debajo de la aguja a un ritmo constante, y provoca la formación de una traza de suspensión sobre el papel mientras está pasando por debajo de la aguja. Alternativamente, la suspensión se transfiere manualmente al sustrato mediante el uso de una micropipeta. A continuación, la vía de papel impregnado es cortada al tamaño apropiado para el uso como indicador, habitualmente como tiras de ensayo o discos de ensayo.

55 Es importante, tanto la necesidad de que una cantidad controlable del microorganismo llegue a la superficie del sustrato, como que el microorganismo esté inmovilizado suficientemente sobre la superficie del sustrato. Varios tipos de vínculos del microorganismo a la superficie del sustrato han sido propuestos, incluyendo interacciones hidrofóbicas y electroestáticas, intercambio de iones y fuerzas de van der Waals. La patente US 4,478,946, se refiere a la absorción de proteínas no funcionales a una superficie y el empleo de agentes de reticulación para atar 60 de manera covalente las proteínas funcionales a proteínas no funcionales absorbidas. Sin embargo, estas técnicas de inmovilización a menudo proporcionan una sujeción menor que la deseada, especialmente en los ambientes acuosos. La patente US 5,077,210 se refiere a agentes activos tal como proteínas inmovilizadas de manera covalente sobre sustratos que portan grupos de hidroxilo. Un silano es ligado al sustrato y acoplado a un reticulador heterobifuncional en un grupo funcional, dejando un grupo funcional libre que es diferente del primer grupo al que es 65 ligado una proteína mientras que mantiene una alta funcionalidad de la proteína. El silano tiene un grupo funcional

que reacciona con el grupo de hidroxilo del sustrato y un grupo terminal de tioles que reacciona con un grupo de un agente de reticulación heterobifuncional que contiene un grupo de succinimidias que reacciona con un grupo de aminas del agente activo. La patente US 5,739,004 A1 revela un indicador biológico para el control de la esterilización. A efectos de inmovilizar químicamente el microorganismo o la enzima, US 5,739,004 A1 se refiere a compuestos que forman enlaces iónicos y/o covalentes con el microorganismo o la enzima, formando de este modo un complejo inmovilizado estable. Estos compuestos incluyen alditoles, polisacáridas, almidones y ciclodextrinas. El uso de agentes de reticulación de longitud cero no está revelado. El documento US 2004/248298 A1 se refiere a un método de purificación selectiva de células bacterianas o componentes de célula comprendiendo el acoplamiento de bacteriófagos y/o proteínas bacteriófagas mediante el acoplamiento covalente para soportar materiales tales como partículas magnéticas. De modo preferente, el enlace se realiza a través de grupos de acoplamiento, en particular polipéptidos y/o sustancias de bajo peso molecular tal como la biotina. Sin embargo, un indicador biológico para el control de la esterilización no está revelado.

Resumen de la invención

Un indicador biológico para determinar si una esterilización, desinfección u otro tratamiento biocida similar ha sido eficaz con respecto a organismos orgánicos vivos, comprende un sustrato que contiene de modo inherente unos grupos funcionales sobre el mismo, o añadidos al mismo, o una capa de superficie autoensamblada sobre el mismo, tal como un grupo funcional que contiene una sola capa (SAM). Los grupos funcionales incluyen grupos de hidroxilo, grupos de halogenuro, grupos de amina y similares, y de modo deseado excluyen los grupos de tiol. Un agente de reticulación de longitud cero, a saber EDC, es utilizado, que proporciona un enlace covalente de un indicador de microorganismos tal como esporas, organismos vegetativos, o un agente etiológico a la superficie funcionalizada del sustrato. En una realización como esta, el indicador de microorganismos está ligado estrechamente bien a la capa de superficie, bien y de modo preferente, al sustrato que no presenta ninguna capa de superficie sobre el mismo, y es muy difícil eliminarlo lavándolo, con turbulencia de fluido y similar.

En todas las realizaciones, el agente funcional es aplicado de manera uniforme y consistente, asegurándose de este modo que la población de microorganismos sobre el mismo también será uniforme y consistente.

De regla general, los indicadores biológicos se utilizan para indicar si una esterilización, desinfección u otro tratamiento biocida similar de varios artículos tal como instrumentos quirúrgicos ha sido eficaz de modo que los artículos pueden volver a ser utilizados.

Un indicador biológico para el control de la esterilidad; que comprende: un sustrato; una capa de superficie que contiene grupos funcionales terminales que están situados sobre dicho sustrato, siendo dicha capa de superficie sustancialmente libre de cualquier átomo de enlace de silicio; un indicador de microorganismos; y un reagente de reticulación ligado de modo covalente a dichos grupos funcionales de capa de superficie y ligado de modo covalente a dicho indicador de microorganismos.

Un indicador biológico, comprendiendo: un sustrato y opcionalmente una capa de superficie situada sobre dicho sustrato, en donde dicho sustrato o dicha capa de superficie eventual contiene grupos funcionales; un agente etiológico que comprende un agente de bioterrorismo, un organismo clínicamente relevante, una cepa resistente de bacterias, o un componente subcelular, o combinaciones de los mismos; y un agente de reticulación ligado de modo covalente a dicho grupo funcional de sustrato o a dicho grupo funcional de capa de superficie eventual, y ligado de modo covalente a dicho agente etiológico.

Descripción de la invención

Se describe un indicador biológico que es apropiado para supervisar y/o determinar la eficacia biocida de un proceso de esterilidad, desinfección, o desactivación de microorganismos, priones, agentes etiológicos y similares que, de manera general, son altamente resistentes a estos procesos de tratamiento. Mientras que las esporas, por ejemplo las endosporas, son el microorganismo de ensayo preferido porque, de regla general, tienen una alta resistencia a muchos procesos de esterilización, otros microorganismos que incluyen hongos, micobacterias, bacterias vegetativas y protozoos, también pueden ser utilizados en el lugar de las esporas. De modo preferible, los microorganismos tienen grupos terminales de azufre sobre los mismos y si no, pueden reaccionar con o ser convertidos en tioles para que contengan grupos terminales de azufre. Ejemplos de endosporas incluyen *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis globigii*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus cereus*, y *Bacillus circulans*. Ejemplos de hongos incluyen *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Wangiella dermatitis*. Ejemplos de micobacterias que pueden ser utilizadas en la presente invención incluyen *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium smegmatis*, y *Mycobacterium terrae*.

