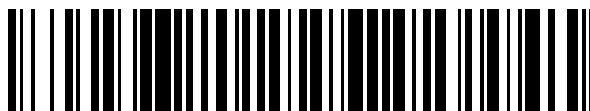


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 215**

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 06844097 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014** **EP 1886143**

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:

12.11.2014

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 2 521 215 T3

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

DESCRIPCIÓN

Indicador biológico

5 Antecedentes de la invención

Ámbito de la invención

10 La invención se refiere a un indicador biológico estéril para hacer el seguimiento de la esterilidad o de la desinfección, etc., que tiene una superficie soporte, que contiene grupos funcionales, que están unidos por un enlace covalente con uno o más microorganismos mediante un reactivo de reticulación o unión cruzada. El indicador es deseable que contenga una población uniforme y consistente de microorganismos, que puede utilizarse para evaluar varios tratamientos de esterilización de dispositivos y accesorios médicos, instrumentos, soluciones, superficies, ropas y similares, para indicar el grado o el éxito de esterilización con respecto a los artículos que tiene
15 que reutilizarse o esterilizarse en sentido terminal.

Descripción de la técnica anterior

20 Los indicadores biológicos se emplean para probar y/o determinar la eficacia de los procesos de esterilización. Un indicador biológico típico contiene una población calibrada de microorganismos que tienen una gran resistencia al proceso de esterilización en investigación. Después de la exposición al proceso de esterilización se incuban los indicadores biológicos en un medio de cultivo para estimular el crecimiento de todos los microorganismos viables restantes. Los indicadores biológicos presentes llevan el medio de cultivo dentro del indicador, normalmente en un vial de cierre rompible. Los indicadores biológicos de tiras de esporas se combinan con un recipiente separado de
25 medio de cultivo después del proceso de esterilización investigado. El posterior crecimiento biológico, puesto de manifiesto por un viraje del color o por la turbidez del medio de cultivo, es una indicación de que el proceso de esterilización es ineficaz.

30 Las esporas bacterianas resultan favorecidas normalmente por los indicadores biológicos debido a que se acepta que dichas esporas microbianas son más resistentes a los procesos de esterilización que la mayoría de otros tipos de microorganismos y por ello se supone que el proceso de esterilización que pretende matar las esporas microbianas matará también a todos los demás microorganismos contaminantes.

35 La elección de las esporas bacterianas dependerá del modo de esterilización, del tipo de esterilización y de la técnica a evaluar. Se emplean por ejemplo las esporas del *Geobacillus stearothermophilus* para hacer el seguimiento de sistemas de esterilización aplicando calor húmedo, ácido peracético, peróxido de hidrógeno y otros compuestos peroxi no solo en estado líquido, sino también en estado vapor, porque estas esporas del indicador son muy resistentes a los compuestos químicos oxidantes. De modo similar se emplean las esporas del *Bacillus subtilis* para hacer el seguimiento de la esterilización con etileno óxido y de los sistemas de esterilización con calor seco.
40

Los microorganismos se hallan soportados por lo general sobre un vehículo o sustrato, por ejemplo una cinta o un disco. El sustrato está formado por un material compatible con el proceso de esterilización y que no contiene aditivos que puedan influir en la evaluación de la esterilidad. Como sustrato o soporte se emplean a menudo materiales del tipo filtro de papel, papel de cromatografía, papel secante, fibras de vidrio, plásticos poliméricos, cerámica, acero
45 inoxidable y artículos de óxidos metálicos.

Para distribuir los organismos en el sustrato se bombea por un método convencional una suspensión de microorganismos en agua o alcohol a una jeringuilla, que está colgada sobre una malla o tela de papel u otro material de sustrato. Se desplaza el papel por debajo de la jeringuilla a una velocidad constante, provocando la formación de un reguero de suspensión sobre el papel a medida que este pasa por debajo de la jeringuilla. Como alternativa, la suspensión se transfiere manualmente empleando una micropipeta al sustrato. Después se corta la tela de papel impregnado formando recortes de un tamaño apropiado para el uso de indicador, normalmente en forma de tiras de ensayo o de discos de ensayo.
50

55 La patente US 2003/027242 A1 se refiere a un indicador biológico de la esterilización y desinfección. El indicador biológico tiene un sustrato y un indicador de microorganismos. El indicador biológico no tiene un agente de unión cruzada heterobifuncional. En su lugar, las esporas se secan sobre el sustrato.

60 El documento US 5 942 408 A1 se refiere a un indicador biológico. El indicador biológico tiene un sustrato. El sustrato puede inocularse con un indicador de microorganismos. En este documento no se menciona que el indicador de microorganismos pueda fijarse al sustrato mediante un agente de unión cruzada heterobifuncional.

US 5 739 004 A1 y WO 94/28164 A se refieren, ambos, a indicadores biológicos. Las descripciones de los dos documentos son muy similares. Los indicadores biológicos tienen sustratos e indicadores de microorganismos. Los documentos se refieren a la inmovilización de los indicadores de microorganismos. En estos documentos se
65

menciona la inmovilización química del microorganismo o enzima. En estos documentos no se menciona el enlace covalente del microorganismo con el sustrato sino el enlace covalente de los microorganismos entre sí.

En GB 1 316 808 A se describe un indicador biológico que contiene un sustrato y un indicador de microorganismos. El indicador biológico no contiene un agente de unión cruzada.

No solo es importante la necesidad de una cantidad controlable de microorganismo sobre la superficie del sustrato, sino que también lo es que el microorganismo esté suficientemente inmovilizado en la superficie del sustrato. Se han propuesto varios tipos de engarce del microorganismo con la superficie del sustrato, incluidas las interacciones hidrófobas y las electrostáticas, el intercambio iónico y las fuerzas de van der Waals. En la patente US 4,478,946 se describe la adsorción de proteínas no funcional en la superficie y el empleo de agentes de reticulación o unión cruzada para fijar mediante enlace covalente las proteínas funcionales sobre las proteínas no funcionales adsorbidas. Sin embargo, tales técnicas de inmovilización a menudo proporcionan una fijación menor que la que sería de desear, en especial en medios acuosos. En la patente US 5,077,210 se describen agentes activos, por ejemplo proteínas inmovilizadas por enlace covalente sobre sustratos provistos de grupos hidroxilo. Se fija un silano sobre el sustrato y se une a un engarce heterobifuncional por un grupo funcional que da lugar a un grupo funcional libre, diferente del primer grupo, al que se ha unido una proteína pero conservando una alta funcionalidad de proteína. El silano tiene un grupo funcional que reacciona con el grupo hidroxilo del sustrato y un grupo tiol terminal que reacciona con un grupo funcional de un agente de unión cruzada heterobifuncional, que contiene un grupo succinimida, que reacciona con un grupo amino del agente activo.

