

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 913**

51 Int. Cl.:

**A61L 2/28** (2006.01)

**C12M 1/28** (2006.01)

**C12Q 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2009 PCT/US2009/055822**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO2010039388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2009 E 09792208 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2341946**

54 Título: **Indicador biológico autocontenido**

30 Prioridad:

**30.09.2008 US 241473**

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

**02.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PASMORE, MARK, EDWARD;  
FRANCISKOVICH, PHILLIP, P.;  
CREGGER, TRICIA, A. y  
SOLOMON, ALAN, M.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 614 913 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 autocontenido

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a indicadores de esterilización, por ejemplo, indicadores biológicos autocontenidos, para evaluar la eficacia de un proceso de esterilización y a métodos para evaluar la eficacia de un proceso de esterilización usando tales indicadores.

Antecedentes

10 Los procesos de esterilización se utilizan para esterilizar una amplia variedad de materiales incluyendo, por ejemplo, instrumentos médicos, instrumentos quirúrgicos y similares. Los artículos que se van a esterilizar se colocan típicamente en una cámara y se someten a condiciones consideradas como suficientes para esterilizar eficazmente los artículos y hacerlos libres (o al menos a un nivel predeterminado, aceptable) de contaminantes biológicos. Hay una variedad de técnicas de esterilización mediante las cuales se puede efectuar la esterilización incluyendo esterilización con vapor, exposición a esterilizantes gaseosos (por ejemplo, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno vaporizado y similares), esterilización con plasma y similares. Independientemente de las técnicas utilizadas para esterilizar elementos, la evaluación de la eficacia del proceso de esterilización aplicado es beneficiosa para asegurar que el proceso proporciona el grado deseado de esterilización. Evaluar la efectividad de un proceso puede ser particularmente deseable al esterilizar artículos tales como instrumentos médicos y dispositivos invasivos al cuerpo humano.

20 La eficacia de los procesos de esterilización se evalúa utilizando indicadores de esterilización, que típicamente evalúan si un material de resistencia pertinaz a la esterilización sobrevive a un proceso de esterilización. Un sistema indicador biológico típico, por ejemplo, incluye una fuente de microorganismos (por ejemplo, esporas bacterianas), un medio de cultivo y un detector visible para indicar la presencia o ausencia de microorganismos viables. El sistema indicador se somete a un ciclo de esterilización, que debería ser suficiente para matar a los microorganismos. Después del ciclo de esterilización, la fuente de microorganismos se combina con el medio de cultivo y luego se incuba para estimular la proliferación de cualquier microorganismo viable restante. Durante el período de incubación, se evalúa el sistema indicador para determinar si algún microorganismo sobrevivió al proceso de esterilización. El indicador puede ser evaluado visualmente (por ejemplo, por turbiedad o un cambio de color) o con un detector (por ejemplo, por espectroscopía usando un espectrofotómetro, fluorómetro, o similar), para medir una propiedad seleccionada tal como cambio de pH, fluorescencia, cambio en absorbancia de la luz, y similares.

30 Los indicadores biológicos utilizados comercialmente emplean con frecuencia un sistema en el que el medio de cultivo se separa de los microorganismos colocando el medio de crecimiento en una ampolla de vidrio y disponiendo la ampolla dentro de un recipiente que aloja los microorganismos. Después del proceso de esterilización, el indicador biológico se activa rompiendo la ampolla, que libera el medio de crecimiento en el recipiente.

35 Los indicadores biológicos utilizados comercialmente también pueden tener períodos de incubación relativamente largos para obtener un nivel detectable de crecimiento de esporas. Por ejemplo, los indicadores biológicos comercialmente utilizados pueden requerir períodos de incubación de dieciocho horas hasta un máximo de siete días. Dependiendo de los artículos esterilizados, tales períodos largos para evaluar la eficacia de un proceso de esterilización pueden no ser siempre prácticos. En particular, los dispositivos e instrumentos médicos que han sido esterilizados no deben utilizarse mientras se evalúa la eficacia del proceso de esterilización al que fueron sometidos los dispositivos. Sin embargo, es costoso tener dispositivos médicos inactivos durante períodos prolongados mientras se determina si han sido suficientemente esterilizados.