Ejemplos de bacterias vegetativas incluyen *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae)*, *Legionella pneumophila*, *Methylbacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella chateraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Stenotrophomonas maltophilia*. Con respecto a las bacterias vegetativas, unas células

vegetativas o sus partes integrantes pueden ser fijadas a una matriz sólida de soporte por el (los) mismos mecanismo(s) y sobrevivir el secado y almacenamiento a través de la deposición en presencia de una o más de una variedad de excipientes. Los excipientes son una clase amplia de compuestos generalmente inertes que se utilizan para estabilizar entidades inestables. Una subclase de excipientes incluye los carbohidratos y en particular sacáridos poliméricos y oligosacáridos. Un ejemplo de tal compuesto es la trehalosa de disacárido. Altas concentraciones de trehalosa en el tejido de ciertos organismos permiten que estos sobrevivan en un estado de deficiencia de agua y también se ha mostrado que reactivan componentes funcionales celulares después de una deshidratación. De hecho, la trehalosa es conocida porque proporciona estabilidad a membranas y otras estructuras macromoleculares esenciales a la viabilidad de una célula bajo unas condiciones extremas ambientales (por ejemplo, liofilización). Otros compuestos de excipiente estabilizadores incluyen (pero no están limitados a) azúcares simples, por ejemplo, sacarosa, glucosa, maltosa, polímeros de cadena larga, por ejemplo dextranos, almidón, agarosa y celulosa. Otros excipientes no basados en carbohidratos podrían incluir también proteínas, fosfonatos, agentes tampón, ceras, lípidos, aceites u otros materiales basados en hidrocarburo.

Ejemplos de protozoos incluyen *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*.

Las esporas son preferibles en la presente invención ya que son altamente resistentes a procesos de esterilización, etc.

De modo adicional al control y/o a la determinación de la eficacia de varios tratamientos o procesos con respecto a la esterilización, etc. de endosporas, hongos, etc., los indicadores de la presente invención pueden ser utilizados también con respecto a y/o para determinar la eficacia de un tratamiento o proceso estéril o de desinfección.

Agentes etiológicos y otros agentes no simulados

Los agentes etiológicos incluyen agentes de bioterrorismo, agentes clínicamente relevantes, componentes subcelulares y cepas resistentes de bacterias emergentes. Adicionalmente a los organismos de simulación seleccionados a base de su aceptación como representando una naturaleza 'altamente resistente' (por ejemplo *Geobacillus stearothermophilus*) y otros microorganismos mencionados más arriba, unos agentes no autorreproductores y componentes subcelulares o productos de células pueden ser seleccionados en base a su significancia clínica o en base a su uso como agentes del bioterrorismo. Estos organismos se componen frecuentemente de cepas que ahora pueden presentar una resistencia a los medios normales de tratamiento antibiótico o desinfección química, debido a modificaciones naturales o provocados por el hombre. Ejemplos del tipo anterior incluyen de modo mínimo VREs (*Enterococci* resistentes a la vancomicina), MSRAs (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina), y *Mycobacterium chelonii*. Estos organismos clínicamente significantes son particularmente interesantes porque los VREs y MSRAs representan organismos que han desarrollado una resistencia con respecto a sus contramedidas terapéuticas típicas (Resistencia a los antibióticos) y *M. chelonii* es un ejemplo para aquellos organismos que han desarrollado una resistencia con respecto a unos modos de desinfección que anteriormente habían sido eficaces (resistencia al glutaraldehído). Asimismo existe una pluralidad de agentes etiológicos emergentes de significancia para los cuales puede que todavía no existe una alternativa de simulación, que pueden representar un riesgo especial o un reto para el curso terapéutico de la acción o desinfección. Un ejemplo para ello son los priones. Los priones no son organismos vivos per se, pero su función como agentes causantes de enfermedades está relacionada con su estructura y esta relación entre estructura y función puede ser utilizada para determinar su infectividad relativa. Otros agentes no autónomos (por ejemplo los virus) así como elementos subcelulares y priones proteínicos se contemplan en la presente invención.

Los agentes etiológicos que pueden ser utilizados como agentes de bioterrorismo o enfermedades incluyen ántrax (*Bacillus anthracis*), botulinum (*Clostridium botulinum* toxin), especies de brucella (brucellosis), *Burkholderia mallei* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (meloidosis), *Chlamydia psittaci* (psitacosis), cólera (*Vibrio cholerae*), *Clostridium perfringens* (toxina epsilon), *Coxiella burnetii* (fiebre Q), enfermedades infecciosas emergentes tal como el virus Nipah y hantavirus, *Escherichia coli* O157:H7 (E. Coli), amenazas de la seguridad alimenticia (por ejemplo especies de salmonela), *Francisella tularensis* (tularemia), peste (*Yersinia pestis*), toxina ricino de *Ricinus communis* (semillas de ricino), *Rickettsia prowazekii* (fiebre tifoidea), *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), shigella (shigelosis), viruela (*Variola major*), *Staphylococcal enterotoxin B*, *Vibrio cholerae* (cólera), *encefalitis viral* (alfaviruses [por ejemplo la encefalitis equina venezolana, la encefalitis equina oriental, la encefalitis equina occidental]), fiebres hemorrágicas virales (filovirus [por ejemplo Ebola, Marburg] y arenavirus [por ejemplo Lassa, Machupo]), amenazas contra la seguridad del agua (por ejemplo *Cryptosporidium parvum*), y *Yersinia pestis* (peste), o combinaciones de los mismos.