Resumen de la invención

Un indicador biológico para determinar si una esterilización, desinfección u otro tratamiento de este tipo es eficaz con respecto a los organismos vivos orgánicos complejos, consta de un sustrato que contiene de modo intrínseco grupos funcionales en su superficie o añadidos al mismo o una capa de superficie autoadherida al mismo, por ejemplo una monocapa provista de grupos funcionales (SAM). Los grupos funcionales incluyen grupos hidroxilos, grupos haluro, grupos amina y similares, y de modo deseable excluyen a los grupos tio.

Como un agente de unión cruzada se emplea un agente heterobifuncional, que proporciona un enlace covalente de un indicador de microorganismos, por ejemplo una espora, un organismo vegetativo o un agente etiológico, con la superficie del sustrato provisto de grupos funcionales. En dicha forma de ejecución, el indicador de microorganismos está unido íntimamente con la capa de superficie o, con preferencia, con el sustrato que no tiene ningún capa superficial sobre el mismo y es muy difícil de quitar por lavado, turbulencia de fluidos o similares.

En otra forma de ejecución pueden utilizarse los grupos funcionales hidroxilo inherentes de un sustrato, por ejemplo de vidrio. En esta forma de ejecución, el indicador de microorganismos o el agente etiológico está unido a los grupos funcionales hidroxilo de la superficie mediante, pero sin limitarse a ello, un modo físico, electrónico, etc., o mediante enlaces de hidrógeno, pero no mediante un enlace covalente.

En cualquiera de las dos formas de ejecución se aplica el agente funcional de manera uniforme y consistente, asegurando de este modo que la población de microorganismos existente sobre el mismo será también uniforme y consistente.

Los indicadores biológicos se emplean en general para indicar si una esterilización, desinfección u otro tratamiento biocida de esta índole de varios artículos, por ejemplo instrumentos quirúrgicos, ha sido eficaz, de modo que dichos artículos puedan utilizarse de nuevo.

Un indicador biológico para hacer el seguimiento de esterilidad; que consta de: un sustrato; una capa de superficie que contiene grupos funcionales terminales que residen sobre dicho sustrato, dicha capa de superficie está sustancialmente libre de cualquier átomo de enlace de silicio; un indicador de microorganismos; y un reactivo de unión cruzada unido por enlace covalente con los grupos funcionales de dicha capa de superficie y unido por enlace covalente con dicho indicador de microorganismos.

Un indicador biológico formado por: un sustrato y de modo opcional una capa de superficie que reside sobre dicho sustrato, dicho sustrato o dicha capa de superficie opcional contienen grupos funcionales; un agente etiológico que consta de un agente de bioterrorismo, un organismo clínicamente relevante, una cepa de bacterias resistente, o un constituyente subcelular, o combinaciones de los mismos; y un agente de unión cruzada unido por enlace covalente con dichos grupos funcionales del sustrato o con dichos grupos funcionales de la capa opcional de superficie y unido por enlace covalente con dicho agente etiológico.

Descripción de la invención

Se describe un indicador biológico que es idóneo para hacer el seguimiento y/o para determinar la eficacia biocida de un proceso de esterilización, de desinfección o de desactivación de microorganismos, priones, agentes

etiológicos y similares, que en general son muy resistentes a tales procesos de tratamiento. Aunque las esporas, p. ej. las endoesporas, sean los microorganismos preferidos para el ensayo, porque en general tienen una gran resistencia a muchos procesos de esterilización, pueden utilizarse también otros microorganismos, que incluye los hongos, las micobacterias, las bacterias vegetativas y los protozoos, en lugar de las esporas. Es deseable que los microorganismos tengan grupos azufre terminales y en caso contrario, que estén tiolados, para que tengan grupos azufre terminales. Los ejemplos de endoesporas incluyen al *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis globigii*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus cereus* y *Bacillus circulans*. Los ejemplos de hongos incluyen al *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Wangiella dermatitis*. Los ejemplos de micobacterias que pueden emplearse en la presente invención incluyen al *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium terrae*.

Los ejemplos de bacterias vegetativas incluyen la *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae)*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Con respecto a las bacterias vegetativas, las células vegetativas y/o sus partes constitutivas pueden fijarse sobre una matriz de soporte sólido por el o por los mismos mecanismo(s) y sobrevivir al secado y al almacenado mediante la deposición en presencia de uno o más de una gran variedad de excipientes. Los excipientes son un amplio grupo de compuestos generalmente inertes, que se emplean para estabilizar entidades lábiles. Un subgrupo de excipientes incluye a los hidratos de carbono y en especial los oligosacáridos y los sacáridos poliméricos. Un ejemplo de tales compuestos es el disacárido trehalosa. Las concentraciones elevadas de trehalosa en los tejidos de ciertos organismos les permite sobrevivir en un estado de falta de agua y se ha demostrado además que sus componentes celulares funcionales sobreviven después de la deshidratación. De hecho se sabe que la trehalosa proporciona estabilidad a las membranas y a otras estructuras macromoleculares esenciales para la viabilidad de una célula en condiciones ambientales extremas (es decir, la liofilización). Otros compuestos excipientes estabilizantes incluyen (pero no se limitan a) los azúcares simples, p. ej. la sucrosa, glucosa, maltosa, los polímeros de cadena larga, p. ej. los dextranos, el almidón, la agarosa y la celulosa. Otros excipientes no basados en los hidratos de carbono podrían incluir también a las proteínas, los fosfonatos, los agentes tampón, las ceras, los lípidos, los aceites y otros materiales basados en hidrocarburos.

Los ejemplos de protozoos incluyen a la *Giardia lamblia* y al *Cryptosporidium parvum*.

En la presente invención se prefieren las esporas porque son muy resistentes a los procesos de esterilización, etc.

