

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 890**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11741328 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2596120**

54 Título: **Procedimiento de monitorización de un proceso de esterilización**

30 Prioridad:

20.07.2010 US 355307 P

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

15.12.2014

73 Titular/es:

**AMERICAN STERILIZER COMPANY (100.0%)
5960 Heisley Road
Mentor, OH 44060-1834 , US**

72 Inventor/es:

**FRANCISKOVICH, PHILLIP, P. y
CREGGER, TRICIA, A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 890 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

Procedimiento de monitorización de un proceso de esterilización

Campo técnico

5 La presente invención versa acerca de un procedimiento de monitorización de un proceso de esterilización. Más en particular, la presente invención versa acerca de un procedimiento de monitorización de un proceso de esterilización en el que un indicador biológico que comprende una célula con una membrana plasmática está expuesta al medio de esterilización. Posteriormente, se mide el potencial de membrana del indicador biológico para detectar la viabilidad de la célula.

Antecedentes

10 Es habitual emplear indicadores biológicos tales como bacterias en procedimientos de esterilización para determinar si un artículo que va a ser esterilizado ha sido expuesto o no a un nivel eficaz del o de los ingredientes activos del esterilizante. Se pueden utilizar indicadores biológicos para proporcionar una garantía de que se satisfacen las condiciones de esterilización en el procesador o en la propia carga procesada. Se pueden utilizar indicadores biológicos para representar el caso más desfavorable para el sistema de procesamiento al proporcionar un número sumamente grande de organismos muy resistentes a ese procedimiento particular dentro del indicador, o tras el mismo. A menudo se utilizan esporas como el organismo de elección para monitorizar tales procedimientos de esterilización. Normalmente, los usuarios de indicadores biológicos dependen de los efectos visuales que seguirían a la multiplicación de cualquier organismo viable superviviente para determinar la eficacia del proceso de esterilización en el que se emplean los indicadores biológicos. Este procedimiento puede llevar desde horas hasta 15 días para producir un cambio visible tal como turbidez en un medio de incubación o un cambio de color en un indicador de pH si se utiliza tal indicador.

Se han propuesto indicadores biológicos que correlacionan la actividad de una enzima termostable endógena (derivada internamente, preexistente) presente en una capa de esporas con la viabilidad real del organismo. Esto ha tenido como resultado tiempos de lectura que varían desde minutos hasta horas con un fluorímetro o colorímetro. Aunque estos indicadores biológicos proporcionan una correlación entre la actividad de la enzima y la viabilidad del organismo, los resultados reales obtenidos son debidos completamente a la actividad de la enzima y no tienen una relación directa con la viabilidad del organismo.

También se han propuesto indicadores biológicos que correlacionan la actividad de una enzima exógena (derivada externamente, no existente anteriormente) que es producida tras una inducción química de un gen recombinante si hay organismos viables de ensayo presentes después del evento de esterilización que está siendo evaluado que porta ese gen. Esto proporciona tiempos de lectura biológica que varían desde minutos hasta horas con una lectura fluorométrica y proporciona una relación directa con la viabilidad del organismo.

Fiksdal et al., J. Appl. Microbiol., 1999, 87, 62-71, dan a conocer que una esterilización de agua mediante irradiación UV con dosis superiores a 1900 mWs/cm² afecta al potencial de membrana medido con colorantes de oxonol sensibles al potencial de células de *E. Coli* presentes en el propio agua.

El documento EP 1 764 417 A1 hace referencia a un procedimiento y un aparato para medir eléctricamente un efecto adverso de sustancias tóxicas y de células procariotas que incluye la medición de un cambio intracelular completo provocado por la presencia de sustancias tóxicas como un cambio en una señal eléctrica de las membranas celulares de las células procariotas.

40 El documento US 2005/003396 A1 da a conocer componentes reactivos individuales inmovilizados sobre electrodos individuales y procedimientos para fabricar y utilizar los mismos. También se describen dispositivos, tales como los biosensores, que comprenden los componentes reactivos individuales inmovilizados sobre electrodos individuales. Además, da a conocer ensayos que utilizan los componentes reactivos individuales inmovilizados sobre electrodos individuales al igual que bases de datos que comprenden vectores de patrón distintivo para componentes reactivos.

Sumario

Un problema con estas tecnologías anteriores está relacionado con el hecho de que la técnica anterior ha dependido principalmente del crecimiento y de la división de organismos o de la presencia de actividad enzimática para detectar la viabilidad. La detección del crecimiento y de la división de organismos puede llevar desde horas hasta días. La detección de la actividad enzimática puede llevar desde minutos hasta horas. La actividad enzimática puede llevar desde minutos hasta horas para generar señales suficientemente intensas para que sean detectadas bien de forma fluorométrica o bien de forma colorimétrica. Por lo tanto, existe una necesidad de un procedimiento para conseguir resultados rápidos que sean tan definitivos como los conseguidos utilizando técnicas de crecimiento y de división. La presente invención proporciona una solución a este problema.

55 La presente invención versa acerca de un procedimiento, que comprende: (A) exponer tanto un artículo que va a ser esterilizado como un indicador biológico a un medio de esterilización durante un proceso de esterilización,

comprendiendo el indicador biológico una espora con una membrana plasmática; y (B) medir un cambio en el potencial de membrana de una espora germinante para detectar cualquier viabilidad restante de la espora. Esta viabilidad puede ser ejemplificada, sin limitación, por los cambios de potencial de la membrana asociados con eventos de flujo iónico o la germinación de las esporas indicadoras.

- 5 La invención versa acerca de un indicador de esterilización que comprende un material conductor eléctricamente colocado sobre un sustrato, y un indicador biológico (por ejemplo, esporas) colocados en parte del material conductor eléctricamente, o en todo él.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La **Fig. 1** es un gráfico que muestra los cambios de potencial de la membrana para las esporas sometidas a ensayo en el Ejemplo 1.
 La **Fig. 2** es una ilustración esquemática de un polarizador de fluorescencia.
 La **Fig. 3** es una ilustración esquemática de un indicador biológico utilizado junto con una monitorización electrónica de una germinación.
 15 Las **Figuras 4 y 5** son ilustraciones de indicadores biológicos alternativos para la evaluación del potencial de membrana por medio de señales eléctricas.
 La **Fig. 6** es una representación esquemática de un elemento inferior de una realización eléctrica de un indicador de esterilización según la presente invención.
 La **Fig. 7** es una representación esquemática de un elemento superior de una realización eléctrica de un indicador de esterilización según la presente invención, tal como el de la Fig. 6.
 20 La **Fig. 8** es una vista esquemática en planta desde arriba de una capa estanca superior para ser utilizada con una realización de la presente invención, tal como las de las Figuras 4-7.
 La **Fig. 9** es una vista esquemática en planta desde arriba de un elemento inferior 700 de otra realización de la presente invención, que es una realización basada en la fluorescencia de un indicador de esterilización.
 La **Fig. 10** es una vista frontal esquemática de un lector para ser utilizado con una versión basada en la electrónica de un indicador de esterilización según una realización de la presente invención, junto con vistas frontal y trasera de una tarjeta indicadora ejemplar electrónica de esterilización.
 25 Las **Figuras 11A y 11B** son vistas frontales esquemáticas de un lector para ser utilizado con una versión basada en la fluorescencia de un indicador de esterilización según una realización de la presente invención, en una posición cerrada y abierta, respectivamente.
 30 La **Fig. 12** es una vista esquemática en perspectiva de componentes internos de un lector de fluorescencia tal como el de la Fig. 11, junto con vistas frontal y trasera de una tarjeta indicadora ejemplar de esterilización basada en fluorescencia.
 La **Fig. 13** es una vista frontal esquemática de un lector para ser utilizado con un indicador biológico autocontenido FABI.

Descripción detallada

- El término "esterilización" hace referencia a hacer que una sustancia sea incapaz de reproducción, de metabolismo y/o de crecimiento. Aunque a menudo esto se interpretado con el significado de una ausencia total de organismos vivos, el término puede ser utilizado en el presente documento para hacer referencia a una sustancia libre de organismos vivos hasta un grado acordado o determinado anteriormente que es aceptable. A no ser que se indique lo contrario, el término esterilización puede ser utilizado en el presente documento para hacer referencia también a métodos y procedimientos menos rigurosos que la esterilización, por ejemplo, una desinfección, un saneamiento y similares.

- Los procedimientos y los aparatos descritos en el presente documento pueden ser utilizados en campos de la industria sanitaria, en campos científicos y similares. Estos pueden ser utilizados en aplicaciones comerciales e industriales en las que pueden ser deseados una esterilización, una desinfección, un saneamiento, una descontaminación, una limpieza y similares. Las aplicaciones comerciales e industriales pueden incluir procesos tales como la preparación de alimentos, la pasteurización, la descontaminación de suelos, la descontaminación de agua, y similares.

- El proceso de esterilización con el que se puede utilizar el procedimiento inventivo puede comprender cualquier proceso de esterilización. El proceso de esterilización puede incluir procedimientos de esterilización en los que el medio de esterilización o esterilizante puede comprender vapor, calor seco, radiación, plasma, al igual que uno o más esterilizantes gaseosos, uno o más esterilizantes líquidos y similares. Los procedimientos basados en radiación utilizados pueden comprender un haz de electrones o cualquier espectro electromagnético, incluidos radiación ionizante, luz blanca o ultravioleta pulsátil, microondas y similares. La radiación puede comprender radiación gamma o beta. Los esterilizantes gaseosos pueden comprender óxido de etileno, peróxido de hidrógeno gaseoso y similares. Los esterilizantes líquidos pueden comprender formalina (gas formaldehído disuelto en agua y que contiene, opcionalmente, metanol para inhibir la formación de sustancias tóxicas), glutaraldehído, ácido peracético, peróxido de hidrógeno líquido y similares. El indicador biológico puede ser utilizado para examinar la letalidad de esterilizantes contra cualquier microorganismo con menos resistencia al proceso de esterilización que el organismo

de ensayo proporcionado dotado del indicador biológico. Estos microorganismos pueden incluir bacterias tales como *Escherichia coli*, *Legionella sp.*, *Campylobacter sp.*, y otras bacterias entéricas, al igual que especies *Staphylococcus* y *Streptococcus* y otros microorganismos patógenos humanos tales como *Cryptosporidium*. El indicador biológico puede comprender uno o más organismos de ensayo. El organismo de ensayo puede comprender cualquier célula con una membrana plasmática cuya resistencia al procedimiento previsto de esterilización supere la de los otros organismos para cuya destrucción está diseñado el proceso de esterilización. El tipo de organismo de ensayo utilizado como el indicador biológico puede depender de una variedad de factores ejemplificados, sin limitación, por el tipo de proceso de esterilización que está siendo utilizado. El organismo de ensayo puede ser un microorganismo. Las cepas que pueden ser utilizadas pueden ser aquellas que sean las más resistentes al procedimiento utilizado para la esterilización. El microorganismo de ensayo puede comprender bacterias. Los microorganismos bacterianos pueden ser aquellos que forman endoesporas, es decir, esporas bacterianas. El organismo de ensayo puede comprender bacterias de los géneros *Bacillus* o *Clostridia*. El organismo de ensayo puede incluir *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis globigii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli*, o una mezcla de dos o más de los mismos.

El organismo de ensayo puede comprender hongos, micobacterias, protozoos, bacterias vegetativas, células vegetativas y/o sus partes constituyentes y similares. Ejemplos de hongos que pueden ser utilizados pueden incluir *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella dermatitis* y similares. Ejemplos de micobacterias que pueden ser utilizadas pueden incluir *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae* y similares. Ejemplos de protozoos que pueden ser utilizados pueden incluir *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* y similares. Ejemplos de bacterias vegetativas que pueden ser utilizadas pueden incluir *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*, *Stenotrophomonas maltophilia* y similares. Se pueden utilizar organismos tales como *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes* y similares para determinar la eficacia de una esterilización con calor húmedo (en autoclave), siendo especialmente útil el *Geobacillus stearothermophilus*.

El organismo de ensayo puede comprender *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella dermatitis*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae)*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus radiodurans*, *Deinococcus radiodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* o una mezcla de dos o más de los mismos.