45 Para proporcionar un indicador más rápido para evaluar la eficacia de esterilización, algunos sistemas evalúan la actividad de enzimas que se producen en microorganismos en lugar del crecimiento de microorganismos. Por ejemplo, 3M Corporation hace un indicador rápido de lectura bajo el nombre comercial ATTEST®, que utiliza una enzima que se produce de forma natural en la capa de esporas para degradar 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucósido a un producto de degradación fluorescente. La señal de fluorescencia asociada con esta enzima se puede medir en el intervalo de una a tres horas. En este indicador, se añade un sustrato no fluorescente al medio, el sustrato se degrada para producir un compuesto fluorescente, y se controla el compuesto fluorescente, en lugar de la proliferación de microorganismos, para evaluar el proceso. Estos indicadores se utilizan para evaluar los procesos de esterilización con vapor. Durante la esterilización, el calor del vapor inactiva la enzima que lleva a cabo la reacción de no fluorescente a fluorescente.

50 Otros ejemplos de indicadores biológicos que emplean enzimas cuya actividad está correlacionada con la viabilidad de esporas para dar una indicación de eficacia de esterilización incluyen los divulgados en las Patentes de Estados Unidos No. 5,073,488; 5,223,401; 5,418,167; 5,866,356 y 6,566,090.

Resumen

La presente invención proporciona un indicador de esterilización autocontenido para determinar la eficacia de un proceso de esterilización, comprendiendo el indicador de esterilización:

5 un recipiente (30) polimérico para contener una concentración de microorganismos y/o una enzima, teniendo el recipiente un extremo (33) superior, un extremo (31) inferior y una abertura en el extremo superior; y

10 una tapa (20) para sujetar un medio de crecimiento, teniendo la tapa una pared (22) exterior, un extremo (23) superior cerrado, un extremo (21) inferior, una abertura adyacente al extremo inferior de la tapa (20), y una pared (24) interior, que está separada de la pared (22) exterior, definiendo una cámara (26) interior que tiene una abertura adyacente al extremo inferior de la tapa (20), la cámara interior para contener un medio de crecimiento 50) y/o un sustrato reactivo con la enzima, comprendiendo la tapa una barrera (40) rompible que recubre y cubre la abertura (25) de la cámara (26) interior y al menos una proyección (36) dispuesta dentro del recipiente para perforar la barrera (40) rompible formada a partir de un material polimérico, una lámina metálica o una combinación de los mismos.

15 Un problema con los indicadores de esterilización que utilizan ampollas de vidrio para almacenar el medio de crecimiento es que la ampolla debe romperse para activar el indicador. La ampolla se encuentra típicamente dentro de la porción de recipiente del indicador. Cuando la ampolla se rompe, los fragmentos de la ampolla pueden obstruir el trayecto de la luz cuando el indicador está en un lector para ser analizado. Los solicitantes han encontrado que al encapsular el medio de crecimiento en la tapa con una barrera rompible formada a partir de un material polimérico y/o material de lámina, que no se desmenuza al romperse, se reduce o incluso se elimina la posibilidad de obstrucción de la trayectoria de luz en el recipiente.

20 La geometría del recipiente sirve como trayectoria de la luz. Colocando los microorganismos en el recipiente y el medio de crecimiento en la tapa, los Solicitantes también han encontrado que se puede usar una cantidad mínima de medio para concentrar los microorganismos, enzimas, material indicador y/o moléculas de sustrato, lo que aumenta la señal mientras se mantiene una longitud de trayectoria incrementada para la luz.

25 El indicador de esterilización puede estar configurado para ser activado haciendo que se abra la barrera rompible. En un aspecto, el recipiente está configurado para hacer que se abra la barrera rompible. La tapa es montable sobre el recipiente y puede montarse en el recipiente en una primera posición no activada en la que la barrera rompible no se abre y el medio de crecimiento permanece en la tapa. El recipiente puede incluir una proyección o miembro adaptado para abrir la barrera rompible y la tapa puede ser movable a una segunda posición activada en la que la proyección sobre el recipiente hace que se abra la barrera rompible y libere el medio de crecimiento dentro del recipiente.