El microorganismo de ensayo puede ser una sola especie o una combinación de especies. Si se utiliza una combinación de especies, para los procesos típicos de la esterilización de dispositivos médicos, en la mayoría de los casos los organismos preferentes serán una combinación de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*.

De modo preferible se utiliza un sustrato sólido como material portador de spora. El sustrato puede ser de cualquier material inorgánico tal como silicio, incluyendo silicio cristalino; varios tipos de vidrios que incluyen silicato

sodocalcico, vidrio borosilicatado, vidrio fosfatado, vidrio borofosfato, vidrio boroaluminosilicato y similares que tengan cualquier forma o molde tal como una lámina, fibra, bolita, o ballotini; varios cerámicos que pueden ser definidos como materias primas de la tierra en las que el silicio y su óxido y sus compuestos complejos conocidos como silicatos ocupan una parte predominante y que han sido calentados a temperaturas elevadas tal como productos de tierras cocidas que incluyen baldosas y terracota, varias porcelanas, porcelanas de esmalte y similares; metales tal como el paladio, platino, hierro, cobre, oro; varios sustratos inorgánicos que contienen superficies metalizadas tal como aquellos que van a ser descritos inmediatamente después, o varios óxidos de metal de los grupos 4 a 14 de la Tabla Periódica incluyendo óxido de titanio, óxido de circonio, óxido de hierro, óxido de cobre, óxido de aluminio, sílice como el cuarzo, el zafiro y similares.

Otro grupo de sustratos que pueden ser utilizados son varios compuestos orgánicos que incluyen la celulosa en varias formas tal como el papel, papel de filtro, cartón y similares. Varios polímeros pueden ser ejemplificados por, pero no limitados a, polímeros acrílicos incluyendo ácido acrílico y polímeros de acrilato, varias poliolefinas como polietileno y polipropileno, polímeros de alcohol polivinílico; poliestireno; y similares. Los sustratos arriba indicados también pueden ser materiales compuestos de los compuestos arriba mencionados.

Los sustratos pueden ser modificados de manera electrónica y/o física por plasma, haces de electrones, radiación gamma, fotoactivación y similares. Estos tratamientos pueden utilizar grupos funcionales existentes, añadir grupos funcionales, o crear grupos inherentes evaluables (es decir, activos), sobre la superficie del sustrato, tal como grupos de hidroxilo. Normalmente, por lo menos una parte de la superficie expuesta del sustrato será plana, aunque las superficies curvadas pueden ser tratadas de acuerdo con la presente invención; por ejemplo, la superficie del sustrato puede ser formada sobre la superficie interior o exterior de un tubo de ensayo o de una placa de múltiples pozos, o el lado exterior de la bola o del contenedor. Mientras que, de modo preferente, el sustrato es sólido, puede ser parcialmente poroso o poroso.

Los sustratos pueden existir en una gran variedad de formas, en tanto que proporcionan una superficie expuesta. Ejemplos de formas apropiadas incluyen fibras, alambres, gofres, discos, láminas, portaobjetos de un microscopio, placas de cristalización, células cerradas de absorción, ampollas de vidrio y similares. Los sustratos preferibles incluyen varas de celulosa tal como el papel, fibras de papel, alcalino térreo, vidrio de borosilicato de aluminio, poliestireno y similares.

De manera natural o inherente, los sustratos de la presente invención pueden contener grupos funcionales sobre los mismos, por ejemplo, varios vidrios contienen a menudo grupos de hidroxilo o grupos de amina. Alternativamente, una capa de superficie separada que contiene grupos funcionales puede estar situada o existir sobre el sustrato como bajo la forma de una monocapa, tal como un SAM (método de monocapas autoensambladas), que es bastante conocido en la técnica anterior y la literatura. La capa inherente o adicional de grupos funcionales comprende hidroxilo, amina, ácido carboxílico, carbonilo, varios halógenos tal como el cloro o bromo, y varios alquenos que contienen una cantidad total de desde unos 2 hasta al menos unos 20 átomos de carbono. De manera general se evitan los grupos de tiol.

Es un aspecto importante de la presente invención utilizar un agente de reticulación para ligar de modo covalente el indicador de microorganismo al sustrato.

Ejemplos de reactivos de reticulación de longitud cero incluyen 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida clorhidrato (EDC).

Por lo tanto, el reactivo de reticulación reaccionará a través de un grupo terminal con el sustrato o un compuesto funcional separado de capa de superficie para formar un enlace covalente con el mismo mientras que el grupo funcional terminal restante reaccionará con un indicador de microorganismo o un agente etiológico y formará también un enlace covalente con el mismo. El orden de reacciones no es importante ya que el agente de reticulación puede reaccionar en un primer tiempo con un grupo funcional de la superficie o de una capa de superficie, y posteriormente con el microorganismo, o inicialmente con el microorganismo y después con el grupo funcional de la superficie o de una capa de superficie.

Un aspecto importante de la invención consiste en ligar el indicador de microorganismo al sustrato a través de enlaces covalentes fuertes de al menos unos 10, de manera ventajosa desde unos 10 hasta unos 150, y de modo preferente desde unos 25 hasta unos 125 kilocalorías por mol. Estos fuertes enlaces o anclajes del indicador de microorganismo o agente etiológico al sustrato son resistentes a condiciones adversas o de turbulencia, asociadas con procesos estériles de lavado-desinfección y/o de líquidos químicos. En otras palabras, los indicadores biológicos de la presente invención son altamente resistentes a ser separados del sustrato o arrastrados por lavado, tal como por impactos causados por rociado por chorro, fuerzas hidroestáticas turbulentas y similares.