Además de los organismos de ensayo seleccionados en función de su aspecto representativos del organismo más resistente (por ejemplo, *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*), el indicador biológico puede comprender, además, agentes de bioterrorismo o guerra biológica, por ejemplo, *Bacillus anthracis* y similares. Estos organismos resistentes también pueden comprender cepas que se han vuelto resistentes a medios anteriormente eficaces de tratamiento antibiótico o desinfección química debido a modificaciones naturales o hechas por el hombre. Ejemplos del tipo anterior pueden incluir ERV (enterococos resistentes a la vancomicina), SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilina), *Mycobacterium chelonae* y similares. Tales organismos resistentes pueden ser deseables debido a que los ERV y SARM han desarrollado recientemente una resistencia a contramedidas terapéuticas (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) y *M. chelonae* ha desarrollado una resistencia a algunos modos de desinfección (por ejemplo, resistencia al glutaraldehído) y, por lo tanto, proporcionan organismos de ensayo adecuados como modelos de "caso más desfavorable".

En organismos viables tales como bacterias, se desarrolla un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de la célula. Este potencial de membrana desempeña un papel vital en fuerzas protón-motrices en organismos requeridas para actividades tales como la generación de adenosintrifosfato (ATP), quimiotaxis, transporte de glucosa, y la supervivencia del organismo a pH bajo. El establecimiento de un potencial de membrana permite que la célula intercambie material/información con su entorno. Por lo tanto, al medir el potencial de membrana, el procedimiento inventivo proporciona una lectura instantánea o rápida acerca de la viabilidad de la célula.

El potencial de membrana en organismos viables activamente metabolizantes puede ser alto y las células con un potencial elevado de membrana son denominadas, a menudo, energizadas o hiperpolarizadas. Los organismos no viables y los organismos latentes pueden exhibir un potencial bajo o nulo de membrana y son denominados, a menudo, desenergizados o despolarizados.

El procedimiento inventivo puede depender de cambios en el potencial de membrana que se producen tras la germinación y el crecimiento del organismo de ensayo como un medio de detección de la viabilidad del organismo

de ensayo. Cuando se coloca un organismo viable en condiciones que favorecen la germinación y el crecimiento, el potencial de membrana del organismo puede cambiar. Por otra parte, si el organismo no es viable sería incapaz de germinar y no habría ningún cambio en su potencial de membrana.

5 El indicador biológico puede comprender un indicador biológico modificado genéticamente que puede comprender, además, un gen informador adecuado para aumentar el potencial de membrana incorporado por un organismo de ensayo (por ejemplo, un microorganismo bacteriano) que utiliza un vehículo adecuado (por ejemplo, plásmido o virus). La expresión del gen informador puede ser bloqueada activamente por un gen represor. La expresión del gen informador puede permanecer bloqueada hasta que se expone el gen represor a un inductor que puede estar presente en un medio de recuperación. El organismo de ensayo para ser utilizado en un indicador biológico modificado genéticamente puede comprender cualquiera de los organismos de ensayo descritos anteriormente. En una realización, el organismo de ensayo no será expuesto al inductor hasta después de que se haya completado el proceso de esterilización y, por consiguiente, la enzima indicadora no existirá antes de la esterilización ni durante la misma. Lo que puede exponerse al proceso de esterilización son los mecanismos diversos y vitales que el organismo de ensayo utiliza para sobrevivir y crecer y que también son utilizados para la producción de la enzima indicadora. Estos pueden incluir las ADN-polimerasas utilizadas para un crecimiento celular (y la replicación del plásmido), ARN-polimerasas para la transcripción de los requerimientos metabólicos de los organismos de ensayo (y el gen informador portado por un plásmido o un virus) y los polisomas ribosomales requeridos para la traducción de proteínas celulares (al igual que la expresión de la enzima indicadora y/o mecanismos de transporte de iones).

20 Existen dos clases principales de colorantes fluorescentes de potencial de membrana, diferenciándose cada clase en su procedimiento de unión a la célula. La primera clase de colorantes de potencial de membrana, carbocianinas, puede acumularse en membranas hiperpolarizadas y puede ser translocada al interior de la bicapa lipídica. Una carbocianina útil es yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina [DiOC6(3)]. La segunda clase de colorantes de potencial de membrana que puede ser utilizada comprende los oxonoles. Los colorantes de oxonol pueden entrar en células despolarizadas y unirse a proteínas o membranas intracelulares. Un colorante de oxonol útil es ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol [DiBAC4(3)]. Con colorantes de carbocianina la fluorescencia puede aumentar con el tiempo y el potencial de membrana, mientras que con los colorantes de oxonol, la fluorescencia puede reducir con el tiempo y el menor potencial de membrana. Entonces, se puede asociar directamente la presencia o ausencia de un potencial de membrana con fluorescencia con el tiempo.

30 El medio de incubación puede ser denominado un medio de crecimiento o un medio de recuperación. El medio de incubación puede tener la forma de un sólido o un líquido. El medio de incubación puede comprender una disolución acuosa tamponada particular, de forma que el indicador biológico puede ser más sensible a cambios de pH, potenciales redox, actividad enzimática y similares.

35 El indicador de esterilización puede ser utilizado en cualquier procedimiento en el que el indicador de esterilización sea expuesto a un medio de esterilización durante un proceso de esterilización y luego a recuperación e inducción. El medio de incubación puede comprender una o más fuentes nutrientes. La fuente nutriente puede ser utilizada para proporcionar energía para el crecimiento de cualquiera de los organismos de ensayo que pueden sobrevivir el proceso de esterilización. Ejemplos de las fuentes nutrientes pueden incluir digesto pancreático de caseína, digesto enzimático de harina de soja, sacarosa, dextrosa, extracto de levadura, L-cistina y mezclas de dos o más de los mismos. Un indicador de crecimiento microbiano, que cambia de color o estado nativo, en presencia de organismos viables de ensayo que pueden ser utilizados con el medio de incubación.

40 El medio de incubación (recuperación/inducción) puede contener, por ejemplo, un colorante de potencial de membrana o colorante sensible a la tensión. El uso de estos indicadores de crecimiento microbiano puede tener como resultado un cambio en la fluorescencia en respuesta a un fenómeno de crecimiento de microorganismos, tales como el cambio de pH, en potenciales de oxidorreducción, en la actividad enzimática, al igual que otras indicaciones de crecimiento.

45 El medio de incubación puede comprender, además, uno o más tampones de pH, uno o más neutralizadores, uno o más agentes para mantener el equilibrio osmótico o una mezcla de dos o más de los mismos. Los tampones de pH pueden incluir K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitrolotrietanol (bis tris), 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilaminopropano (bis-tris propano), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-etanosulfónico (HEPES), 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Trizma, Tris base), N-[tris(hidroximetil)metil]glicina (Tricina), diglicina (Gly-Gly), N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), ácido N-(2-15 acetamido)iminodiacético (ADA), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (aces), ácido 1,4-piperazinadiaetanosulfónico (PIPES), ácido 3-hidroxi-4-morfolino-propanosulfónico (MOPSO), ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]etanosulfónico (TES), ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxi-1-propanosulfónico (DIPSO), ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico (MOBS), ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico (TAPSO), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-(2-hidroxi)propanosulfónico hidratado (NEPPSO), ácido piperazina-1,4-bis(2-hidroxi)propanosulfónico dihidratado (POPPO), ácido 4-(2-25 hidroxietil)-1-piperazina propanosulfónico (EPPS), ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(4-butanosulfónico) (HERBS), ácido [(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]-1-propanosulfónico (TAPS), 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD), ácido N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanosulfónico (TABS), ácido N-(1,1-dimetil-2-

hidroxietil)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico (AMPSO), ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES), ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxil-1-propanosulfónico (CAPSO), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico (CAPS), ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico (CABS), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico hidratado (MES), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), y mezclas de dos o más de los mismos.

Los neutralizadores pueden incluir, sin limitación, tioglicolato de sodio, tiosulfato de sodio, catalasa, bisulfato de sodio, lecitina bisulfato de sodio, polisorbato 20, polisorbato 80, bicarbonato cálcico y mezclas de dos o más de los mismos.

Los agentes para mantener un equilibrio osmótico pueden incluir sal de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de manganeso, sales de calcio, otros, por ejemplo, sales de metales de transición, cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato de magnesio, cloruro de hierro y mezclas de dos o más de los mismos.

En una realización, el medio de incubación comprende una composición acuosa que comprende: agua; desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 100 gramos por litro de agua (g/l) y en una realización desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 50 g/l, de una o más fuentes nutrientes; desde aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$ hasta aproximadamente 10 g/l, y en una realización desde aproximadamente $1,3 \times 10^{-4}$ hasta aproximadamente 1,0 g/l de uno o más indicadores de crecimiento microbiano; hasta aproximadamente 5000 g/l, y en una realización desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 5000 g/l, y en una realización desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1000 g/l, de uno o más tampones de pH; hasta aproximadamente 100 g/l, y en una realización desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 100 g/l, y en una realización desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 50 g/l, de uno o más neutralizadores; hasta aproximadamente 50 g/l, y en una realización desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 50 g/l, y en una realización desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 25 g/l, de uno o más agentes para mantener un equilibrio osmótico.

El medio de incubación puede comprender un caldo nutriente, caldo neutralizante D/E, medio mínimo de Davies, caldo en ensayo de esterilidad, al igual que cualquier medio de digesto de soja-caseína o a base de extracto de ternera. Estos pueden incluir una disolución acuosa de caldo de digesto de soja-caseína, fluido de tioglicolato y dextrosa triptona (Difco Laboratories, Inc.). Se puede utilizar una base de caldo tríplico de soja modificado, sin glucosa. También se puede añadir un colorante de potencial de membrana o colorante sensible a la tensión.

Un ejemplo de un medio de incubación que puede ser utilizado es Bacto™ Tryptic Soy Broth que contiene digesto pancreático de caseína (17,0 g/l), digesto enzimático de harina de soja (3,0 g/l), cloruro de sodio (5,0 g/l), fosfato dipotásico (2,5 g/l) y dextrosa (2,5 g/l). Estos ingredientes pueden ser dispersados o disueltos en agua. Las concentraciones expresadas en términos de g/l hacen referencia a gramos de ingrediente por litro de agua. El digesto pancreático de caseína, el digesto enzimático de harina de soja, y dextrosa proporcionan fuentes de energía para el crecimiento del microorganismo. Estos pueden ser denominados fuentes nutrientes. Se puede utilizar cloruro de sodio para mantener un equilibrio osmótico en el medio líquido. El fosfato dipotásico puede accionar como un tampón de pH. Se puede añadir DiOC₆(3), por ejemplo, que es un colorante de potencial de membrana (3 µg/l) a la formulación Bacto™ Tryptic Soy Broth.

El medio de incubación puede comprender una formulación muy básica que puede servir únicamente para potenciar eventos de flujo iónico y/o para iniciar la germinación de esporas. Este medio puede comprender aminoácidos, sales y/o azúcares. Ejemplos de aminoácidos incluyen L-alanina, L-leucina, L-cisteína, L-valina, L-lactato, L-treonina, ácido L-tartárico, ácido fólico, L-tirosina, L-prolina y asparagina. Ejemplos de sales son cloruro de sodio y cloruro de potasio. Ejemplos de azúcares incluyen glucosa, sacarosa, fructosa y xilosa. Los componentes encontrados en el sobrenadante de organismos en crecimiento, tales como peptidoglucano y murepéptidos pueden desencadenar eventos de flujo iónico o eventos de germinación adicionales.

Los colorantes de potencial de membrana son fluorescentes y, por lo tanto, el procedimiento de detección de elección debe tener la capacidad para distinguir entre la fluorescencia de las moléculas de colorante que están acotadas dentro de la membrana en contraposición con la fluorescencia de las moléculas de colorante libres. Dos procedimientos particularmente adecuados para distinguir entre las emisiones de fluorescencia procedente de estas dos fuentes son las técnicas de polarización de fluorescencia (también conocida como anisotropía de fluorescencia) y la basada en una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (basada en FRET), incluyendo la FRET resuelta por tiempo.