30 En otro aspecto, la barrera rompible puede ser abierta proporcionando la barrera rompible como una configuración autorrompible. La barrera rompible puede ser autorrompible por estar formada a partir de un material polimérico que funde a una temperatura seleccionada. Adicionalmente, se puede proporcionar una barrera autorrompible tal como una película termoencogible.

35 El indicador de esterilización puede estar provisto de un miembro o miembros de soporte.

La base del indicador de esterilización puede configurarse para insertar el indicador en un soporte, lector, incubadora o similar, de modo que el indicador está diseñado para entrar o mantenerse en un soporte, lector, incubadora o similar en una posición deseada.

40 En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un método para evaluar la eficacia de la esterilización, que comprende: proporcionar un indicador de esterilización autocontenido como se describe en la reivindicación 1 y que comprende (a) un recipiente que comprende una parte superior, una parte inferior, una abertura en la parte superior, y definiendo una región interior; y (b) una tapa que tiene una cámara interior que contiene un medio de crecimiento, definiendo la cámara interna una abertura adyacente al fondo de la tapa y la cámara, comprendiendo además la tapa una barrera rompible que recubre la cámara; inocular el recipiente con microorganismos que tienen una alta resistencia a la esterilización; montar la tapa sobre el recipiente en una primera posición de manera que la barrera rompible no se rompa; someter los microorganismos a un proceso de esterilización; hacer que la barrera rompible de la tapa se rompa de manera que el medio de crecimiento fluya en la región interior del recipiente y entre en contacto con los microorganismos; incubar los microorganismos y el medio de crecimiento en condiciones suficientes para promover el crecimiento de los microorganismos; y detectar la presencia de microorganismos viables.

50 En todavía un aspecto adicional, la presente invención proporciona un sistema indicador biológico que comprende: un indicador de esterilización autocontenido como se describe en la reivindicación 1, que comprende un recipiente

5 que tiene un extremo inferior cerrado, un extremo superior y una abertura en el extremo superior; una concentración de microorganismos dispuesta dentro del recipiente; una tapa montada en el recipiente sobre el extremo superior del recipiente, teniendo la tapa un extremo superior cerrado, un extremo inferior abierto, una pared exterior, una pared interior que define una cámara interior que tiene un extremo abierto, una barrera franqueable que cubre el extremo abierto de la cámara interior; y un medio de crecimiento líquido dispuesto dentro de la cámara interior de la tapa.

Estas y otras características de la invención se describen con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos.

#### Breve descripción de los dibujos

10 En los dibujos adjuntos, las partes y las características tienen referencias similares. Una serie de los dibujos adjuntos son ilustraciones esquemáticas, y que no están necesariamente proporcionadas con precisión o dibujadas a escala.

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un ejemplo de indicador de esterilización autocontenido de acuerdo con una realización de la presente invención que muestra la tapa separada del recipiente;

15 La Figura 2 es una vista en sección transversal del indicador de la Figura 1 (tomada a lo largo de la línea 2-2) que muestra la tapa montada en el recipiente en una primera posición no activada;

La Figura 3 ilustra el indicador según se ve en la Figura 2 con la tapa montada en el recipiente en una segunda posición/activada;

La Figura 4 es una vista en sección transversal del indicador de la Figura 3 girado en 90°;

La Figura 5 es una vista en perspectiva desde abajo de la tapa desde el indicador de la Figura 1;

20 La Figura 6 es una vista en perspectiva de un ejemplo de indicador de esterilización autocontenido de acuerdo con otra realización de la presente invención que muestra la tapa separada del recipiente;

La Figura 7 es una vista en sección transversal del indicador de la Figura 6 (tomada a lo largo de la línea 7-7) que muestra la tapa montada sobre el recipiente en una primera posición no activada;