El indicador biológico de la presente invención se prepara aplicando una capa de reactivos de reticulación al sustrato o al laminado de capa separada del sustrato que contiene un grupo funcional sobre el mismo. Los grupos funcionales están esencialmente libres de o no contienen átomos de enlace al silicio. Los átomos de enlace al silicio

5 se producen cuando se utiliza un agente de unión de silano funcionalizado. Esencialmente libre quiere decir que, de modo general, menos de unos 10%, de modo ventajoso menos de unos 5% y de modo preferente menos de unos 2 o 3%, o zero, es decir ninguno, de los grupos funcionales está ligado al sustrato a través de un átomo intermedio de silicio. Los sustratos también están esencialmente libres de proteínas, de proteínas parcialmente hidrolizadas y de péptidos. La proporción de tales proteínas, etc. si existen, es baja de modo que, generalmente, es de menos de unos 10%, de manera ventajosa menos de unos 5 % y de modo preferible menos de unos 2% o 3% de los grupos funcionales que están ligados al sustrato. Con dependencia del tipo de los grupos funcionales arriba indicados, contenidos sobre el sustrato o la capa de superficie, se utiliza un reactivo de reticulación que tiene por lo menos un grupo terminal que reacciona fácilmente con el mismo y forma un enlace covalente. Por ejemplo, si la superficie del sustrato tiene un grupo funcional de amina, uno de los grupos funcionales del reactivo de reticulación reaccionará fácilmente con el mismo, tal como un aldehído, una imida, un grupo de carboxilo, un éster amidilo de un ácido carboxílico, un anhídrido y similares. Un método de estos se refiere al uso del reactivo de reticulación en un tapón tal como un tapón de fosfato en condiciones relativamente neutras, por ejemplo un pH desde unos 6 hasta unos 8, durante un periodo de tiempo apropiado para permitir que se forme un enlace covalente con el grupo funcional del sustrato. Un exceso de reactivo de reticulación puede eliminarse de cualquier modo convencional, como el lavado, el aclarado o similares.

20 El grupo terminal restante del reactivo de reticulación es un grupo funcional que reacciona fácilmente con el indicador de microorganismo, o agente etiológico, y forma un enlace covalente con el mismo. De este modo, el indicador de microorganismo, agente etiológico o agente causante de enfermedad, o estimulante etc., están ligados de modo covalente al grupo funcional del sustrato a través del reactivo de reticulación. Estos grupos funcionales, tal como se ha indicado arriba, que reaccionan con el microorganismo incluyen un halógeno, un derivado de melanina, un grupo tiol, una maleimida, una malamida, etc.

25 Ya que el microorganismo preferente de la presente invención es una espora bacteriana, y puesto que de modo general la espora contiene grupos terminales de azufre sobre la misma, es un ejemplo de una realización deseada de la invención. En caso de que la espora o el microorganismo no contienen un grupo terminal de azufre, pueden ser tiolados antes de su reacción con el agente de reticulación. La tiolación de microorganismos es conocida en el estado de la técnica y la literatura.

30 El reactivo de reticulación puede ser llevado a reaccionar de varias maneras, tal como a una temperatura ambiente, a temperaturas elevadas, por radiación como la luz ultravioleta, y similares.

35 Un aspecto importante de la presente invención es la población uniforme y/o consistente de indicadores de microorganismo o agentes etiológicos sobre el sustrato, de tal modo que se obtiene una baja desviación del estándar o sus combinaciones; de modo general de unos 50% o menos, de modo deseado unos 25% o menos, y de modo preferente unos 10% o menos, en base a un área, por ejemplo, un cm² en comparación con un área diferente sobre el sustrato. La distribución uniforme de un indicador de microorganismo o agente etiológico se prepara mediante la suspensión de un microorganismo de esporas seleccionado tal como en una solución acuosa, generalmente agua o un solvente. Los solventes pueden incluir etanol, metanol, y otros alcoholes, siendo etanol aquel que se prefiere. Sin embargo, se debería entender que las esporas pueden ser suspendidas en una gran variedad de soluciones, a condición de que la viabilidad y las propiedades de resistencia de las esporas no estén en juego.

45 Alternativamente, el reactivo de reticulación arriba indicado puede ser llevado a reaccionar inicialmente con uno o más tipos de indicadores de microorganismo, o agente etiológico, y similares, y después, posteriormente, aplicado en una solución acuosa o un solvente a un grupo funcional que contiene un sustrato, después de lo cual el agente de reticulación es ligado de modo covalente al mismo.

50 El sustrato preparado que presenta o un grupo funcional inherente o grupos funcionales provistos de una monocapa autoensamblada (SAM) que está ligada de modo covalente a un reactivo de reticulación, se inocula entonces con un microorganismo, tal como una suspensión de esporas, en una concentración predeterminada y particular. La concentración de la suspensión de esporas variará, en función de las exigencias de la aplicación y del grado deseado de la aplicación al sustrato, pero de regla general oscilará entre unos 10⁴ cfu/ml y unos 10⁹ cfu/ml. La inoculación de la solución de esporas sobre el portador se realiza sumergiendo o mojando la superficie en la solución de esporas, pipeteando, pulverizando o imprimiendo un volumen fijado de suspensión sobre el sustrato. La cantidad real de microorganismos depositada o existente sobre el indicador biológico será desde unos 10⁴ hasta unos 10⁷ cfu/indicador biológico. En caso de que el sustrato es generalmente plano tal como una célula cerrada de absorción o un portaobjetos de microscopio, la superficie entera del portador está cubierta. Si el sustrato tiene una superficie generalmente curvada tal como una ampolla de vidrio, únicamente una porción terminal o la superficie entera está cubierta.