La polarización de fluorescencia es un procedimiento de detección que depende de cambios en el tamaño aparente de una molécula fluorescente para su detección. Las mediciones de polarización pueden estar basadas en el principio de excitación selectiva de fluoróforos por medio de luz polarizada. Los fluoróforos tienen momentos de transición para la absorción y emisión que se encuentran en orientaciones específicas con respecto a los ejes moleculares del fluoróforo y que absorberán, preferentemente, fotones cuyos vectores eléctricos estén alineados en paralelo con estos momentos de transición. En una disolución isotrópica, los fluoróforos pueden estar orientados aleatoriamente. Tras una excitación con luz polarizada, aquellas moléculas de fluoróforo cuyo dipolo de transición de absorción es paralelo al vector eléctrico de la excitación pueden ser excitadas preferentemente. Esta excitación

selectiva puede tener como resultado una población de fluoróforos parcialmente orientada y tiene como resultado, además, una emisión de fluorescencia polarizada parcialmente. La emisión también se produce con la luz polarizada a lo largo de un eje fijo en el fluoróforo. La polarización de fluorescencia puede excitar las moléculas con luz polarizada en un plano. Entonces, se puede medir la luz emitida tanto en la posición inicial polarizada en un plano como en una posición desplazada con respecto a la luz polarizada en un plano, normalmente desplazada 90°. Por ejemplo, si el vector eléctrico de la luz de excitación está polarizado en un plano vertical, entonces se puede medir la luz emitida tanto en las posiciones vertical como horizontal. Los fluoróforos que están "alineados" con el vector eléctrico de la luz de excitación absorberán preferentemente la luz. Entonces, se puede medir la luz emitida tanto en la posición polarizada horizontalmente como en la posición polarizada verticalmente. La polarización puede ser expresada como una relación de las intensidades de luz y es una medida del grado de rotación molecular durante el periodo entre la excitación y la emisión. Las moléculas pequeñas pueden girar más rápido y tendrían un menor valor intrínseco de polarización que las moléculas más grandes. Por otra parte, las moléculas más grandes pueden girar menos y, por lo tanto, tienen un mayor valor intrínseco de polarización. Utilizando una polarización de fluorescencia, puede ser posible distinguir entre colorantes de potencial de membrana acotados y colorantes de potencial de membrana no acotados.

Una incubadora/lectora basada en la polarización de fluorescencia puede estar diseñada como se muestra en la Fig. 2. La Fig. 2 es una ilustración esquemática de un polarizador de fluorescencia. Con referencia a la Fig. 2, la incubadora/lectora 100, que permite el ensayo de la muestra 110, incluye una fuente 120 de luz monocromática, un divisor 130 de haz y polarizadores 140, 150 y 160. La luz monocromática procedente de la fuente 120 de luz monocromática pasa a través del polarizador 140, de forma que se polariza toda la luz de excitación. Entonces, esta luz polarizada excita, preferentemente, únicamente las moléculas en la muestra 110 que se encuentran en el mismo estado de polarización que el filtro. Según giran estas moléculas, salen de la posición polarizada en un plano. La luz emitida es dividida por el divisor 130 de haz. El divisor de haz divide la luz y pasa aproximadamente la mitad de la luz a través del polarizador 150 orientado en el mismo plano que la luz de excitación y la otra mitad a través del polarizador 160 orientado con un ángulo con respecto a la luz de excitación inicial. Se mide y se compara la luz que pasa a través de cada polarizador 150 y 160.

La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es la transferencia de energía de un fluoróforo donante excitado inicialmente a un fluoróforo receptor. Normalmente, el fluoróforo donante emite con una longitud de onda menor que se solapa con el espectro de absorción del receptor. Se produce una transferencia de energía de resonancia sin la aparición de un fotón y es el resultado de interacciones a larga distancia entre dipolos entre los fluoróforos donante y receptor.

Para monitorizar los cambios en el potencial de membrana con FRET, se requieren dos fluoróforos. El donante de FRET podría ser cualquier fluoróforo que proporcione un espectro suficiente de absorción para el receptor. El fluoróforo receptor sería el colorante de potencial de membrana. Preferentemente, el fluoróforo donante se fijaría o adheriría a la pared de esporas, permitiendo una proximidad estrecha con el colorante de potencial de membrana. De lo contrario, se monitorizaría la opción de detección de fluorescencia (FRET) mediante el mismo tipo de fluorímetro descrito en otro lugar del presente documento y en los ejemplos proporcionados.

Además de los colorantes de potencial de membrana, los colorantes de detección de tensión o sensibles a la tensión pueden detectar los mismos cambios en el potencial de membrana de organismos que utilizan otro conjunto más de principios. El uso de colorantes sensibles a la tensión para la detección de un potencial de membrana está basado en el mecanismo físico conocido como electrocromismo. Tanto el espectro de excitación como el de emisión de estos colorantes exhiben cambios significativos debidos a cambios de tensión. Estos cambios en los espectros surgen de las redistribuciones de carga que reflejan los cambios de potencial de membrana. La clase utilizada más habitualmente de colorantes sensibles a la tensión son los colorantes de estirilo, ejemplos específicos incluyen di-8-butil-amino-naftil-etileno-piridinio-propil-sulfonato (di-8-ANEPPS) y di-4-butil-amino-naftil-etileno-piridinio-propilsulfonato (di-4-ANEPPS).

El uso de colorantes sensibles a la tensión en combinación con una técnica de tipo FRET permite la detección sencilla de cambios en el potencial de membrana. Por ejemplo, según se producen redistribuciones de carga en la membrana de organismos germinantes tales como esporas, la longitud de onda de emisión de los colorantes sensibles a la tensión comenzará a desplazarse. Este desplazamiento en la longitud de onda de emisión puede ser detectado, entonces, por medio de un segundo fluoróforo ubicado en el medio de cultivo. La emisión desde esta segunda longitud de onda puede ser detectada por medio del detector. Por ejemplo, el pico en los espectros de excitación para di-8-ANEPPS se desplaza entre 450 nm y 520 nm dependiendo de las características de tensión/carga. Esto tiene como resultado un correspondiente desplazamiento máximo en los espectros de emisión desde 530 nm hasta 640 nm. El fluorímetro/incubadora puede estar diseñado para excitar di-8-ANEPPS bien a 450 nm o bien a 520 nm y luego detectar un segundo fluoróforo que tiene un pico de excitación en el pico de emisión correspondiente del di-8-ANEPPS.

Un procedimiento alternativo de detección para la detección de cambios en el potencial de membrana es el uso de señales electrónicas. Según comienzan a germinar organismos tales como esporas, el potencial de membrana aumentará permitiendo más flujo de corriente y mayores caídas de tensión que tienen como resultado un aumento

en el transporte de iones, que es observado como un aumento en el flujo de corriente, por el mayor potencial de membrana. Se pueden colocar conductores electrónicos en el medio o a través/dentro de un sustrato indicador biológico para medir eléctricamente el potencial de membrana. A continuación se muestran en las **Figuras 3-5** tres diseños potenciales para indicadores biológicos que miden señales eléctricas. Con referencia a la **Fig. 3**, se coloca un indicador biológico 200 en el medio 202 que está contenido en un recipiente 204. Se colocan conductores electrónicos 206 y 208 en el medio 202 y son utilizados para medir el potencial de membrana. Con referencia a la **Fig. 4**, se utilizan conductores electrónicos 210 y 212 para medir el potencial de membrana a través de un indicador biológico 214. Con referencia a la **Fig. 5**, se utilizan conductores electrónicos 220 y 222 para medir el potencial de membrana dentro de un indicador biológico 224.

El indicador de esterilización puede comprender un material conductor eléctricamente colocado sobre un sustrato (por ejemplo, un material conductor eléctricamente tal como una circuitería de cobre formada sobre un sustrato no conductor tal como silicio) y un indicador biológico (por ejemplo, esporas) colocado en parte del material conductor, o en todo él. Por ejemplo, se pueden depositar el indicador biológico (por ejemplo, esporas) y una circuitería electrónica o un patrón digital conductor que comprende un material conductor (por ejemplo, cobre) sobre un sustrato no conductor (por ejemplo, un sustrato de silicio) utilizando una impresora de chorro de tinta tal como una impresora Dimatrix Materials DMP-2800 que está disponible en Fuji Film. Se puede depositar la circuitería electrónica o el patrón digital conductor sobre el sustrato utilizando cualquier patrón deseado. Entonces, se puede depositar el indicador biológico sobre parte de la circuitería electrónica o del patrón digital conductor, o sobre toda ella, utilizando la impresora de chorro de tinta. El indicador biológico puede ser dispersado en un vehículo o medio líquido (por ejemplo, agua) que puede ser depositado, entonces, sobre parte de la circuitería electrónica o del patrón digital, o sobre toda ella, con gotitas de solo aproximadamente 5 picolitros, o aproximadamente 10 picolitros. Los volúmenes típicos de esporas pueden ser de aproximadamente 3 picolitros por espora.

El indicador biológico puede ser evaluado eléctricamente monitorizando la tensión (potencial), el flujo de corriente, la resistencia y/o la impedancia según comienzan a germinar las esporas viables. La elección del procedimiento de medición dictará el diseño de la electrónica. Una ventaja incluye una reducción en el tiempo requerido para leer el indicador biológico. Dado que el procedimiento de detección depende de una de las etapas más tempranas en la cascada de eventos de germinación de esporas en vez de en una excrecencia de enzimas informadoras específicas, se puede reducir mucho el tiempo de detección.

La **Fig. 6** es una representación esquemática del elemento inferior 600 de una versión electrónica de un indicador de esterilización según una realización de la presente invención, tal como la mostrada en las **Figuras 4 y 5**. La **Fig. 6** muestra los elementos del elemento inferior 600 del indicador de esterilización con más detalle. El elemento inferior 600 incluye un material conductor eléctricamente 602, tal como una monocapa de poliacrilamida/polianilina, colocada sobre un sustrato no conductor 604. El material conductor eléctricamente 602 puede incluir cualquier material adecuado siempre que el material sea adecuado para ser utilizado con las condiciones de esterilización con las que se utilizará el indicador de esterilización. El sustrato no conductor 604 puede ser cualquier material adecuado de sustrato impermeable a gases/líquidos tal como PET u otro material adecuado que sea adecuado para ser utilizado en las condiciones de esterilización en las que se utilizará el indicador de esterilización. Como se muestra en la **Fig. 6**, hay un sustrato conductor 606 colocado entre el material conductor 602 y la capa 604, que se encuentra en comunicación eléctrica con el material conductor 602 y con circuitería de detección. La circuitería de detección incluye una serie de preamplificadores 608 de transistores en serie, que están conectados eléctricamente a conectores eléctricos 610 y al conector 611 a tierra. Los conectores eléctricos 610 proporcionan una comunicación eléctrica desde el elemento inferior 600 hasta un dispositivo lector, descrito a continuación. Los preamplificadores 608 proporcionan una amplificación progresiva de cambios en la corriente eléctrica que pasa a través del indicador de esterilización, como se describe con más detalle a continuación. Al tener una serie de amplificadores, se puede amplificar de forma adecuada una señal procedente de la tarjeta indicadora biológica sin la introducción de excesivo ruido. El circuito se completa con el conector 611 a tierra.

Como se muestra en la **Fig. 6**, se pueden depositar esporas 612 de un organismo de ensayo adecuado sobre una monocapa conductora 602, o embebidas en la misma. Las esporas 612 pueden ser depositadas como esporas individuales o como múltiples esporas. Las esporas 612 pueden ser depositadas, por ejemplo, en una mezcla de poliacrilamida/tampón, en cuyo caso se considera que la espora se encuentra dentro de una "burbuja" del material tampón, "burbuja" que está embebida en una matriz tal como poliacrilamida. De forma alternativa, las esporas 612 pueden ser embebidas directamente en una capa, por ejemplo, de polianilina.

Con referencia ahora a la **Fig. 7**, que es una vista en planta desde arriba de un elemento superior 614 para el indicador de esterilización, se muestran detalles adicionales de esta realización de la invención. El lado del elemento superior 614 mostrado en la **Fig. 7** es el lado que estará orientado hacia la capa superior, y hará contacto con la misma, de la estructura mostrada en la **Fig. 6**. El elemento superior 614 incluye una membrana separable 616 impermeable a los gases/líquidos de protección, sobre la que se forma una capa 618 permeable a los gases/vapor. Sobre la capa permeable 618 hay una capa conductora 620. Cuando se monta el indicador de esterilización, la capa conductora 620 se encontrará en comunicación eléctrica con las esporas 612 y cualquier material conductor circundante tal como la monocapa conductora 602, y también se encontrará en comunicación eléctrica con un conector 622 por medio del conductor 626. Como se muestra en la **Fig. 7**, el conector 622 está colocado por debajo

de una almohadilla aislante 624. El conector 622, por medio del cable 626, completará el circuito eléctrico formado por la capa conductora 620, las esporas 612, el sustrato conductor 606, los preamplificadores 608 y los conectores 610. Se utilizarán cambios en el flujo de corriente a través de este circuito eléctrico para detectar si ha sobrevivido o no algún organismo de ensayo al proceso de esterilización en el que se utilizará el indicador 600 de esterilización.