25 La Figura 8 es una vista en sección transversal del indicador de la Figura 6 (tomada a lo largo de la línea 7-7) que muestra la tapa montada sobre el recipiente en una segunda/posición activada;

La Figura 9 es una vista en sección transversal del indicador de la Figura 6 (tomada a lo largo de la línea 9-9) que muestra el indicador en una segunda posición/activada;

La Figura 10 es una vista desde arriba del indicador del recipiente de la Figura 6 con la tapa retirada y mirando hacia el recipiente; y

30 La Figura 11 ilustra la parte inferior del sistema indicador en las figuras 6-10 adaptado para encajar en un lector o soporte.

#### Descripción detallada

35 Todos los rangos y límites de relación divulgados en la especificación y en las reivindicaciones pueden combinarse de cualquier manera. Debe entenderse que, a menos que se indique específicamente lo contrario, las referencias a "un", "una" y/o "el/la" pueden incluir uno o más de uno, y esa referencia a un elemento en singular también puede incluir el elemento en el plural. Todas las combinaciones especificadas en las reivindicaciones pueden combinarse de cualquier manera.

40 El término "esterilización" se refiere a hacer que una sustancia sea incapaz de reproducción, metabolismo y/o crecimiento. Aunque a menudo se entiende esto como ausencia total de organismos vivos, el término puede usarse aquí para referirse a una sustancia libre de organismos vivos hasta un grado previamente aceptado como aceptable. A menos que se indique lo contrario, el término "esterilización" puede usarse aquí para referirse también a procedimientos menos rigurosos que la esterilización, por ejemplo, desinfección, sanitización, descontaminación, limpieza y similares. De manera similar, las variaciones del término "esterilización", tales como esterilizante, que esteriliza, limpieza, sanitización, etc., también pueden usarse en el presente documento para referirse y abarcar  
45 variantes relacionadas asociadas con procesos menos rigurosos que la esterilización (por ejemplo, desinfectante, que desinfecta, etc.).

En general, la presente invención proporciona un sistema de indicador de esterilización autocontenido adecuado para evaluar un proceso de esterilización que comprende una tapa adaptada para alojar un medio de cultivo (también denominado en este documento medio de crecimiento) y un recipiente adaptado para alojar microorganismos. La tapa incluye una cámara interior para alojar el medio de crecimiento y una barrera rompible (que también se puede denominar una barrera franqueable) que cubre la cámara interior y que encapsula el medio de crecimiento en la cámara. La tapa llena de medio se puede montar sobre el recipiente y el sistema está adaptado para romper la barrera rompible en un tiempo seleccionado de modo que el medio de crecimiento fluya dentro del recipiente que contiene los microorganismos. En una realización, el recipiente puede estar adaptado para romper la barrera rompible. En otra realización, la barrera rompible puede configurarse para romperse tras la exposición a ciertas condiciones.

Con referencia ahora a los dibujos, las figuras 1-4 muestran un sistema 10 indicador de esterilización de acuerdo con una primera realización de ejemplo de la presente invención. El sistema 10 indicador comprende una tapa 20 que se puede montar sobre un recipiente 30. El recipiente 30 incluye un extremo 31 inferior cerrado y un extremo 33 superior abierto y define un espacio 34 interior. La tapa 20 tiene una pared 22 externa, un extremo 21 inferior abierto y un extremo 23 superior cerrado. La tapa también incluye una pared (o paredes) 24 interior dispuesta en el interior de la pared exterior de la tapa y que define una cámara 26 interior. La cámara 26 interior incluye una abertura 25 adyacente al extremo inferior de la pared o paredes 24. La cámara 26 contiene un fluido 50 y la tapa 20 incluye una barrera 40 rompible dispuesta alrededor de la abertura 25 de la cámara 26 para encapsular el fluido 50 dentro de la cámara 26.