Además del seguimiento y/o la determinación de la eficacia de varios tratamientos o procesos relativos a la esterilización, etc. de las endoesporas, los hongos, etc., los indicadores de la presente invención pueden utilizarse con respecto y/o con relación a la eficacia de un tratamiento o proceso de esterilización o de desinfección.

Agentes etiológicos y otros agentes no simulativos

Los agentes etiológicos incluyen los agentes de bioterrorismo, los agentes clínicamente relevantes, los componentes subcelulares y las cepas de bacterias resistentes emergentes. Además de los organismos simulativos elegidos en base a su aceptación como representantes de naturaleza "más resistente" (p. ej. el *Geobacillus stearothermophilus*) y otros microorganismos antes mencionados, los agentes no autorreplicantes y los componentes o productos subcelulares de células pueden elegirse en base a su importancia clínica o en base a su utilización como antes de bioterrorismo. Estos organismos se incluyen a menudo en las cepas que ahora pueden tener resistencia a los medios normales de tratamiento antibiótico o a la desinfección química debido a las modificaciones naturales o a las introducidas por el hombre. Los ejemplos del primer tipo incluyen como mínimo los VRE (enterococos resistentes a la vancomicina), los MSRA (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) y el *Mycobacterium chelonae*. Estos organismos clínicamente significativos tienen un interés especial, porque los VRE y los MRSA representan a organismos han desarrollado resistencia a las contramedidas terapéuticas típicas (resistencia a los antibióticos) y el *M. chelonae* constituye un ejemplo de organismos que han desarrollado resistencia a algunos modos de desinfección eficaces hasta el presente (resistencia al glutaraldehído). Hay además un gran número de agentes etiológicos emergentes de importancia, de los que todavía no existe una alternativa simulativa, que pueden llevar asociado un riesgo o reto especial para la acción de curso terapéutico o para la desinfección. Un ejemplo de ello son los priones. Los priones no son organismos vivos de por sí, pero su función como agentes desencadenantes de enfermedades guarda relación con su estructura y esta relación entre estructura y función puede emplearse para determinar su ineficacia relativa. Otros agentes no autónomos (p.ej. los virus) así como sus elementos subcelulares y los priones proteináceos están contemplados en la presente invención.

Los agentes etiológicos que pueden emplearse como agentes de bioterrorismo o de enfermedades incluyen el ántrax (*Bacillus anthracis*), el botulismo (la toxina del *Clostridium botulinum*), la especie de brucela (brucelosis), la *Burkholderia mallei* (melioidosis, inglés: glanders), la *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis), la *Chlamydia psittaci* (psittacosis), el cólera (*Vibrio cholerae*), el *Clostridium perfringens* (toxina épsilon), la *Coxiella burnetii* (fiebre Q), las enfermedades infecciosas emergentes, por ejemplo el virus nipah y el hantavirus, la *Escherichia coli* 0157:H7 (E.

coli), las amenazas para la seguridad alimentaria (p. ej. las especies de salmonela), la *Francisella tularensis* (tularemia), la plaga (*Yersinia pestis*), la toxina de ricino del *Ricinus communis* (semillas de ricino), *Ricettisia prow-azekii* (la fiebre del tifus), la *Salmonella typhi* (la fiebre tifoidea), la shigella (shigellosis), la viruela (*Variola major*), la enterotoxina B de estafilococos, el *Vibrio cholerae* (cólera), la encefalitis viral (los alfavirus [p. ej. la encefalitis equina venezolana, la encefalitis equina oriental, la encefalitis equina occidental]), las fiebres virales hemorrágicas (filovirus [p. ej. el ébola, el Marburg] y los arenavirus [p. ej. Lassa, Machupo]), las amenazas para la seguridad del agua (p. ej. *Cryptosporidium parvum*) y la *Yersinia pestis* (la plaga), o las combinaciones de los mismos.

El microorganismo a investigar puede ser una especie individual o una combinación de especies. Cuando se emplea una combinación de especies para los procesos típicos de esterilización de dispositivos médicos, los organismos preferidos serán con gran frecuencia una combinación de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*.

Se emplea con preferencia un sustrato sólido como material de soporte de las esporas. El sustrato puede ser cualquier material inorgánico, por ejemplo el silicio, incluido el silicio cristalino; varios tipos de vidrio, incluido el vidrio de cal y sosa cáustica, el vidrio de borosilicato, el vidrio de fosfato, el vidrio de borofosfato, el vidrio de boroaluminosilicato y similares, que tienen cualquier forma geométrica o configuración, por ejemplo forma de láminas, de fibras, de esferillas, de microesferas de vidrio llamadas "Ballotini"; varios materiales cerámicos, que pueden definirse como materias primas térreas, en las que el silicio y su óxidos y los compuestos complejos conocidos como silicatos ocupan una porción predominante y que se han calentado a temperaturas elevadas, por ejemplo los productos de arcilla estructural, incluidas las tejas, azulejos y terracota, varias porcelanas, esmaltes de porcelana y similares; los metales, por ejemplo paladio, platino, hierro, cobre, oro; varios sustratos inorgánicos, que contienen superficies metalizadas, por ejemplo los que se detallan inmediatamente, los óxidos de varios metales, incluidos los metales de los grupos de 4 a 14 de la Tabla Periódica, incluidos el óxido de titanio, óxido de circonio, óxido de hierro, óxido de cobre, óxido de aluminio, las sílices, por ejemplo el cuarzo, el zafiro y similares.

Otro grupo de sustratos que pueden utilizarse son varios compuestos orgánicos, incluida la celulosa en varias formas, por ejemplo papel, filtro de papel, cartón y similares. Varios polímeros pueden ilustrarse con, pero sin limitarse a ellos, los polímeros acrílicos, incluidos los polímeros de ácido acrílico y los acrilatos, varias poliolefinas, por ejemplo el polietileno y el polipropileno, los polímeros de alcohol polivinílico; poliestireno; y similares. Los sustratos recién mencionados pueden ser también mezclas complejas formadas por los compuestos antes mencionados.