5 Como se muestra en la **Fig. 7**, el elemento superior 614 incluye una línea adhesiva 628, por medio de la cual se fijará de forma estanca el elemento superior 614 al elemento inferior 600, formando, de esta manera, el indicador de esterilización de la presente realización.

10 Antes del uso del indicador de esterilización, la membrana 616 impermeable a gases/líquidos de protección permanecerá en su lugar para proteger al indicador 600 de esterilización de una exposición al medio ambiente. Justo antes de que se vaya a utilizar el indicador de esterilización en un proceso de esterilización, se retirará la membrana 616 para permitir que el medio de esterilización alcance las esporas 612 en el indicador de esterilización.

15 La **Fig. 8** es una vista esquemática en planta desde arriba de una capa estanca superior 630 para ser utilizada con una realización de la presente invención, tales como las de las Figuras 4-7. En la realización mostrada en la **Fig. 8**, el cierre estanco superior 630 incluye una cámara 632 llena de fluido que contiene un inductor estable térmicamente y un medio para activar y soportar las esporas subyacentes 612. La cámara 632 llena de fluido está conectada al resto de la capa estanca superior 630 por medio de una zona separable frangible 634, por medio de la cual se puede retirar la cámara del resto del cierre estanco superior 630. El cierre estanco superior 630 incluye, además, una ventana 636 que se comunica con la capa 618 permeable a los gases/líquidos del elemento superior 614. El cierre estanco superior 630 incluye, además, una soldadura térmica 638 y una zona adhesiva pelable 640, para fijar el cierre estanco superior 630 al elemento superior 614. La soldadura térmica 638 fija la cámara 632 al elemento superior 630.

20 La **Fig. 9** es una vista esquemática en planta desde arriba de un elemento inferior 700 de otra realización de la presente invención, que es una realización basada en fluorescencia de un indicador de esterilización. El indicador de esterilización mostrado en la **Fig. 9** depende de la fluorescencia generada por esporas en desarrollo como la indicación de éxito o de fallo del proceso de esterilización.

25 En la realización mostrada en la **Fig. 9**, el elemento inferior 700 incluye un sustrato 702 de apoyo sobre el que se depositarán los materiales o elementos suprayacentes. El sustrato 702 de apoyo puede ser cualquier material adecuado impermeable a los gases/líquidos, tal como PET (por ejemplo, Mylar®), polipropileno, metal o papel metalizado lacado o cualquier poliolefina adecuada que conocen los expertos en la técnica que es útil con un indicador de esterilización. Depositada sobre el sustrato 702 de apoyo hay una monocapa hidratante 704. La monocapa hidratante 704 puede ser, por ejemplo, poliacrilamida, y puede tener fijaciones añadidas para esporas, o las esporas pueden estar embebidas en la monocapa hidratante 704. El elemento inferior 702 estará cubierto por un cierre estanco transparente a la longitud de onda de la fluorescencia permeable a gases/vapor (no mostrado), que será adherido o soldado al elemento inferior 702. El cierre estanco transparente permitirá el acceso de medio de esterilización a las esporas del organismo de ensayo y permitirá el paso de las longitudes de onda de excitación y fluorescencia utilizadas para la lectura del indicador de esterilización.

30 En la realización ilustrada en la **Fig. 9**, las esporas se aplican en rejillas 706 de 10×10 de “puntos” de esporas. Cada punto puede contener, por ejemplo, desde aproximadamente 150 hasta aproximadamente 300 esporas. En la realización de la **Fig. 9**, hay una matriz de 8×12 de las rejillas de 10×10. Dado que cada punto contiene desde aproximadamente 150 hasta aproximadamente 300 esporas, hay 100 puntos en cada uno de los 96 elementos de la matriz, hay desde aproximadamente $1,44 \times 10^6$ hasta aproximadamente $2,88 \times 10^6$ esporas presentes en el indicador de esterilización mostrado en la **Fig. 9**.

35 La realización ilustrada en la **Fig. 9** incluye, además, una cámara 708 llena de fluido que contiene, por ejemplo, inductor y medios estables térmicamente necesarios para activar y soportar las esporas que generarán eventos fluorescentes que serán detectados. El recipiente 708 lleno de fluido está fijado al resto del elemento inferior 700 por medio de una zona separable frangible 710. Cuando se rompe la zona separable frangible 710, se proporciona el contenido del recipiente 708 a las esporas en las rejillas 706.

El elemento inferior 700 incluye, además, una línea adhesiva perimetral 712 mediante la cual se fija de forma estanca la cubierta permeable a los gases/vapor (no mostrada) al elemento inferior.

40 La **Fig. 10** es una vista frontal esquemática de un lector electrónico 1000 para ser utilizado con una versión, basada en la electrónica, de un indicador de esterilización según una realización de la presente invención, junto con vistas frontal y trasera de una tarjeta indicadora ejemplar electrónica de esterilización, tal como el de la **Fig. 6**. El lector electrónico 1000 incluye un panel frontal 1002 de visualización para representar visualmente información relevante obtenida de su lectura de la tarjeta indicadora biológica. El lector electrónico 1000 incluye, además, un panel 1004 de acceso frontal y una ranura 1006 para insertar una tarjeta indicadora biológica. La **Fig. 10** también incluye una representación de una versión electrónica ejemplar de una tarjeta indicadora biológica 1008, que incluye los componentes biológicos y electrónicos tales como los descritos anteriormente con respecto a la **Fig. 6**, incluyendo los conectores eléctricos 1010.

El lector electrónico 1000 incluye componentes electrónicos adecuados para hacer contacto con los conectores eléctricos 1010 de la tarjeta indicadora biológica 1008. El panel 1004 de acceso frontal puede incluir rodillos integrados o similares para activar un depósito de fluido y un calentador para una incubación.

5 La **Fig. 10** muestra tanto una vista frontal como una vista trasera de la tarjeta indicadora biológica electrónica ejemplar 1008. Los componentes de la vista frontal han sido descritos, en general, con respecto a la realización de la Fig. 6. El lado trasero de la tarjeta indicadora 1008 puede incluir, por ejemplo, información relevante acerca del tipo específico de indicador biológico, del medio de esterilización, de los parámetros del proceso de esterilización, del número de lote, de la fecha y del resultado del ensayo del indicador biológico. La información mostrada en la tarjeta indicadora 1008 no está limitada a estos ejemplos específicos; como se comprenderá también se puede incluir otra información que puede ser considerada importante. Como se comprenderá, la tarjeta indicadora 1008 puede incluir una banda magnética 1012 para facilitar la lectura y el almacenamiento automatizados de información relevante al proceso de esterilización, los resultados de ensayos, etc.

15 Las **Figuras 11A y 11B** son vistas frontales esquemáticas de un lector 1100 de fluorescencia para ser utilizado con una versión basada en fluorescencia de un indicador de esterilización según una realización de la presente invención, en una posición cerrada y abierta, respectivamente. La **Fig. 11A** muestra el lector 1100 de fluorescencia en la posición cerrada. El lector 1100 de fluorescencia incluye un panel frontal 1102 de visualización para representar visualmente información relevante obtenida de su lectura de la tarjeta indicadora biológica. El lector 1100 de fluorescencia incluye, además, un panel 1104 de acceso frontal, que puede abrirse, como se muestra en la **Fig. 11B**.

20 Como se muestra en la **Fig. 11B**, el panel 1104 de acceso frontal se abre hacia fuera e incluye una ranura 1106 en la que se puede insertar una tarjeta indicadora biológica basada en la fluorescencia, tal como la descrita anteriormente con respecto a la **Fig. 9**. Cuando se ha insertado una tarjeta indicadora en la ranura 1106, se cierra el panel 1104 de acceso frontal, colocando la tarjeta indicadora en una cámara lectora 1108, que contiene componentes para obtener información de la tarjeta indicadora en la ranura. Se describen componentes adecuados ejemplares de la cámara lectora 1108 con respecto a la **Fig. 12**. El panel 1104 de acceso frontal puede incluir rodillos integrados o similares para activar un depósito de fluido y un calentador para una incubación.

La **Fig. 12** es una vista esquemática en perspectiva de componentes internos de un lector 1200 de fluorescencia, tal como el de la **Fig. 11**, junto con vistas frontal y trasera de una tarjeta indicadora ejemplar de esterilización basada en fluorescencia.

30 El lector 1200 de fluorescencia incluye componentes adecuados para leer un indicador de esterilización basado en fluorescencia. En la **Fig. 12** se ilustran algunos componentes ejemplares. El lector 1200 puede incluir un dispositivo adecuado de lectura, tal como una cámara de CCD (dispositivo de transferencia de carga) enfriado y un procesador 1202 de imágenes, que incluye soporte físico y soporte lógico adecuados para procesar datos obtenidos de la cámara CCD. El lector 1200 puede incluir óptica adecuada 1204, tal como un LED de excitación y un detector de fluorescencia. El lector 1200 puede incluir componentes mecánicos adecuados 1206, tales como una placa de cámara, un control de LED y una interfaz USB. El lector 1200 puede incluir, además, un aparato adecuado 1210 para sujetar la tarjeta indicadora biológica, para alinear la tarjeta y sujetarla en la posición alineada para una excitación y lectura. El lector 1200 puede incluir, además, un puerto adecuado 1214 de escaneo de imágenes.

40 La **Fig. 12** muestra tanto una vista frontal como una vista trasera de la tarjeta indicadora biológica electrónica ejemplar 1208. Los componentes de la vista frontal han sido descritos, en general, con respecto a la realización de la **Fig. 9**. La cara trasera de la tarjeta indicadora 1208 incluye diversa información relevante al tipo específico de indicador biológico, al esterilizante, al proceso de esterilización, al número de lote, a la fecha, a las condiciones de esterilización y al resultado del ensayo de indicador biológico. La información mostrada en la tarjeta indicadora 1208 no está limitada a estos ejemplos específicos; como se comprenderá, también se puede incluir otra información que puede ser considerada importante. Como se comprenderá, la tarjeta indicadora 1208 puede incluir una banda magnética 1212 para facilitar la lectura y el almacenamiento automatizados de información relevante al proceso de esterilización, los resultados de ensayos, etc.

50 La **Fig. 13** es una vista frontal esquemática de un lector 1300 de viales para ser utilizado con un indicador biológico autocontenido FABI (SCBI), tal como el descrito y mostrado con respecto a la **Fig. 3**. El lector 1300 de viales incluye un panel frontal 1302 de visualización y un panel 1304 de acceso frontal, similar a los de las realizaciones descritas anteriormente basadas en la electrónica y basadas en la fluorescencia. El panel 1304 de acceso frontal incluye una pluralidad de pocillos 1306, en los que se pueden insertar SCBI. El panel 1304 de acceso frontal pivota hacia fuera, para permitir la inserción o la extracción de SCBI y puede ser cerrado en una cámara lectora 1308. El lector 1300 de viales puede ser utilizado con un SCBI basado en fluorescencia o con un SCBI basado en electrónica, aplicando los mismos principios básicos dados a conocer en el presente documento para leer los resultados del proceso de esterilización e indicados por medio del indicador biológico de la presente invención. La **Fig. 13** incluye un SCBI FABI 1310.

Con el procedimiento inventivo, se puede utilizar un cambio en el potencial de membrana de una espora germinante para evaluar la eficacia del proceso de esterilización. Se puede utilizar esta técnica con un indicador adecuado de

esterilización o SCBI, como se conoce en la técnica. También puede ser utilizado con una suspensión de organismos (por ejemplo, esporas) en una ampolla. También puede ser utilizado con un indicador de esterilización que comprende un material conductor eléctricamente colocado sobre un sustrato (por ejemplo, circuitería de cobre formada o depositada sobre un sustrato no conductor tal como silicio) con un indicador biológico (es decir, esporas bacterianas) colocado en parte del material conductor, o en todo él. El procedimiento inventivo es lo suficientemente flexible como para ser utilizado en todas las tecnologías de esterilización. El procedimiento inventivo puede ser utilizado para permitir indicadores biológicos de lectura instantánea o lectura casi instantánea. El indicador biológico puede ser denominado indicador biológico de acción rápida.