65 A continuación, el sustrato inoculado es secado a temperatura ambiente desde unos 17°C hasta unos 25°C durante un periodo de tiempo desde aproximadamente 1 min hasta unos 30 min. o más, o a temperaturas elevadas para reducir el tiempo del secado. Cuando el portador ha sido inoculado, el portador es aclarado con agua o un solvente

para eliminar esporas que no están ligadas estrechamente a la superficie. Entonces, el sustrato puede ser inspeccionado visualmente utilizando unos instrumentos foto-optométricos tal como un microscopio óptico o de sonda de exploración para determinar la uniformidad de la población del indicador de microorganismo sobre la superficie del portador. La población de la superficie del portador también puede ser enumerada evaluando pruebas maceradas o sometidas a ondas sonoras, o por otro medio conocido para los expertos.

En vez de indicadores de microorganismo tal como esporas, varios agentes etiológicos pueden ser aplicados de modo similar al sustrato para obtener una concentración conveniente sobre la superficie.

Debido al hecho que los sustratos o capas de superficie pueden ser hechos teniendo concentraciones uniformes y consistentes de grupos funcionales sobre los mismos que, posteriormente, son ligados de modo covalente a través del reactivo de reticulación a los microorganismos o agentes etiológicos, están fuertemente adheridos al sustrato con pérdidas muy reducidas, si es que existen, debido a tratamientos o procesos estériles turbulentos y/o químicos. Los microorganismos tal como las esporas o los agentes etiológicos sirven como indicador biológico muy eficaz en lo que se refiere a la eficacia de la esterilización de varios artículos. Por ejemplo, los indicadores biológicos de la presente invención son muy beneficios en procesos de esterilización de productos químicos líquidos pero también pueden ser utilizados en procesos de esterilización tales como vapor, sustancias químicas, radiación, fase de vapor etc. para esterilizar varios artículos que se indicarán más abajo. Cuando el ciclo de esterilización está completado, el uno o más indicadores biológicos son incubados de una manera bien conocida en el estado de la técnica y la literatura. En caso de que alguno de los microorganismos, por ejemplo las esporas, o los agentes etiológicos, han sobrevivido al proceso de esterilización, van a crecer durante la incubación bajo las condiciones apropiadas de incubación, conocidas para los expertos en la materia. La presencia de cualquier crecimiento es una indicación de que el ciclo de esterilización puede no haber tenido éxito. Por lo tanto, después de la incubación de los indicadores biológicos, la desinfección o el grado de esterilidad es determinado de la manera convencional. Muchas veces, el resultado final es determinado por la naturaleza de los artículos que son esterilizados, con una reducción logarítmica de por lo menos desde unos 4 hasta unos 12, y de manera preferente al menos unos 5 o unos 6 hasta unos 8 o unos 9. Una reducción logarítmica de 6 significa que un microorganismo o menos en 1.000.000 permanece después de haber sido expuesto a un proceso de esterilización.

El tipo de microorganismo o de espora, o agente etiológico utilizado en el indicador biológico a menudo puede ser el mismo que el organismo específico que debe ser destruido. Por ejemplo, con respecto a agentes de la guerra biológica, si se supone que una composición o un contenedor contiene ántrax, una espora de ántrax puede ser utilizada de modo que, después de haber completado el proceso de esterilización, se puede determinar si o no el proceso ha sido eficaz para destruir el indicador de ántrax.

Los artículos que pueden ser sometidos a una esterilización utilizando el indicador biológico de la presente invención son numerosos y comprenden instrumentos que incluyen instrumentos quirúrgicos, equipos que incluyen tubería como para el transporte de compuestos médicos y farmacéuticos, composiciones tal como varios polvos, mezclas, soluciones, tejidos, y siempre cuando se busca una indicación de un proceso de esterilización o desinfección.

La función y ventaja de las realizaciones de la presente invención se comprenderán más plenamente a partir de los ejemplos indicados más abajo. A través de los ejemplos concretos siguientes se pretende ilustrar los beneficios de la presente invención, pero ellos no son ejemplos para el pleno ámbito de la invención.

EJEMPLO COMPARATIVO 1A

Se utiliza un sustrato que contiene una superficie terminada por amina, sea manufacturada con la funcionalidad tal como un sustrato de poliestireno o vidrio, sea modificada utilizando una monocapa autoensamblada con el grupo terminal deseado o tratada con algún medio físico o químico para liberar grupos funcionales o hacerlas accesibles. Un reactivo heterobifuncional de reticulación, *N*-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), reacciona con la superficie terminada por amina en salina tamponada con fosfato durante 30-60 minutos (una solución madre de 20mM SPDP se hace en DMSO o en EtOH), de modo preferente a temperaturas entre 17°C-40°C. Todo exceso de SPDP es eliminado aclarando el tamón de fosfato. A continuación, la superficie es reducida utilizando ditiotreitil (DTT) durante aproximadamente 30 minutos. Después, unas esporas *Geobacillus stearothermophilus* reaccionan con la superficie reducida durante un periodo de tiempo desde aproximadamente 1 segundo hasta unas 18 horas. Además, la espora es ligada de modo covalente al agente de reticulación que, por su parte, es ligado de modo covalente con el grupo funcional de amina sobre el sustrato.

EJEMPLO COMPARATIVO 1B

Tiolación de una espora

Una solución de espora de 106 a 109 cfu/mL se formula con una solución PBS. Una alícuota de 120mL de 20 mM SPDP se añade a 0.5 mL de la suspensión de espora. (Las soluciones pueden ser dimensionadas tal como es conveniente.) A continuación, el SPDP reacciona con las esporas durante un periodo de 1 segundo hasta unas 2

horas, y de modo preferente entre 1 segundo y 30 minutos. El grupo amino reactivo del SPDP, N-hidroxisuccinimida (NHS) reaccionará con las aminas disponibles en las proteínas del revestimiento de espora. Después, el SPDP no reactivo es eliminado utilizando los métodos habituales tal como diálisis, filtración, o las dos, u otros medios conocidos para los expertos en la materia. Posteriormente a la separación del SPDP no reactivo, las esporas recientemente tioladas se ponen en contacto con una superficie que ha sido modificada previamente con SPDP (de acuerdo con el mismo método utilizado en otros ejemplos) y posteriormente ha sido reducida. La espora reaccionará entonces con la superficie creando un enlace covalente a través de un enlace de disulfuro.