Los sustratos pueden modificarse por medios electrónicos y/o físicos, con plasma, con haces de electrones, con rayos gamma, con fotoactivación y similares. Tales tratamientos pueden utilizar grupos funcionales ya existentes, pueden añadir grupos funcionales o hacer que los grupos inherentes (es decir, activos) puedan evaluarse, en la superficie del sustrato, por ejemplo los grupos hidroxilo. Normalmente, por lo menos una parte de la superficie expuesta del sustrato será plana, aunque pueden tratarse también las superficies curvadas con arreglo a la presente invención; p. ej., la superficie del sustrato puede formarse en la superficie interior o exterior del tubo de ensayo o de una placa multihoyo o en el exterior de una esferilla o de un recipiente. El sustrato es con preferencia sólido, pero puede ser también poroso o parcialmente poroso.

Los sustratos pueden presentarse en un amplio abanico de formas, en el supuesto de que proporcionen una superficie expuesta. Los ejemplos de formas adecuadas incluyen las fibras, los hilos, las obleas, los discos, las láminas, los portaobjetos, las cápsulas de cristalización, las células cerradas de adsorción, los viales de vidrio para contener medios y similares. Los sustratos preferidos incluyen varias formas de celulosa, por ejemplo el papel, las fibras de vidrio, los vidrios de aluminoborosilicatos alcalinotérreos, el poliestireno y similares.

Los sustratos de la presente invención pueden contener de modo natural o inherente grupos funcionales asociados, p. ej. varios vidrios suelen contener grupos hidroxilo o grupos amina. Como alternativa, una capa de superficie separada que contenga grupos funcionales puede residir o existir en el sustrato en forma de monocapa, por ejemplo una SAM (método de la monocapa autoensamblada), que es bien conocida en la técnica y en la bibliografía técnica. La capa adicional o inherente de grupos funcionales contiene grupos hidroxilo, amina, ácido carboxílico, carbonilo, varios haluros, por ejemplo cloro o bromo, y varios alquenos que contienen un total de 2 a por lo menos 20 átomos de carbono. En general se evitan los grupos tio.

Es un aspecto importante de la presente invención el uso de agentes de reticulación o unión cruzada para unir mediante enlaces covalentes el indicador de microorganismos al sustrato. El agente de unión cruzada puede tener grupos funcionales, que son iguales o diferentes, existen numerosos tipos de grupos funcionales que pueden incluirse dentro de más de una categoría, por ejemplo varios compuestos amina, incluidas las aminas primarias, secundarias y terciarias, varias iminas, varias imidas, incluida la anilina, los ésteres de imidilo de ácidos carboxílicos, hidroxilo, ácidos carboxílicos, grupos alqueno que tienen de 2 a por lo menos 20 átomos de carbono, haluros, por ejemplo cloro o bromo, haluros de nitroarilo, grupos alcoxi que tiene un total de 1 a por lo menos 20 átomos de carbono, anhídridos, aldehídos, cianos, varios grupos que contienen azufre, por ejemplo tios, disulfuros o ditios y similares. Los grupos reactivos terminales de los agentes de reticulación o unión cruzada incluyen por lo general varias aminas, siendo preferidas las aminas primarias, tio u otros grupos que contiene azufre, carboxilo e hidroxilo.

Los compuestos habituales que contienen grupos aminas incluyen a los ésteres de succinimidilo, las maleimidas, las azidas y las yodoacetamidas.

Los reactivos de unión cruzada apropiados incluyen a los reactivos de unión cruzada heterobifuncionales.

Los ejemplos de reactivos de unión cruzada heterobifuncionales incluyen al 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-[3'-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de N-sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SPDP), 6-[3'-(2-piridilditio)-propionamido]hexanoato de N-succinimidilo (LC-SPDP), acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA), trans-4-(maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC), trans-4-(maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato de N-sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), 4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo (SMPB), 4-[p-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB), éster de N-(α -maleimidoacetoxi)succinimida (AMAS), 6-[β -maleimidopropionamidohexanoato de succinimidilo (SMPH), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), ácido N- κ -maleimidoundecanoico (KMUA) y 3-[bromoacetamido]propionato de succinimidilo (SBAP). Otros agentes de unión cruzada incluyen a la N-hidroxisuccinimida (NHS), la N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), el HCl del ácido 3-[2-aminoetilditio]propiónico (AEDP) (que puede ser también un reactivo de unión cruzada homobifuncional), N-succinimidil-adipato de metilo (MSA), el ácido N- β -maleimidopropiónico (BMPA), la hidrazina del ácido N-[κ -maleimidoundecanoico] (KMUH), la hidrazina de TFA del ácido N-[β -maleimidofenil-propiónico] (BMPH) y el isocianato de N-[p-maleimidofenilo] (PMPi).

Los reactivos de unión cruzada heterobifuncionales reaccionarán, pues, por un grupo terminal con el sustrato o con el compuesto provisto de grupos funcionales de la capa de superficie separada para formar un enlace covalente con él, mientras que uno o más de los grupos funcionales reaccionarán con un indicador de microorganismos o agente etiológico y formarán también un enlace covalente con él. El orden de reacción no es importante, ya que el agente de unión cruzada puede reaccionar en primer lugar con un grupo funcional de la superficie o de una capa de superficie y después con el microorganismo, o inicialmente con el microorganismo y después con el grupo funcional de la superficie o de la capa de superficie.

Es un aspecto importante de la invención la unión del indicador de microorganismos con el sustrato mediante enlaces covalentes fuertes, por lo menos de 10, de modo deseable entre 10 y 150, y con preferencia de 25 a 125 kilocalorías por mol. Tales enlaces o anclajes fuertes del indicador de microorganismos o del agente etiológico con el sustrato son resistentes a las condiciones adversas o turbulentas asociadas los desinfectantes de máquinas lavavajillas y/o los procesos de esterilización con líquidos químicos. En otras palabras, los indicadores biológicos de la presente invención son muy resistentes a la eliminación por lavado o a separarse del sustrato por el ataque del chorro pulverizado, por fuerzas hidrostáticas turbulentas o similares.