Ejemplos de materiales de construcción global: soportes, separadores y/o aislantes: vidrio, silicio, papeles metálicos, papel y otras formas celulósicas, poliolefina, incluyendo polipropileno, policarbonatos o mezclas, acetato de celulosa, Mylar y similares. Membranas semipermeables o permeables: glasina, membranas de diálisis de origen natural o sintético, poliolefina porosa y otros materiales plásticos. Conductores: metales, papeles metalizados, tintas conductoras, nanotubos, fullerenos y similares. Conductores/aislantes conmutables u otros materiales semiconductores como polianilina y similares. Químicas de unión (por ejemplo, SPDP y similares). Organismos: incluyendo *G. Stearothermophilus*, *B. atrophaeus* y similares. Fluoróforos y/o fluorógenos, por ejemplo, MUG y yoduro de propidio, fluoresceína, rodamina, etc., incluyendo todos los que responden a excitaciones físicas como la fotoexcitación, la inducción química y la activación electrofísica.

En una realización, el potencial de membrana plasmática es el único medio de detección. En otra realización, la detección es tanto mediante potencial de membrana como mediante fluorescencia inducida eléctricamente (por ejemplo, utilizando di-4-ANEPPS o similares). El colorante de ANEP (AminoNaftilEtenilPiridinio), di-4-ANEPPS es una sonda sensible para la detección de cambios de potencial de membrana en menos de un milisegundo. En este caso un lector sería un híbrido de un lector basado en electrónica tal como el de la Fig. 10, y de un lector basado en fluorescencia tal como el de la Fig. 12. En una realización, la fluorescencia de un compuesto fluorogénico después de una activación enzimática y de inducción puede ser el único medio de detección. En otra realización, también se puede utilizar un segundo fluoróforo acotado a la superficie (por ejemplo, rojo de Texas WGA), que proporcionaría una fluorescencia continua tanto como un control de referencia como como un medio para garantizar que todas las esporas siguen estando asociadas con la tarjeta indicadora biológica. Cada fluoróforo puede tener longitudes de onda separadas de emisión y de excitación.

Ejemplos

Los ejemplos proporcionados en el presente documento solo tienen fines ilustrativos. Se concibe que proporcionen suficiente detalle compuesto para permitir que un experto en la técnica realice y utilice la presente invención y para proporcionar ejemplos ilustrativos de dispositivos y procedimientos adecuados. La realización preferente puede comprender parte de los materiales, componentes, procedimientos o aplicaciones, o todos ellos, descritos en el presente documento; pero no están limitados solo a los presentados. Se pueden llevar a cabo sustituciones sencillas que pueden alterar la lista de componentes o la utilidad de la aplicación pero también se contemplan estos. El dispositivo de producción final puede adoptar la forma de una u otra de las realizaciones presentadas, con una o más de las opciones descritas, pero las configuraciones ejemplificadas no constituyen un abandono de cualquier otra variación o modo de acción que un experto en la técnica pudiera extender a la invención divulgada.

Ejemplo 1

La evaluación de cambios en el potencial de membrana en esporas vivas/muertas de *Bacillus atrophaeus* ilustra la correlación entre cambios de potencial de membrana y la viabilidad. Se mide el potencial de membrana utilizando DiOC6(3) y un fluorímetro PicoFluor. Se incuban las esporas tanto viables como no viables (en autoclave) en caldo tréptico de soja y DiOC6(3) a 37°C durante tiempos representativos. En los tiempos indicados de incubación, se eliminan los organismos y son lavados en Tris/EDTA (pH 7,4). Entonces, se toman mediciones de fluorescencia. Los resultados son mostrados en la FIG. 1.

Ejemplo 2

Detección eléctrica de esporas viables de *Geobacillus stearothermophilus* sobre una superficie plana

Se vierte uniformemente un material metalizado conductor sobre una lámina no conductora de Mylar aproximadamente el tamaño de una tarjeta de crédito. La lámina de mylar es impermeable tanto a los gases como a los líquidos. Se vierte una mezcla de poli(acrilamida/polianilina) encima de la capa metalizada. La mezcla de poli(acrilamida/polianilina) es permeable tanto al gas como al vapor. Se vuelven a suspender esporas de *Geobacillus stearothermophilus* en una mezcla de poli(acrilamida/polianilina) con una concentración de 10^8 cfu/ml. Esta concentración de esporas proporciona una única espora en cada gota de 10 pl (picolitro) procedente de una impresora de chorro de tinta. Se deposita la mezcla de esporas de poli(acrilamida/polianilina) sobre la película vertida de poli(acrilamida/polianilina) en un formato matricial. Se vierte un segundo material metalizado conductor sobre la matriz de esporas. Esto forma la tarjeta indicadora biológica (BI). Según germinan las esporas, la conductividad del material comenzará a incrementarse. El flujo de corriente es detectado por medio de preamplificadores de transistores en serie, tales como pares Darlington. Debido a que estos transistores Darlington están pareados,

5 permiten la amplificación de la corriente. Los transistores Darlington están conectados a conductores que monitorizan la corriente del sistema. Se adhiere una barrera a los gases, tal como mylar, a la parte superior del indicador por medio de un adhesivo pelable hasta justo antes de su uso. En el momento de su uso se retira esta barrera, de forma que vapor o gas pueda penetrar en el sistema cuando se coloca en un esterilizador. En el extremo alejado del indicador hay una pequeña cámara frangible que contiene un medio de incubación que permitirá que germinen las esporas viables. Después de un proceso de esterilización que utiliza vapor o peróxido de hidrógeno vaporoso se incuba el indicador biológico.

10 Se inserta la tarjeta BI en el lector de tarjetas/ranura de la incubadora que está integrado en un esterilizador. El lector/incubadora consiste en bloques de calentamiento para mantener la temperatura de incubación, las conexiones eléctricas en las que se conecta la tarjeta BI, un cabezal de impresión para marcar parámetros del ciclo e ID de carga en una forma legible por un usuario, rodillos para guiar a la tarjeta BI al interior de la ranura y para activar automáticamente el BI rompiendo la cámara frangible que contiene el medio de incubación y que contribuye a la dispersión del medio, un escáner de bandas magnéticas y un lector de códigos de barras para hacer un seguimiento de los resultados de la tarjeta BI back al ciclo de carga y de esterilización del dispositivo.

15 Se incuba el indicador a 55-60°C (temperatura óptima para *Geobacillus stearothermophilus*) y se monitoriza la conductancia del indicador. Se detectan pequeños cambios en la corriente que son el resultado de esporas germinantes viables en cuestión de minutos, alertando al usuario de que el proceso de esterilización puede no haber tenido éxito. Si el proceso de esterilización tuvo éxito, no habría un aumento en la corriente medida con el tiempo de incubación.

20 **Ejemplo 3**

Detección de fluorescencia de esporas viables de *Geobacillus stearothermophilus* sobre una superficie plana

25 Se vierte una capa de poliacrilamida sobre un soporte de polipropileno con un tamaño aproximadamente el tamaño de una tarjeta de crédito. La capa de poliacrilamida actúa como una monocapa hidratante. Entonces, se imprimen esporas de *Geobacillus stearothermophilus* en puntos de organismos. Los puntos son impresos en un formato matricial o de rejilla, conteniendo cada punto entre 150 – 300 esporas. En un extremo hay una cámara frangible que contiene el medio de incubación con el o los fluoróforos requeridos. A la terminación del proceso de esterilización se inserta la tarjeta BI en el lector de tarjetas/ranura de la incubadora que está integrado en un esterilizador. El lector/incubadora consiste en bloques calentadores para mantener la temperatura de incubación, fuentes de excitación LED, fotodiodos para la detección de fluorescencia, cabezal de impresión para marcar los parámetros de los ciclos e ID de carga en una forma legible por un usuario, rodillos para guiar la tarjeta BI en la ranura y para activar automáticamente el BI al romper la cámara frangible que contiene el medio de incubación y ayudar en la dispersión del medio, un escáner de bandas magnéticas y un lector de códigos de barras para hacer un seguimiento de los resultados de la tarjeta BI, devolviéndolo al ciclo de carga y de esterilización del dispositivo.

35 Se incuba el indicador a 55-60°C (temperatura óptima para *Geobacillus stearothermophilus*). Se puede emplear un dispositivo de formación de imágenes de serie, tal como LumiSens, en este lector. Esto permitirá la detección de dos o más longitudes de onda de interés. Una longitud de onda medirá las esporas tincionadas para garantizar que todos los controles se encuentran en su lugar y la segunda longitud de onda medirá el fluoróforo utilizado para detectar organismos viables. Si el proceso de esterilización tuvo éxito, todas las esporas serán no viables y el detector solo detectará el fluoróforo utilizado para tincionar los organismos. Si el proceso de esterilización no tuvo éxito, se detectarán las esporas viables mediante dos señales diferenciadas de fluorescencia.

40 **Ejemplo 4**

Lector/incubadora autónomo

45 El lector/incubadora puede ser una unidad autónoma para cualquiera de los lectores/incubadoras descritos en los Ejemplos 2 y 3. En una unidad autónoma, toda la electrónica es la misma, dado que los lectores/incubadoras están integrados en los propios esterilizadores.

Aunque se ha explicado la invención en relación con realizaciones específicas, se debe comprender que serán evidentes diversas modificaciones de las mismas para los expertos en la técnica tras la lectura de la memoria. Por lo tanto, se debe comprender que se concibe que la invención dada a conocer en el presente documento abarque tales modificaciones que puedan encontrarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de monitorización de un proceso de esterilización, que comprende:
 - (A) exponer un artículo a ser esterilizado y un indicador biológico a un medio de esterilización durante un proceso de esterilización, comprendiendo el indicador biológico una espora con una membrana plasmática; y
 - (B) medir un cambio en el potencial de membrana de una espora germinante para detectar la viabilidad de la espora.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el indicador biológico es incubado en un medio de incubación después de la etapa (A) pero antes de la etapa (B).
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el medio de esterilización comprende al menos un esterilizante líquido, preferentemente al menos un ácido peracético, al menos un peróxido o una mezcla de dos o más de los mismos, o al menos un esterilizante gaseoso, preferentemente peróxido de hidrógeno o peróxido de hidrógeno y amonio; o vapor.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el indicador biológico comprende *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaerctus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis globigii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli* o una mezcla de dos o más de los mismos; o *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella dermatitis*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus radiodurans*, *Deinococcus radiodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* o una mezcla de dos o más de los mismos.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el indicador biológico comprende un indicador biológico modificado genéticamente que comprende:
 - al menos un organismo de ensayo y al menos un gen informador adecuado para producir una enzima, siendo incorporado el gen informador por el organismo de ensayo, en el que el gen informador es incorporado, preferentemente, por el organismo de ensayo utilizando al menos un plásmido y/o al menos un virus; y
 - opcionalmente en el que el indicador biológico modificado genéticamente comprende, además, al menos un gen represor que inhibe la expresión del gen informador hasta que se expone el gen informador a al menos un inductor, en el que el gen informador y el gen represor son incorporados, preferentemente, por el organismo de ensayo utilizando al menos un plásmido y/o al menos un virus.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el organismo de ensayo comprende *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaerctus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis globigii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli* o una mezcla de dos o más de los mismos; o *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Wangiella dermatitis*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus radiodurans*, *Deinococcus radiodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* o una mezcla de dos o más de los mismos; o enterococos resistentes a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Mycobacterium chelonae*, o una mezcla de dos o más de los mismos.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se incuba el indicador biológico en un medio de incubación que comprende un colorante fluorescente de potencial de membrana, preferentemente un colorante de carbocianina o un colorante de oxonol; o se incuba el indicador biológico en presencia de un colorante de detección de la tensión, preferentemente un colorante de estirilo.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que se mide el potencial de membrana utilizando una polarización de fluorescencia o utilizando una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.
- 5 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el indicador biológico está colocado en un material conductor eléctricamente.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que durante la etapa (B) se coloca el indicador biológico en un medio y se utilizan conductores electrónicos en el medio para medir el potencial de membrana.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se mide el potencial de membrana utilizando conductores electrónicos colocados a través el indicador biológico, o en el mismo.
- 10 12. Un indicador de esterilización, que comprende: un material conductor eléctricamente colocado sobre un sustrato; y un indicador biológico colocado en parte del material conductor eléctricamente, o en todo él; en el que el indicador biológico comprende esporas.