EJEMPLO COMPARATIVO 2

(Sin agente de reducción)

Si se utiliza un sustrato con grupos funcionales originales de hidroxilo (o una superficie de polímero que ha sido tratada con gas plasma para crear funcionalidades de hidroxilo en la superficie), el reactivo heterobifuncional, N-(p-maleimidofenil) isocianato (PMPi), es llevado a reaccionar con la superficie que contiene grupos hidroxilados en un tampón no hidroxílico con un pH alcalino durante 30 minutos (una solución madre de PMPi se prepara en DMSO o en DMF con un exceso molar de aproximadamente 10 veces de la concentración de hidroxilos presente en la superficie). El grupo terminal de isocianato del PMPi reacciona entonces con las moléculas de hidroxilo en la superficie del sustrato para formar enlaces de uretano. Los grupos sulfhidrilos que están presentes sobre las esporas *Geobacillus stearothermophilus* reaccionan entonces con el extremo funcional de maleimida del reticulador con un pH neutro durante un periodo de 2 horas a una temperatura ambiente. El reactivo heterobifuncional de reticulación es ligado de modo covalente a las esporas y a los grupos de hidroxilo del sustrato.

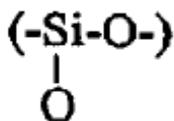
EJEMPLO COMPARATIVO 3

(Sin agente de reducción)

Un sustrato que tiene o dobles enlaces de origen, tal como grupos de vinilo a proximidad de la superficie, o una superficie tratada para crear dobles enlaces, es sumergida en una solución de fosfato de sodio de pH 7-9 en la presencia de una solución de 10% de 10mM N-succinimidil-6-[4'-azido-2'-nitrofenilamino]hexanoato (SANPAH) en DMSO o en DMF. La muestra (sustrato y solución) se expone a la luz UV a una longitud de onda de 300-460 nm (de modo deseado entre 300 nm-370 nm) durante habitualmente menos de un minuto. El grupo de azido nitrofenilo del SANPAH forma un grupo de nitreno que, por su parte, inicia una reacción adicional con los dobles enlaces sobre la superficie del sustrato. En un tampón de fosfato a pH 7, una suspensión de espora *Geobacillus stearothermophilus* (concentración de 107 cfu/ml) se pone en contacto con la superficie modificada durante un periodo de 60 minutos a temperatura ambiente. Los ésteres de NHS reaccionan con los grupos primarios de amino para formar enlaces estables de amida. El agente de reticulación SANPAH es ligado de modo covalente a las esporas y al grupo de vinilo, situado sobre la superficie del sustrato.

En una realización diferente de la presente invención, se utiliza un agente de acoplamiento de silano funcionalizado para añadir un grupo funcional group al sustrato, con el grupo funcional siendo posteriormente atado directamente al indicador de microorganismo, sin la intervención de un reactivo de reticulación. De acuerdo con ello, no se forma ningún enlace covalente entre el grupo funcional del sustrato y el microorganismo tal como una espora, pero se forma más bien un tipo físico u otro de enlace no covalente. El agente de acoplamiento funcionalizante puede presentar la fórmula $(FR)_nSiX_{4-n}$ donde n es igual a entre 1 y 3, y de modo conveniente desde 1 a 3. R es un compuesto orgánico tal como un alquilo que tiene desde 1 hasta unos 20 átomos de carbono, y de modo conveniente desde 2 hasta unos 18 átomos de carbono, y de modo preferido desde 3 hasta unos 16, o un compuesto aromático que tiene desde 6 hasta unos 20 átomos de carbono, y de modo deseado desde 6 hasta unos 15 átomos de carbono, o combinaciones de los mismos, tal como un alquilarilo, y un arilalquilo, y similares. X es a haluro, tal como un grupo de cloro o de bromo, siendo cloro el preferido, o un grupo de alquilóxido, OR1, en donde R1 es un alquilo que tiene desde 1 hasta unos 10 átomos de carbono, y de modo preferente desde 1 a 2 átomos de carbono. De acuerdo con ello, se puede utilizar un gran número de agentes de acoplamiento de silano, y ejemplos representativos incluyen propiltrimetoxisilano, butiltrimetoxisilano, propiltriethoxisilano, butiltriethoxisilano, propiltriclorosilano, propiltribromosilano, butiltriclorosilano, butiltribromosilano, 11-hexadeciltriclorosilano, 15-pentadeceniltriclorosilano, 11-bromoundeciltriclorosilano, monoclorosilano, diclorosilano, y similares. El grupo funcional del agente de acoplamiento de silano, F, es un compuesto que puede ser atado a la bacteria, espora, etc. como a través de un enlace físico. Los grupos funcionales apropiados incluyen compuestos de tio, compuestos de amina, compuestos que contienen carbonilo, compuestos de bromo, compuestos de epoxi, compuestos que contienen carboxilo, compuestos de alqueno y compuestos de alquino, y similares, así como derivados de los mismos. Ejemplos of agentes de acoplamiento de silano funcionalizado, de este modo, incluyen 3-aminopropiltrimetoxisilano, 3-aminopropiltriethoxisilano, 3-mercaptopropiltrimetoxisilano, 3-mercaptopropiltriethoxisilano, 3-aminopropiltriclorosilano, 3-mercaptopropil-triclorosilano, y similares.

Puesto que los varios silanos orgánicos, de modo general, tienen más de un grupo X, y habitualmente 3, pueden reticularse con grupos de hidroxilo grupos que existen de modo inherente sobre algunos sustratos tal como vidrio y celulosa, para formar una red bidimensional de monocapas de grupos



5 en donde los átomos de oxígeno están derivados del grupo de hidroxilo ligado a la superficie del sustrato. Naturalmente, se puede utilizar un único tipo de agente de acoplamiento de silano funcionalizado o una mezcla de dos o más tipos diferentes de agente de acoplamiento de silano funcionalizado. El resultado final es la creación de una alta densidad de indicadores de microorganismo que están inmovilizados sobre la superficie del sustrato.