El indicador biológico de la presente invención se prepara aplicando una capa de reactivos de unión cruzada al sustrato o al laminado de capas separadas del sustrato que contiene un grupo funcional en la superficie. Los grupos funcionales están sustancialmente libres de o no contienen átomos de silicio de enlace. Los átomos de silicio de engarce están presentes cuando se emplea un agente de unión provisto de grupos funcionales silano. Con "sustancialmente libres" se indica en general que menos del 10 %, de modo deseable menos del 5 % y con preferencia menos del 2 ó 3 % o nada, es decir, ninguno de los grupos funcionales está unido al sustrato mediante un átomo de silicio intermedio. Los sustratos están también sustancialmente libres de proteínas, de proteínas y de péptidos parcialmente hidrolizados. La cantidad de una cualquiera de tales proteínas, etc., si están presentes, es baja, en general inferior por ejemplo al 10 %, de modo deseable inferior al 5 % y con preferencia inferior al 2 % o al 3 % de los grupos funcionales que están unidos al sustrato. En función del tipo de los grupos funcionales recién mencionados que están contenidos en el sustrato o en la capa de superficie, se empleará un reactivo de unión cruzada que tenga por lo menos un grupo terminal, que reaccione fácilmente con ellos y forme un enlace covalente. Por ejemplo, si la superficie del sustrato tiene un grupo funcional amina, uno de los grupos funcionales del reactivo de unión cruzada reaccionará fácilmente con él, por ejemplo un aldehído, una imida, un grupo carboxilo, un éster de amidilo de un ácido carboxílico, un anhídrido y similares. Uno de tales métodos se refiere a la utilización del reactivo de unión cruzada en un tampón, por ejemplo un tampón fosfato, en condiciones relativamente neutras, por ejemplo a un pH de 6 a 8, durante un período de tiempo apropiado para permitir que se forme un enlace covalente con el grupo funcional del sustrato. El exceso de reactivo de unión cruzada puede eliminarse por cualquier manera convencional, por ejemplo por enjuague o por lavado o por otra similar.

El o los grupos terminales restantes del reactivo de unión cruzada es un grupo funcional que reacciona fácilmente con el indicador de microorganismos o con el agente etiológico y forma un enlace covalente con él. Por lo tanto, el indicador de microorganismos, agente etiológico o agente o estimulante de enfermedad, etc., están unidos mediante enlace covalente con el grupo funcional de sustrato mediante el reactivo de unión cruzada. Tal como se ha mencionado antes, dichos grupos funcionales, que reaccionan con el microorganismo, incluyen un halógeno, un derivado de melamina, un grupo tio, una maleimida, una malamida, etc. Si el grupo funcional restante del reactivo de unión cruzada estuviera bloqueado por un grupo piridina, dicho grupo podría eliminarse con un agente reductor habitual. Los ejemplos de agentes reductores adecuados incluyen al ditiotretitol (DTT), β -mercaptoetanol, DMF, DMSO, hidruro de litio y aluminio, borhidruro sódico y similares. En una forma preferida de ejecución de la presente

invención, el agente heterobifuncional es el SPDP, que después de la reducción del compuesto elimina el grupo piridina, dejando un grupo sulfuro de hidrógeno que reacciona fácilmente y se une mediante enlace covalente al azufre presente en el grupo tio de la espora, de este modo la espora queda inmovilizada sobre la superficie del sustrato.

Dado que el microorganismo preferido de la presente invención es una espora de bacteria y dado que la espora contiene en general grupos terminales azufre, esto constituye una forma de ejecución deseada de la invención. Si la espora o microorganismo no contuviera un grupo terminal azufre, entonces podría tiolarse antes de la reacción con el agente de unión cruzada. La tiolación de microorganismos ya es conocida en la técnica y en la bibliografía técnica.

El o los reactivos de unión cruzada pueden hacerse reaccionar por una gran variedad de métodos por ejemplo a temperatura ambiente, a temperaturas elevadas, por radiación por ejemplo rayos ultravioleta y similares.

Un aspecto importante de la presente invención es la población uniforme y/o consistente de indicadores de microorganismos o agentes etiológicos en el sustrato o las combinaciones de los mismos de manera que la desviación estándar sea baja; situada en general por ejemplo en torno al 50 % o menos, de modo deseable en el 25 % o menos y con preferencia en el 10 % o menos, en base a la superficie, por ejemplo, un cm^2 comparado con otra zona del sustrato. La distribución uniforme de un indicador de microorganismos o agente etiológico se prepara por suspensión de un microorganismo de espora seleccionado, por ejemplo en una solución acuosa, por lo general agua o disolvente. Los disolventes pueden incluir al etanol, metanol y otros alcoholes, siendo preferido el etanol. Sin embargo, se da por supuesto que las esporas pueden suspenderse en una gran variedad de soluciones, en el supuesto de que las propiedades de viabilidad y resistencia de las esporas no resulten comprometidas.

Como alternativa, los reactivos de unión cruzada mencionados antes pueden reaccionar inicialmente con uno o más tipos de indicadores de microorganismos o agentes etiológicos y similares, y después aplicarse en una solución acuosa o disolvente a un sustrato que contenga grupos funcionales, después de lo cual el agente de unión cruzada queda unido al mismo por enlaces covalentes.

El sustrato preparado, que tiene un grupo funcional inherente o grupos funcionales aportados por una monocapa autoensamblada (SAM), que está unida con enlace covalente a un reactivo de unión cruzada, se inocula seguidamente con un microorganismo, por ejemplo una suspensión de esporas de una concentración concreta predeterminada. La concentración de la suspensión de esporas puede variar en función de los requisitos de aplicación y de la velocidad deseada para la aplicación al sustrato, pero se situará en general entre 10^4 cfu/ml y 10^9 cfu/ml. La inoculación de la solución de esporas en el soporte se lleva a cabo por inmersión o impregnación de la superficie en la solución de esporas, el pipeteo, la pulverización o la impresión de un volumen fijo de suspensión sobre el sustrato. La cantidad concreta de microorganismo depositada o residente en el indicador biológico se situará entre 10^4 y 10^7 cfu/indicador biológico. Cuando el sustrato es normalmente plano, por ejemplo una celda cerrada de adsorción o un portaobjetos de microscopio, se cubre la totalidad de la superficie del soporte. Cuando el sustrato es por lo general una superficie curvada, por ejemplo un vial de vidrio para contener medios, entonces solamente se cubre una porción terminal de la superficie total.