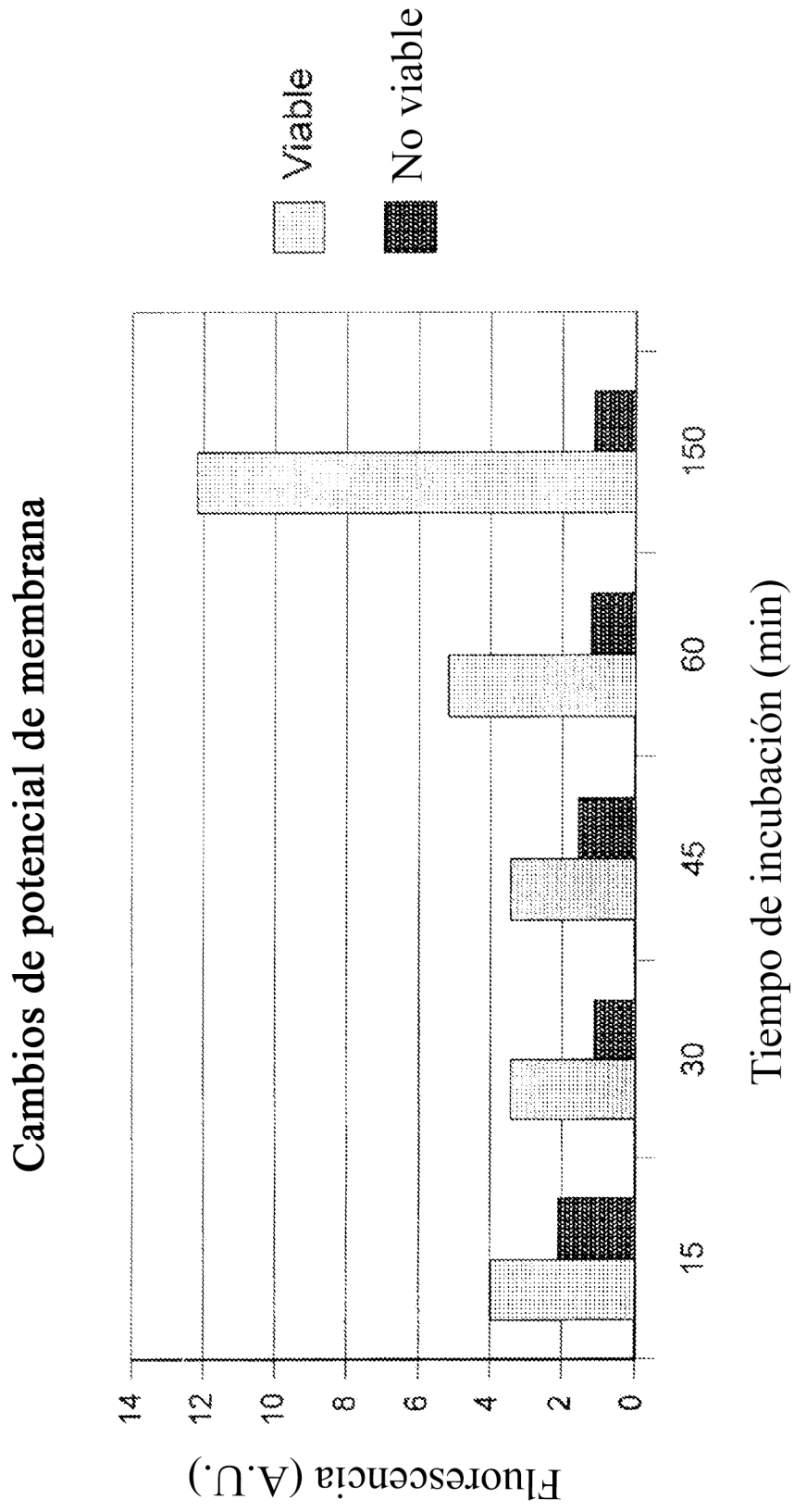


FIG. 1

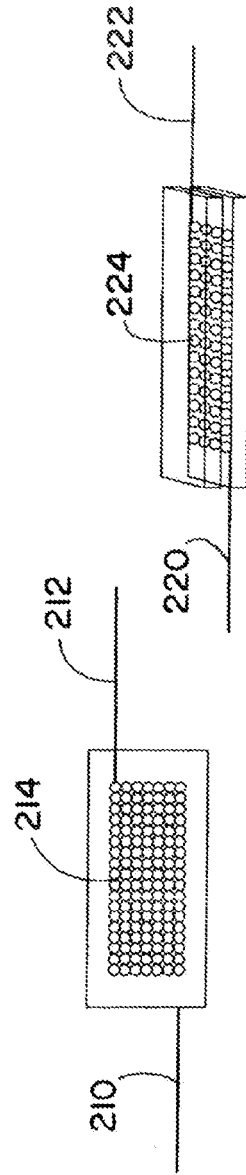
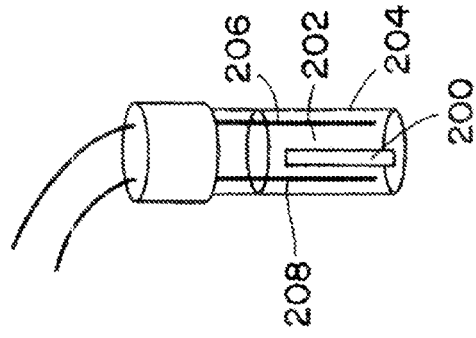
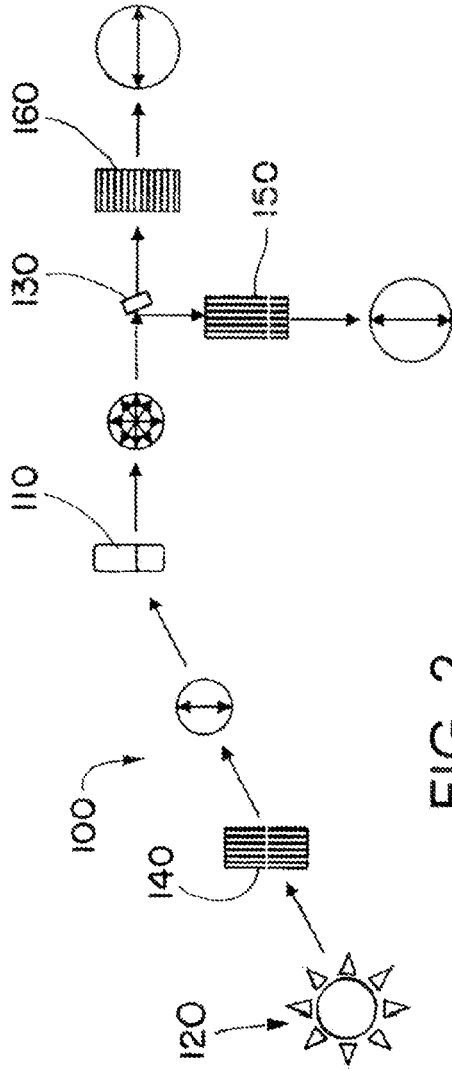