10 El proceso de preparación de la capa de los agentes de acoplamiento de organosilano funcionalizado al sustrato comprende la aplicación del compuesto de silano en un solvente que ha sido calentado hasta unos 60°C-75°C previamente a la deposición de los correspondientes alquilos de silano. Solventes apropiados son cualquier solvente orgánico seco, incluyendo hidrocarburos aromáticos tal como el tolueno, hexadecano, benceno, naftaleno, xileno, cetonas secas tal como la acetona y similares, con el hexadecano siendo el preferido.

15 El indicador de microorganismo tal como las esporas puede ser adsorbido físicamente a la superficie a través de interacciones hidrófobas o electroestáticas entre las moléculas funcionales sobre la superficie del sustrato y las proteínas en el revestimiento de la espora. Las esporas pueden ser adsorbidas también químicamente a la superficie utilizando los grupos de amino presentes en las proteínas.

20 EJEMPLO COMPARATIVO 4
(Agente de Enlace Silano)

25 Las muestras de un material de sustrato que contiene una célula cerrada de adsorción o una placa de cristalización se preparan a través de una limpieza con una solución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno para eliminar todas las impurezas orgánicas sobre la superficie. A continuación, el sustrato es aclarado con grandes cantidades de agua para eliminar cualquier ácido o peróxido residual.

30 Después, el sustrato es mojado en una solución de silano que consiste de 1 % hexadeciltriclorosilano o 11-bromoundeciltriclorosilano o 15-pentadeceniltriclorosilano en hexadecano durante aproximadamente 30 segundos hasta 5 horas en un baño de agua de 60°C-75°C. Después, el sustrato es separado y aclarado con un solvente no polar para eliminar moléculas residuales de silano.

35 Para preparar el indicador biológico, el sustrato funcionalizado es sumergido, o mojado, en una solución de espora de unos 5-100 mLs durante un periodo de entre aproximadamente 1 segundo y 3 horas. Alternativamente, el sustrato funcionalizado puede ser inoculado, pulverizado o imprimido con las suspensiones de espora. Posteriormente a la inmersión, o el mojado, en la solución de espora, el sustrato se deja secar en condiciones ambientales (17°C-25°C y 1-30 minutos). Después de que se haya secado, el artículo indicador biológico es aclarado con agua estéril para eliminar todas las esporas que no están bien adheridas. Este aclarado permite que permanezcan sólo las esporas bien adheridas. Después, el indicador biológico se vuelve a secar en condiciones ambientales y es inspeccionado para determinar la cantidad y distribución de la población de esporas.

45 EJEMPLO COMPARATIVO 5
(Agente de Enlace Silano)

50 Las muestras de un material de sustrato de vidrio se modifican para que contengan una superficie terminada en amina sobre las mismas. Las superficies de vidrio se limpian utilizando una solución de 30% de peróxido de hidrógeno (35%) y 70% de ácido sulfúrico concentrado. La superficie funcional de amina se prepara sumergiendo la superficie de vidrio limpiada en una solución de 1 % de 3-aminopropiltrimetoxisilano en un solvente no acuoso, de modo preferente hexadecano o acetona. La superficie funcional de amina es mojada en una solución de salina tamponada en fosfato que contiene una solución madre de 20mM SPDP en DMSO o en EtOH durante un periodo de desde unos 30 minutos hasta unos 60 minutos a una temperatura entre 17°C-25°C. El exceso de SPDP es eliminado entonces, a través de un aclarado en el tampón de fosfato.

55 A continuación, la superficie del sustrato es reducida utilizando una solución de tampón de acetato que contiene 25mg/ml de ditiotreitól (DTT). La superficie se sumerge en la solución de acetato/DTT durante 30 minutos a una

temperatura de 17°C-25°C. Después, las superficies son aclaradas con grandes cantidades de tampón de acetato para eliminar todo el DTT.

5 Para preparar el artículo indicador biológico, el sustrato con los agentes heterobifuncionales atados es sumergido en un volumen apropiado de una solución de espora durante un periodo entre unos 30 segundos y unas 20 horas. Posteriormente a la inmersión, o el mojado, en la solución de espora, el sustrato se deja secar en condiciones ambientales [17°C-25°C].

10 EJEMPLO COMPARATIVO 6

10 En otra realización diferente se pueden utilizar unas superficies funcionalizadas de hidroxilo, tal como vidrio de borosilicato, para preparar el indicador biológico. El sustrato funcionalizado es sumergido, o mojado, en una solución de espora de aproximadamente 5-100 mLs durante un periodo entre aproximadamente 1 segundo y 3 horas. Tras la inmersión, o el mojado, en la solución de espora, el sustrato se deja secar en condiciones ambientales (17-25°C y 1-30 minutos). En cuanto está seco, el artículo indicador biológico es aclarado con agua estéril para eliminar todas las esporas que no están bien adheridas. Este aclarado permite que permanezcan sólo las esporas bien adheridas. Después, el indicador biológico se vuelve a secar en condiciones ambientales y es inspeccionado visualmente para determinar la cantidad y distribución de la población de esporas y el número de esporas sobre una superficie. Una población uniforme de esporas se obtiene en la que el estándar de desviación es aproximadamente 25% o menos.