Después se seca el sustrato inoculado a temperatura ambiente, entre aprox. 17°C y 25°C durante un período de tiempo de aprox. 1 min a 30 min o más, o a temperaturas elevadas para reducir el tiempo de secado. Después de la inoculación del soporte se enjuaga el sustrato con agua o con un disolvente, para eliminar las esporas que no se hayan unido estrechamente con la superficie. El sustrato puede inspeccionarse visualmente empleando instrumentos foto-optométricos, por ejemplo un microscopio óptico o un microscopio de escaneo de muestras para determinar la uniformidad de la población del indicador de microorganismos en la superficie del soporte. La población de la superficie del soporte puede cuantificarse también valorando muestras maceradas o sometidas a ultrasonidos, o por otros métodos que los expertos ya conocen.

En lugar de los indicadores de microorganismos, por ejemplo esporas, pueden aplicarse de manera similar varios agentes etiológicos al sustrato para lograr una concentración deseable en la superficie.

Debido a que pueden prepararse sustratos o capas de superficie que tengan concentraciones de grupos funcionales uniformes y consistentes, que están unidos por enlace covalente mediante el reactivo de unión cruzada con los microorganismos o agentes etiológicos, quedan fuertemente adheridos al sustrato con muy poca pérdida, si la hubiera, debida a los tratamientos o procesos turbulentos y/o químicos de esterilización. Los microorganismos, por ejemplo las esporas o los agentes etiológicos sirven, pues, como indicadores biológicos muy certeros de la eficacia de la esterilización de varios artículos. Por ejemplo, los indicadores biológicos de la presente invención son muy útiles para procesos de esterilización de tipo químico líquido, pero pueden utilizarse también en procesos de esterilización del tipo vapor, químico, radiación, fase vapor, etc. para varios artículos a esterilizar que se mencionan a continuación. Una vez finalizado el ciclo de la esterilización, uno o más de los indicadores biológicos se incuban de manera bien conocida en la técnica o con arreglo a la bibliografía técnica. Si uno de los microorganismos, por ejemplo esporas, o agentes etiológicos sobrevive al proceso de esterilización, entonces se cultivará durante la incubación en condiciones apropiadas que los expertos ya conocen. La presencia de cualquier crecimiento es un

indicativo del ciclo de esterilización no ha tenido éxito. Por lo tanto, después de la incubación de los indicadores biológicos se determinará el grado de desinfección o esterilidad por métodos convencionales. El resultado final viene determinado a menudo por la naturaleza de los artículos a esterilizar con una reducción log. por lo menos de 4 a 12, con preferencia por lo menos de 5 ó 6 a 8 ó 9. Una reducción log. de 6 significa que ha quedado uno o menos microorganismos entre 1.000.000 después de la exposición al proceso de esterilización.

El tipo de microorganismo, de espora o de agente etiológico utilizado como indicador biológico a menudo puede ser el mismo que el organismo específico que se pretende destruir. Por ejemplo, en lo que respecta a los agentes de lucha biológica, si una composición o un recipiente se cree que contiene ántrax, se podrá utilizar una espora de ántrax de modo que, una vez finalizado el proceso de esterilización, podrá determinarse si el proceso ha sido eficaz o no en destruir el indicador de ántrax.

Son numerosos los artículos que pueden someterse a esterilización utilizando un indicador biológico de la presente invención y abarcan los instrumentos que incluyen los instrumentos quirúrgicos, el equipo, que incluye las tuberías de transporte de compuestos médicos y farmacéuticos, las composiciones, por ejemplo varios polvos, mezclas, soluciones, ropa y siempre que haya indicación de un proceso de esterilización o de desinfección.

La función y la ventaja de las formas de ejecución de la presente invención se comprenderán mejor con los ejemplos que siguen. Los ejemplos concretos que siguen se facilitan para ilustrar los beneficios de la presente invención, pero no para limitar el pleno alcance de la invención.

Ejemplo 1A

Se utiliza un sustrato que contiene una superficie provista de grupos terminales amina, ya sea fabricado con estos grupos funcionales, por ejemplo un sustrato de vidrio o de poliestireno, ya sea modificado empleando una monocapa autoensamblada provista del grupo terminal deseado o bien tratada con algunos medios físicos o químicos para liberar o hacer accesibles los grupos funcionales. Se hace reaccionar un reactivo heterobifuncional de unión cruzada, el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) con la superficie provista de grupos terminales amina en una solución salina tamponada con fosfato durante 30-60 minutos (se prepara una solución patrón 20 mM de SPDP en DMSO o en EtOH) a una temperatura comprendida con preferencia entre 17°C y 40°C. Se elimina el exceso de SPDP enjuagando con el tampón fosfato. Después se reduce la superficie empleando el ditioneitol (DTT) durante aproximadamente 30 minutos. Después se hacen reaccionar las esporas del *Geobacillus stearothermophilus* con la superficie reducida durante un período de tiempo comprendido entre 1 segundo y 18 horas. Por otra parte se une la espora por enlace covalente con el agente de unión cruzada, que a su vez está unido por enlace covalente con el grupo funcional amina del sustrato.

Ejemplo 1B

Tiolación de una espora

Se formula una solución de esporas de 10^6 a 10^9 cfu/ml en una solución de PBS. Se añade una parte alícuota de 120 µl de SPDP 20 mM a 0,5 ml de la suspensión de esporas. (Las soluciones pueden emplearse a mayor escala, si se considera apropiado.) Después se hace reaccionar el SPDP con las esporas durante un período comprendido entre 1 segundo y 2 horas, siendo preferido un período entre 1 segundo y 30 minutos. El grupo reactivo amina del SPDP, la N-hidroxisuccinimida (NHS) reaccionará con las aminas disponibles de las proteínas del recubrimiento de esporas. Después se elimina el SPDP sin reaccionar empleando métodos típicos, por ejemplo la diálisis, filtración o ambas, u otros medios que los expertos ya conocen. Después de la separación del SPDP que no haya reaccionado se ponen en contacto las esporas recién tioladas con una superficie que se ha modificado previamente con SPDP (con arreglo a la misma metodología que se aplica en los demás ejemplos) y después se reducen. Entonces se hace reaccionar la espora con la superficie creando un enlace covalente mediante un engarce disulfuro.