FIG. 6

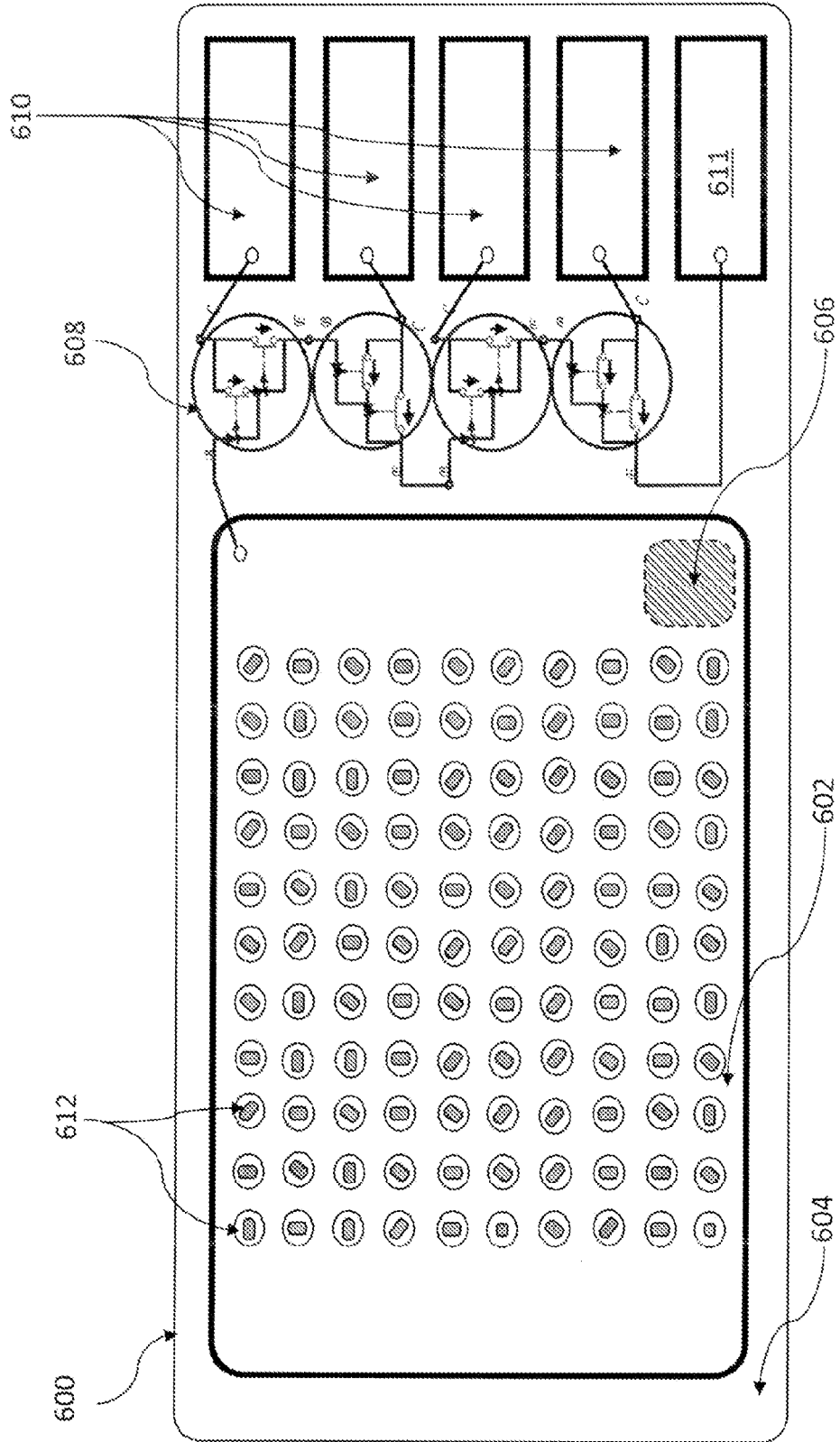


FIG. 7

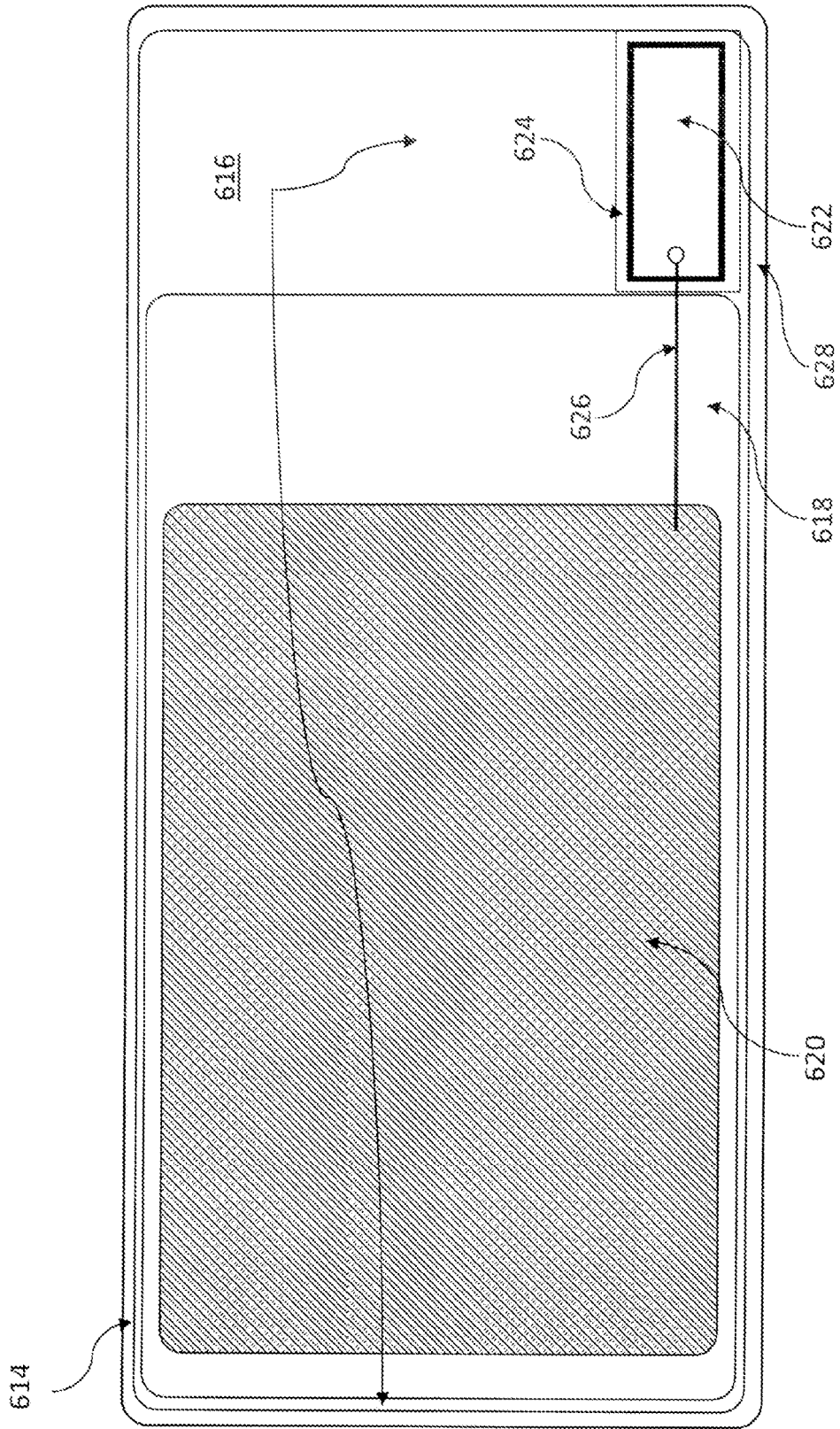


FIG. 8

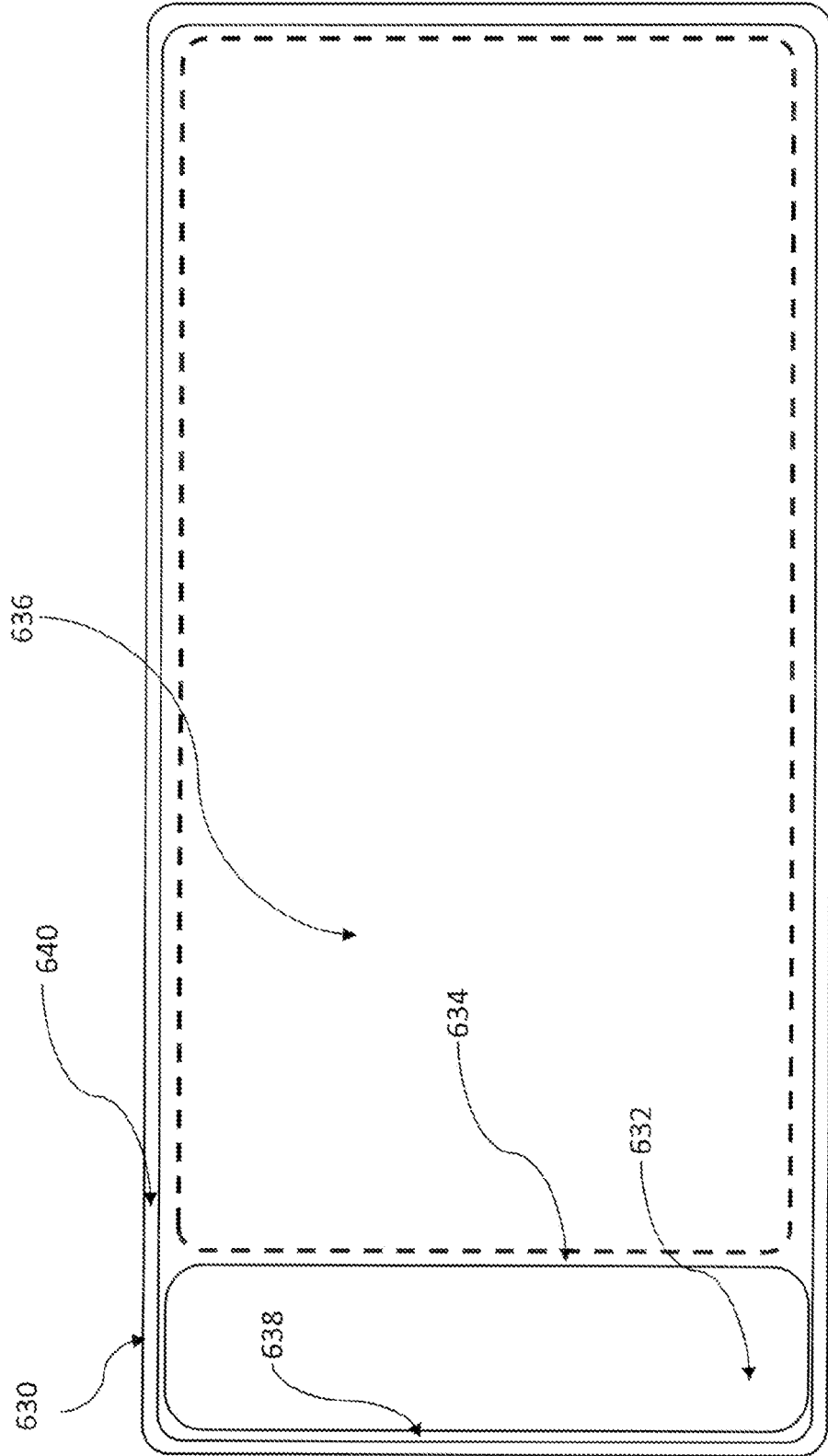
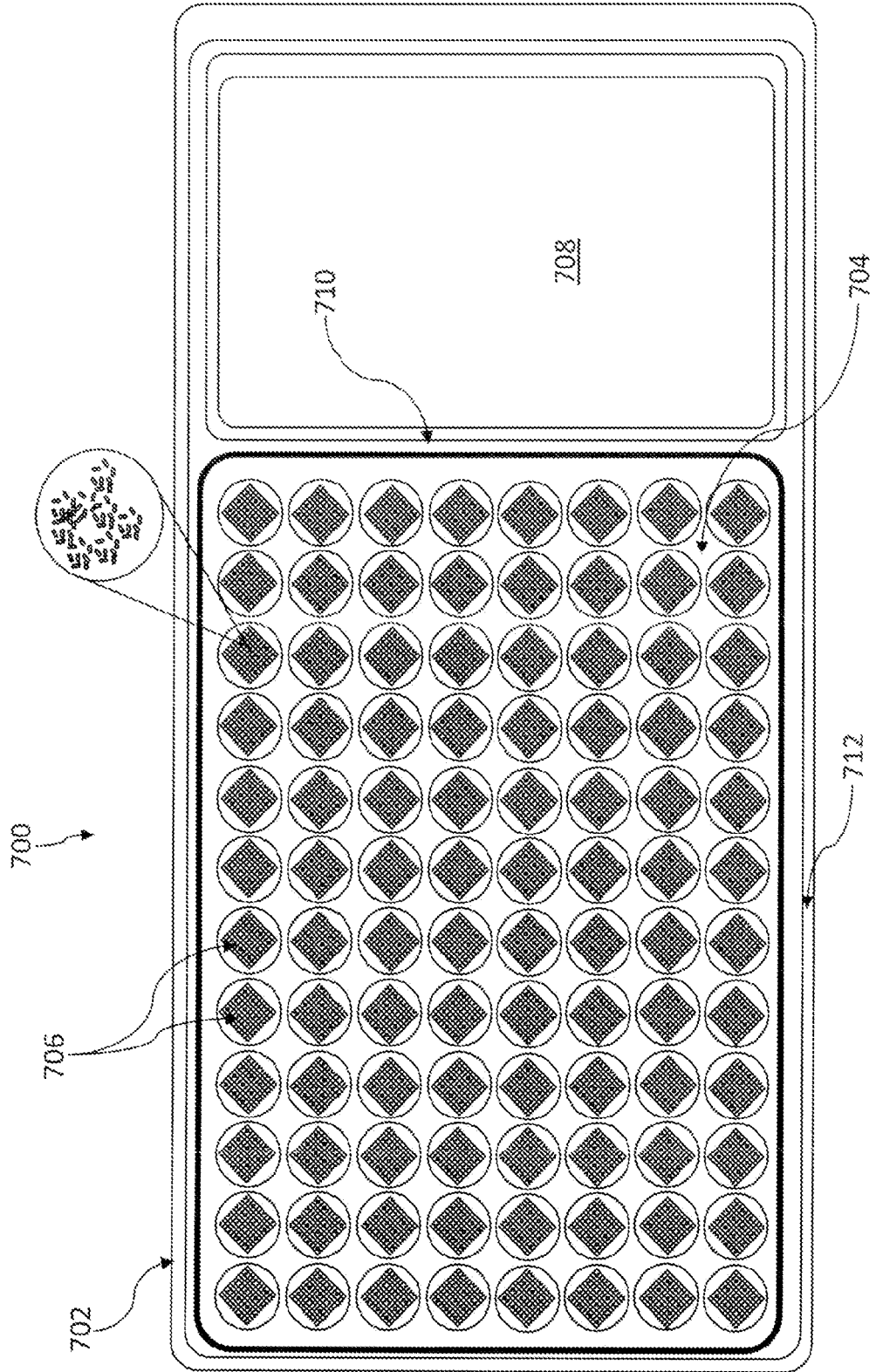