20 Mientras que, de acuerdo con los estatutos de patente, se han expuesto el mejor modo y la realización preferida, el ámbito de la invención no está limitado a los mismos, sino más bien por el ámbito de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Indicador biológico para el control de la esterilidad, comprendiendo:

5 un sustrato;
 una capa de superficie que contiene grupos funcionales que residen sobre dicho sustrato, en donde dichos grupos
 funcionales de capa de superficie contienen menos de 10 % de átomos de enlace de silicio, basados en la cantidad
 total de dichos grupos funcionales de capa de superficie;
 unos indicadores de microorganismos seleccionados entre el grupo constituido por una endóspora, por un hongo,
 10 por una micobacteria, por una bacteria vegetativa, por un protozoo, o por cualquier combinación de los mismos;
 un agente de reticulación de longitud zero que presenta un grupo terminal funcional ligado de manera covalente a
 uno de dichos grupos funcionales de capa de superficie y que presenta otro grupo terminal funcional ligado de
 manera covalente a uno de dichos indicadores de microorganismos, de modo que un indicador de microorganismo
 está presente, que está ligado de manera covalente a través de dicho agente de reticulación a dicha capa de
 15 superficie, presentando dicha capa de superficie unos indicadores de microorganismos ligados a la misma, que son
 capaces de ser esterilizados a través de un medio de esterilización,
 en donde dichos indicadores de microorganismos ligados, que están ligados de manera covalente a dicha capa de
 superficie, presentan una distribución uniforme, en donde la desviación estándar de la distribución es de 50 % o
 20 inferior en base a una superficie unitaria de dicha capa de superficie en comparación con otra superficie unitaria de
 dicha capa de superficie; y
 en donde el agente de reticulación de longitud zero comprende un clorhidrato de 1-etil-3-[3-
 dimetilaminopropil]carbodiimida.

25 2. Indicador biológico para el control de la esterilidad de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad de
 dichos átomos de enlace de silicio es inferior a 5 % de la cantidad total de dichos grupos funcionales ligados a dicha
 capa de superficie.

30 3. Indicador biológico para el control de la esterilidad de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichos grupos
 funcionales de capa de superficie comprenden hidróxilo, amino, ácido carboxílico, carbonilo, alquenos que contienen
 un número total de 2 a 20 átomos de carbono, halogenuros; en donde dicha endóspora comprende *Geobacillus*
stearothermophilus, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis globigii*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus*
circulans, o cualquier combinación de los mismos;
 en donde dicho hongo comprende *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella*
dermatitis o cualquier combinación de los mismos;
 35 en donde dicha micobacteria comprende *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium*
smegmatis, *Mycobacterium terrae*, o combinaciones de los mismos;
 en donde dicha bacteria vegetativa comprende *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*
faecalis, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella*
pneumophila, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*,
 40 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, o cualquier combinación de los
 mismos; y
 en donde dicho protozoo comprende *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, o cualquier combinación de los
 mismos.

45 4. Indicador biológico para el control de la esterilidad de acuerdo con la reivindicación 3 en donde la cantidad de
 dichos átomos de enlace de silicio es inferior al 3 % de la cantidad total de dichos grupos funcionales ligados a dicha
 capa de superficie.

50 5. Indicador biológico para el control de la esterilidad de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la cantidad de los
 átomos de enlace de silicio es inferior al 2 % de la cantidad total de dichos grupos funcionales ligados a dicha capa
 de superficie; y en donde dicha desviación estándar es del 25 % o inferior.

6. Indicador biológico para el control de la esterilidad, comprendiendo:
 un sustrato y, eventualmente, una capa de superficie que reside sobre dicho sustrato, en donde dicho sustrato o
 55 dicha capa de superficie eventual, cuando se utiliza, contiene unos grupos funcionales sobre el mismo, en donde
 dichos grupos funcionales contienen menos del 10 % de los átomos de enlace de silicio con respecto a la cantidad
 total de dicho sustrato o de dichos grupos funcionales de la capa de superficie eventual;
 un agente etiológico seleccionado entre el grupo que consiste de un agente de bioterrorismo, de un organismo de
 importancia clínica, de una cepa de bacteria resistente, de un componente subcelular, o de una combinación
 60 cualquiera de los mismos;
 un agente de reticulación de longitud zero que presenta un grupo terminal funcional ligado de manera covalente a
 uno de dichos grupos funcionales de sustrato o a uno de dichos grupos funcionales de capa de superficie eventual, y
 que presenta otro grupo terminal funcional ligado de manera covalente a uno de dichos indicadores de agentes
 etiológicos de tal modo que un indicador de agente etiológico está presente, que está ligado de manera covalente a
 65 través de dicho agente de reticulación a dicho sustrato o a dicha capa de superficie eventual, presentando dicho

- sustrato o a dicha capa de superficie eventual unos agentes etiológicos ligados al mismo o la misma, capaces de ser esterilizados mediante un medio de esterilización, que están ligados de manera covalente a dicho sustrato o a dicha capa de superficie eventual, presentan una distribución uniforme en la que la desviación estándar de la distribución es del 50 % o inferior,
- 5 con respecto a una unidad de superficie de dicho sustrato o dicha capa de superficie eventual en comparación con otra superficie de dicho sustrato o de dicha capa de superficie eventual, y en donde el agente de reticulacion de longitud zero comprende un clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida.
- 10 7. Indicador biológico para el control de la esterilidad de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho sustrato o dichos grupos funcionales de capa de superficie comprenden hidroxilo, amino, ácido carboxílico, carbonilo, alquenos que contienen un número total de 2 a 20 átomos de carbono, halogenuros; en donde la cantidad de dichos átomos de enlace de silicio es inferior al 5 % de la cantidad total de dicho sustrato o de dichos grupos funcionales de capa de superficie eventual;
- 15 en donde dicho agente etiológico comprende *Enterococci*, resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina, *Mycobacterium chelonii*, unos virus, unos priones proteicos, *Bacillus anthracis*, la toxina *Clostridium botulinum*, *Brucella* spp., *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia psittaci*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burnetii*, el virus nipah, un hantavirus, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Ricinus communis*, *Rickettsia prowazekii*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Variola major*, *Staphylococcal enterotoxin B*, unos alfavirus, unos filovirus, unos arenovirus,
- 20 *Cryptosporidium parvum*.