Ejemplo 2

(sin agente reductor)

Empleando un sustrato con grupos funcionales hidroxilo nativos (o una superficie polimérica que se haya tratado con plasma de gas para generar grupos funcionales hidroxilo en la superficie), se hace reaccionar el reactivo heterobifuncional, el isocianato de N-(p-maleimidofenilo) (PMPI), con la superficie que contiene grupos hidroxilo en un tampón no hidrófilo, de pH alcalino, durante 30 minutos (se prepara una solución patrón de PMPI en DMSO o en DMF con un exceso molar aproximadamente de 10 veces sobre la concentración de hidroxilos presentes en la superficie). Después se hace reaccionar el grupo terminal isocianato del PMPI con la moléculas hidroxilo de la superficie del sustrato para formar enlaces uretano. Los grupos sulfhidrilo presentes en las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* se hacen reaccionar con los grupos funcionales terminales de maleimida del agente de unión cruzada en un pH neutro a temperatura ambiente durante un período de 2 horas. El reactivo heterobifuncional de unión cruzada queda unido por enlace covalente con las esporas y con los grupos hidroxilo del sustrato.

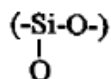
Ejemplo comparativo 3

(sin agente reductor)

Se sumerge un sustrato que tiene dobles enlaces nativos, por ejemplo grupos vinilo, próximos a la superficie o que tiene una superficie que se ha tratado para crear dobles enlaces, en una solución de fosfato sódico de pH 7-9 en presencia de una solución al 10 % de 6-[4'-azido-2'-nitrofenilamino]hexanoato de N-succinimidilo (SANPAH) 10 mM en DMSO o en DMF. Se expone la muestra (sustrato y solución) a la luz UV de una longitud de onda de 300-460 nm (a ser posible entre 300 nm y 370 nm) normalmente durante menos de un minuto. El grupo nitrofenilazida del SANPAH forma un grupo nitreno, que a su vez inicia una reacción de adición con los dobles enlaces de la superficie del sustrato. En un tampón fosfato de pH 7 se pone en contacto una suspensión de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (concentración de 10^7 cfu/ml) con la superficie modificada a temperatura ambiente durante un período de 60 minutos. Los ésteres NHS reaccionan con los grupos amino primarios para formar enlaces amida estables. El agente SANPAH de unión cruzada queda unido por enlace covalente con las esporas y con el grupo vinilo, situado en la superficie del sustrato.

En otra forma de ejecución de la presente invención se utiliza un agente de condensación provisto de grupos funcionales silano para hacer reaccionar un grupo funcional del sustrato con el grupo funcional, después se une directamente con el indicador de microorganismos sin intervención del reactivo de unión cruzada. Por consiguiente no se forma enlace covalente entre el grupo funcional del sustrato y el microorganismo, por ejemplo una espora, sino que se forma ante todo un enlace físico o de otro tipo, pero no covalente. El agente de enlace funcionalizante puede tener la fórmula $(FR)_nSiX_{4-n}$, en la que n adopta un valor entre 1 y 3, y de modo deseable entre 1 y 3. R es un compuesto orgánico, por ejemplo un alquilo que tiene de 1 a 20 átomos de carbono y de modo deseable de 2 a 18 átomos de carbono, y con preferencia de 3 a 16, o un compuesto aromático que tiene de 6 a 20 átomos de carbono, y de modo deseable de 6 a 15 átomos de carbono, o las combinaciones de los mismos, por ejemplo un alquilarilo, y un arilalquilo, y similares. X es un haluro, por ejemplo un grupo cloro o bromo, siendo preferido el cloro, o un grupo alcoxi, OR^1 , en el que R^1 es un alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono y con preferencia de 1 a 2 átomos de carbono. Por lo tanto pueden utilizarse muchos agentes de unión silano y los ejemplos representativos incluyen al propiltrimetoxisilano, butiltrimetoxisilano, propiltriethoxisilano, butiltriethoxisilano, propiltriclorosilano, propiltribromosilano, butiltriclorosilano, butiltribromosilano, 11-hexadeciltriclorosilano, 15-pentadeceniltriclorosilano, 11-bromo-undeciltriclorosilano, monoclorosilano, diclorosilano y similares. El grupo funcional F del agente de unión silano es un compuesto, que puede unirse a bacterias, esporas, etc. mediante una fijación física. Los grupos funcionales apropiados incluyen a los compuestos tio, los compuestos amina, los compuestos que tienen grupos carbonilo, los compuestos bromo, los compuestos epoxi, los compuestos que tienen grupos carboxilo, los compuestos alqueno, los compuestos alquino y similares, así como los derivados de los mismos. Los ejemplos de agentes de unión funcionalizados con grupos silano incluyen, pues, al 3-aminopropiltrimetoxisilano, 3-aminopropiltriethoxisilano, 3-mercaptopropiltrimetoxisilano, 3-mercaptopropiltriethoxisilano, 3-aminopropiltriclorosilano, 3-mercaptopropiltriclorosilano y similares.

Dado que varios silanos orgánicos tienen en general más de un grupo X y normalmente 3, podrán efectuar la unión cruzada con los grupos hidroxilo, que existen de modo inherente en algunos sustratos, por ejemplo el vidrio y la celulosa, para formar una red de monocapa bidimensional de grupos



en la que los átomos de oxígeno se derivan del grupo hidroxilo unido a la superficie del sustrato. Naturalmente, puede utilizarse un solo tipo de agente de condensación silano funcionalizado o una mezcla de dos o más tipos diferentes de agentes de condensación silano funcionalizado. El resultado final es la creación de una gran densidad de indicadores de microorganismos, que están inmovilizados en la superficie del sustrato.

El proceso de preparación de la capa de agentes de condensación organosilano funcionalizado con el sustrato consiste en aplicar el compuesto silano en un disolvente que se ha calentado aprox. a 60°C-75°C antes de la deposición del alquilsilano en cuestión. Los disolventes adecuados son cualquier disolvente orgánico seco, incluidos los hidrocarburos aromáticos de tipo tolueno, hexadecano, benceno, naftaleno, xileno, cetonas secas, por ejemplo acetona y similares, siendo preferido el hexadecano.

El indicador de microorganismos, por ejemplo esporas, puede adsorberse físicamente sobre la superficie por interacciones hidrófobas o electrostáticas entre las moléculas funcionales de la superficie del sustrato y las proteínas del recubrimiento de esporas. Las esporas pueden adsorberse también químicamente sobre la superficie empleando los grupos amina presentes en las proteínas.

Ejemplo comparativo 4

(agente de engarce silano)

Las muestras de un material de sustrato, contenidas en una celdilla cerrada de adsorción o en una cápsula de cristalización, se preparan por lavado con una solución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno para eliminar cualquier impureza orgánica de la superficie. Después se enjuaga el sustrato con cantidades copiosas de agua para eliminar cualquier resto de ácido o de peróxido.