FIG. 9



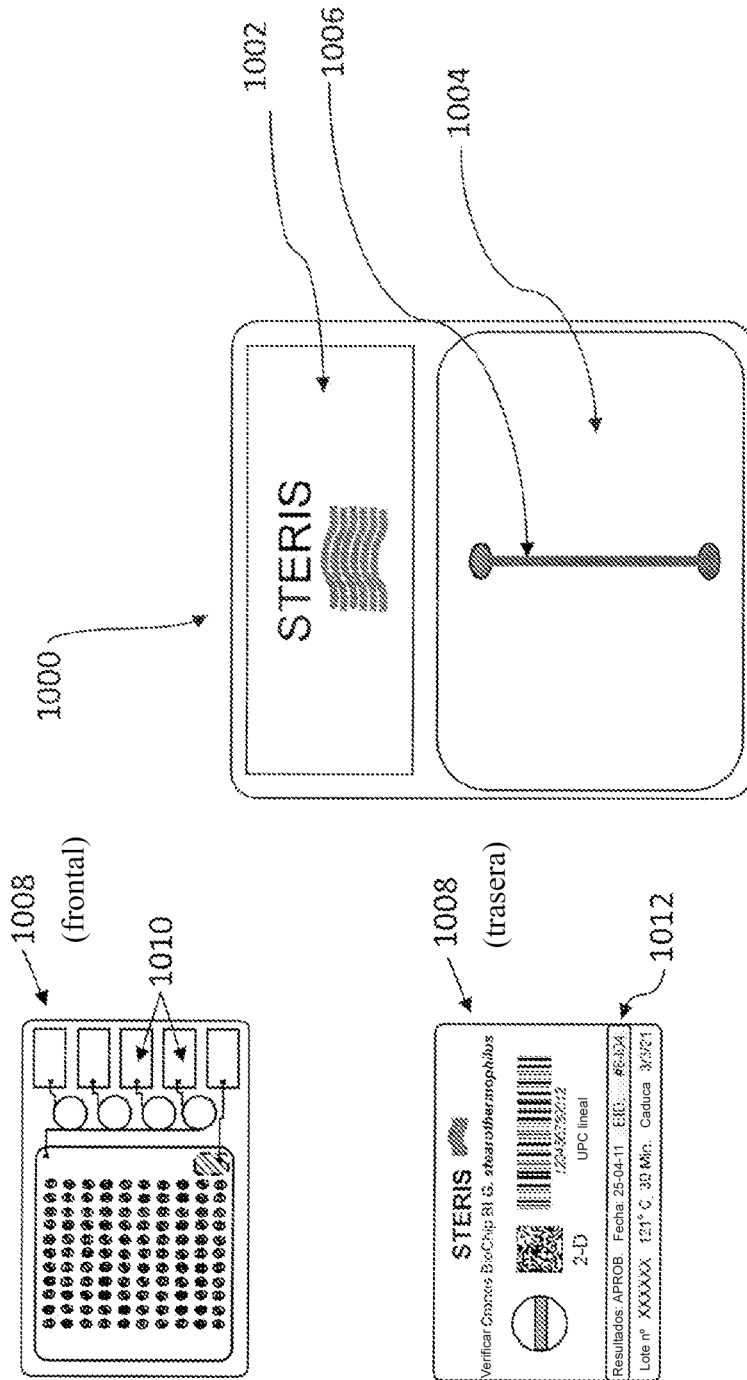


FIG. 10

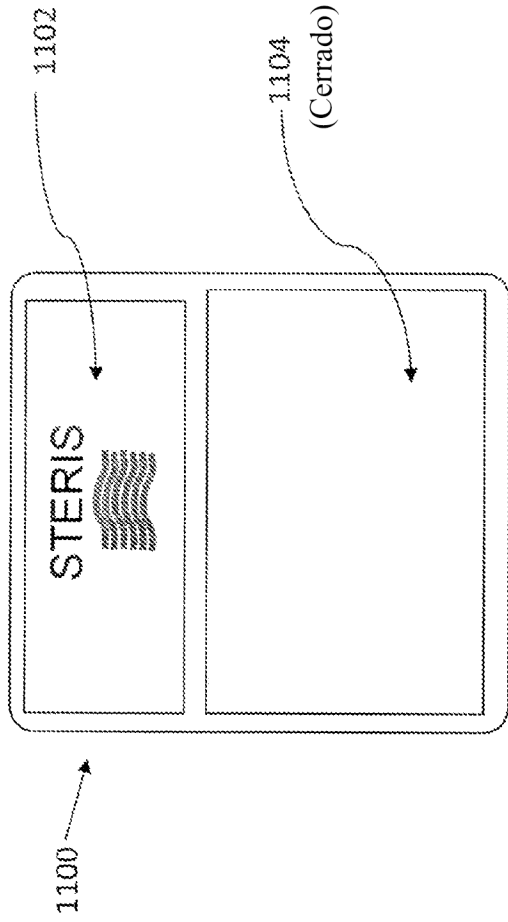


FIG. 11A

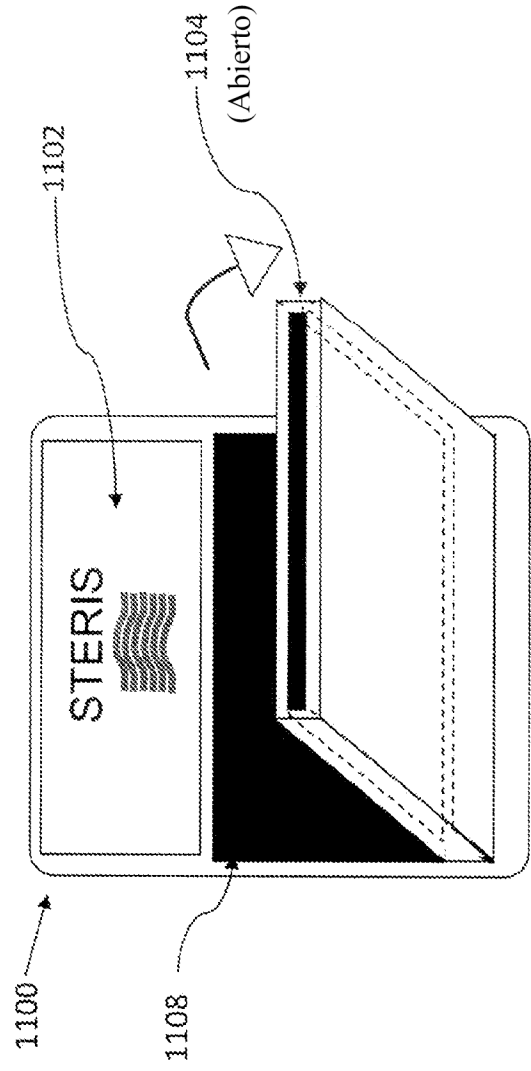


FIG. 11B

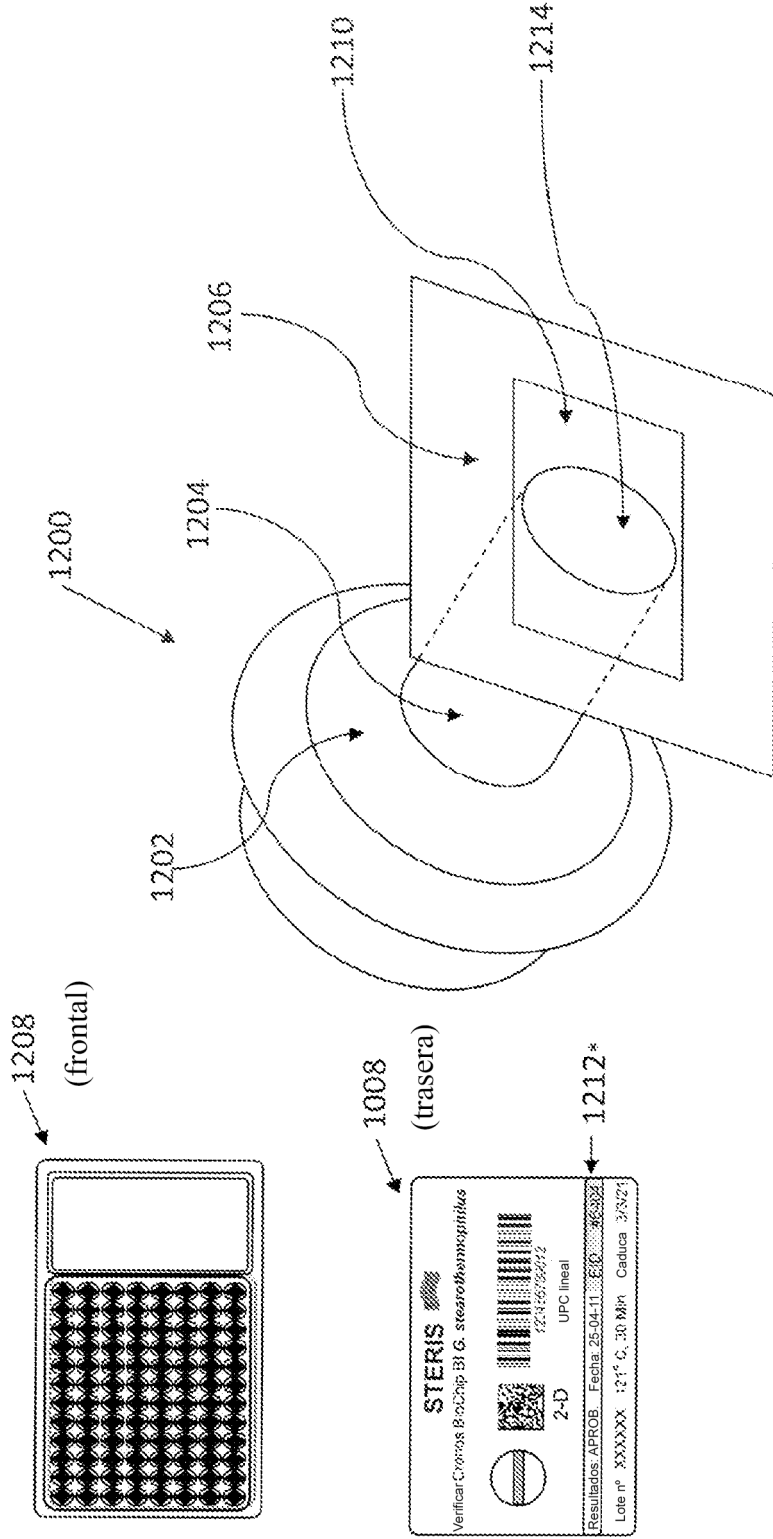


FIG. 12

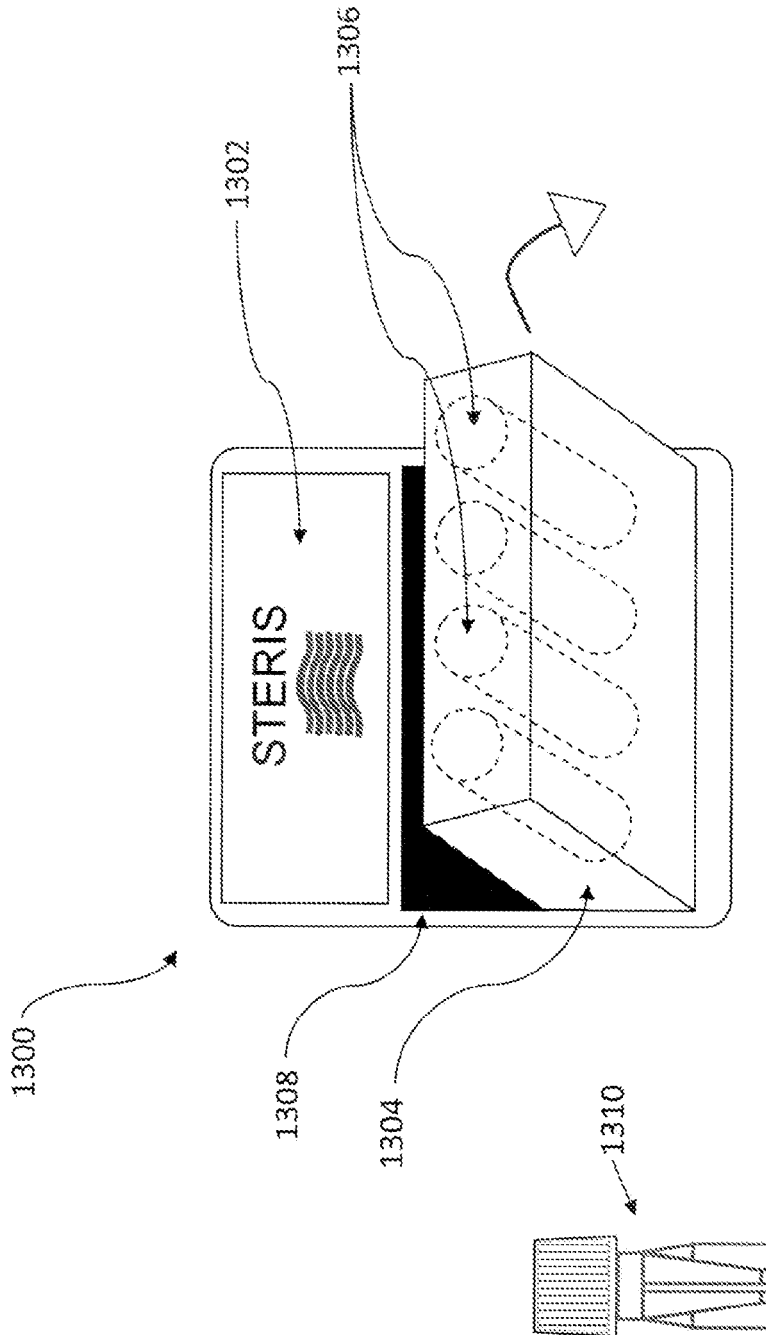


FIG. 13