A continuación se impregna el sustrato en una solución de silano que contiene un 1 % de hexadeciltriclorosilano o 11-bromoundeciltriclorosilano o 15-pentadeceniltriclorosilano en hexadecano en un baño de agua a 60°C-75°C durante aproximadamente un tiempo de 30 segundos a 5 horas. Después se saca el sustrato y se enjuaga con un disolvente no polar para eliminar las moléculas residuales de silano.

Para preparar el indicador biológico se sumerge o se impregna el sustrato funcionalizado en aproximadamente 5-100 ml de una solución de esporas durante un tiempo entre 1 y 18 horas, siendo preferido un tiempo comprendido entre 1 segundo y 3 horas. Como alternativa puede inocularse el sustrato funcionalizado, puede tratarse con un aerosol o imprimirse con la suspensión de esporas. Después de la inmersión o impregnación en la solución de esporas se deja secar el sustrato en condiciones ambientales (17°C-25°C y durante 1-30 minutos). Una vez seco, el artículo indicador biológico se enjuaga con agua estéril para eliminar las esporas que puedan estar unidas de modo poco firme. Este enjuague solamente lo resisten las esporas que están unidas tenazmente, que continúan ancladas. Entonces se seca de nuevo el indicador biológico en condiciones ambientales y se inspecciona para determinar el número y la distribución de la población de esporas.

Ejemplo 5

(agente de engarce silano)

Se modifican muestras de un material de sustrato de vidrio para que contengan una superficie terminada en grupos amina. Las superficies de vidrio se limpian con una solución de un 30 % de peróxido de hidrógeno (del 35 %) y un 70 % de ácido sulfúrico concentrado. La superficie con grupos funcionales amina se prepara sumergiendo la superficie de vidrio limpia en una solución de 3-aminopropiltrimetoxisilano al 1 % en un disolvente anhidro, con preferencia hexadecano o acetona. Se impregna la superficie con grupos funcionales amina en una solución salina tamponada con fosfato que contiene una solución patrón 20 mM de SPDP en DMSO o en EtOH durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 60 minutos a una temperatura entre 17°C-25°C. Seguidamente se elimina el exceso de SPDP por enjuague con tampón fosfato.

Entonces se reduce la superficie del sustrato con una solución de tampón acetato, que contiene 25 mg/ml de ditiotreitól (DTT). Se impregna la superficie de una solución de acetato/DTT a una temperatura de 17°C-25°C durante 30 minutos. Después se enjuagan las superficies con cantidades copiosas de tampón acetato para eliminar cualquier resto de DTT.

Para preparar el artículo indicador biológico se sumerge el sustrato con los agentes heterobifuncionales fijados en un volumen apropiado de una solución de esporas durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 20 horas. Después de la inmersión o impregnación en la solución de esporas se deja secar el sustrato en condiciones ambientales (17°C-25°C).

Ejemplo 6

En otra forma de ejecución adicional, las superficies provistas de grupos funcionales hidroxilo, por ejemplo el vidrio de borosilicato, pueden utilizarse para preparar el indicador biológico. Se sumerge o se impregna el sustrato funcionalizado en aproximadamente 5-100 ml de una solución de esporas durante un tiempo comprendido entre 1 segundo y 24 horas, siendo preferido un tiempo comprendido entre 1 segundo y 3 horas. Después de la inmersión o impregnación en la solución de esporas, se deja seca el sustrato en condiciones ambientales (17-25°C y 1-30 minutos). Una vez seco, el artículo indicador biológico se seca con agua esterilizada para eliminar las esporas que estén unidas de modo poco firme. Este enjuague solamente lo resisten las esporas unidas tenazmente, que continúan ancladas. Después se seca de nuevo el indicador biológico en condiciones ambientales y se inspecciona visualmente para determinar la distribución de la población de espora y el número de esporas de la superficie. Una población uniforme de esporas se obtiene cuando la desviación estándar es aproximadamente del 25 % o menos.

Después de haberse establecido el modo óptimo y la forma de ejecución preferida con arreglo a los estatutos de la patente, el alcance de la invención no se limita a ellos, sino que el alcance se define ante todo en las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un indicador biológico para el seguimiento de la esterilidad; que consta de:

- a. un sustrato con una superficie provista de grupos terminales residentes en la superficie de dicho sustrato;
- b. un indicador de microorganismos, formado por esporas, hongos, micobacterias, bacterias vegetativas o protozoos; y
- c. un agente de unión cruzada heterobifuncional, que une mediante enlace covalente el indicador de microorganismos con el sustrato,

en el que menos del 10% de los grupos funcionales está unido al sustrato mediante un átomo intermedio de silicio.

2. El indicador biológico de la reivindicación 1, en el que los grupos funcionales terminales incluyen a los grupos hidroxilo, amina, ácido carboxílico, carbonilo, haluro y alquenos que contienen un total de por lo menos 2 a 20 átomos de carbono.

3. El indicador biológico de la reivindicación 2, en el que los grupos funcionales terminales excluyen a los grupos tiol.

4. El indicador biológico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el indicador de microorganismos tiene grupos terminales azufre.

5. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato es sólido y con preferencia inorgánico, con mayor preferencia es un vidrio, una cerámica o un metal.

6. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que el sustrato es sólido y con preferencia orgánico, con preferencia especial es un polímero.

7. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión cruzada tiene grupos terminales reactivos, elegidos entre aminas, tio u otro sgrupos que contienen azufre, carboxilo e hidroxilo.

8. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión cruzada es el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo.

9. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones anteriores, en el que las esporas se eligen entre el *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis globigii*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus cereus* y *Bacillus circulans*.

10. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones de 1 a 8, en el que los hongos se eligen entre el *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Wangellia dermatitis*.

11. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones de 1 a 8, en el que las micobacterias se eligen entre el *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium terrae*.

12. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones de 1 a 8, en el que las bacterias vegetativas se eligen entre la *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae)*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

13. El indicador biológico de por lo menos una de las reivindicaciones de 1 a 8, en el que los protozoos se eligen entre la *Giardia lamblia* y el *Cryptosporidium parvum*.