En la realización ilustrada en las figuras 1-4, el sistema indicador está configurado para que la tapa 20 se monte en el recipiente 30 en una relación de encaje a presión. Como se muestra en las figuras 2-4, el recipiente 30 incluye una proyección 32 anular que forma un reborde o labio adyacente o cercano al extremo 33 superior del recipiente. La tapa 20 incluye una proyección 29 anular que forma un reborde o labio adyacente al fondo de la tapa. La tapa 20 puede ser montada sobre el recipiente 30 deslizando el reborde 29 de la tapa sobre el reborde 32 del recipiente. El reborde 32 del recipiente 30 engancha el reborde 29 en la tapa 20 para impedir que la tapa 20 y el recipiente 30 se desacoplen. La tapa 20 y el recipiente 30 pueden estar dimensionados de tal manera que el reborde 32 ejerza una cantidad suficiente de presión contra la tapa 20 para evitar que la tapa 20 se deslice hacia abajo sin aplicar una fuerza externa hacia abajo a la tapa 20. De esta manera, la barrera 40 rompible puede mantenerse separada de los bordes 38 de los elementos 36 de punción, de modo que la barrera 40 rompible no entre en contacto y/o no sea rota por los miembros de punción hasta el momento deseado para activar el indicador.

Como se muestra en las Figs. 1-4, el recipiente 30 está adaptado para romper la barrera 40 rompible. Los recipientes incluyen proyecciones 36 (que también se pueden denominar aquí "miembros de punción") que tienen bordes 38 adaptados para romper o perforar la barrera 40 rompible cuando la barrera 40 rompible se mueve hacia abajo y entra en contacto con el borde 38 de la proyección 36. Los miembros 36 de punción se muestran como integrales con y extendiéndose desde la pared 35 lateral y la pared 37 interior inferior del recipiente.

Para evaluar un proceso de esterilización, se dispone una concentración calibrada de microorganismos dentro del interior 34 del recipiente 30. Los microorganismos pueden estar dispuestos directamente sobre las paredes 35 del recipiente o pueden proporcionarse sobre un miembro de soporte (por ejemplo, un miembro 70 de soporte) que está dispuesto dentro del recipiente 30. El indicador se ensambla entonces montando la tapa 20 llena de medio en el recipiente 30. La tapa 20 puede montarse encajando a presión la tapa 20 sobre el recipiente 30 como se ha descrito anteriormente. Con referencia a la Figura 2, la tapa 20 llena de medio está montada sobre el recipiente 30 en una primera posición no activada (o abierta) de tal manera que la barrera 40 rompible no es perforada por los miembros 36 de punción. Deseablemente, en la primera posición no activada, la barrera 40 rompible está situada alejada y no entra en contacto con los bordes 38 de los miembros 36 de punción.

Con el indicador 10 montado como se muestra en la Figura 2, el indicador puede entonces someterse a un proceso de esterilización. La tapa 20 se muestra con aberturas 28 a través de las cuales un vapor esterilizante puede entrar y fluir en el sistema indicador. El esterilizante entra en la tapa a través de las aberturas 28 (en el espacio entre la pared 22 exterior y la pared 24 interior) y fluye al interior del recipiente 30 a través de un espacio 60 definido entre la superficie exterior de la pared 24 interior sobre la tapa 20 y la superficie 35 interna de pared sobre el recipiente 30. El vapor esterilizante fluye dentro del recipiente 30 y actúa sobre los microorganismos.

Una vez completado el proceso de esterilización, se puede activar el indicador moviendo la tapa 20 hacia abajo hacia el recipiente 30 hasta una segunda posición (o cerrada o activada), que se ilustra en las figuras 3 y 4. La tapa 20 se mueve hacia abajo aplicando una fuerza o presión suficiente hacia abajo sobre la tapa 20. Cuando la tapa 20 se mueve hacia abajo, la barrera 40 rompible se pone en contacto con los bordes 38 de los miembros 36 de punción y se desplaza eventualmente hacia una posición tal que los bordes 38 de los elementos 36 de punción perforan o penetran en la barrera 40 rompible. Cuando la barrera 40 rompible es perforada, la abertura 25 de la cámara 26 queda expuesta y el medio 50 de crecimiento líquido drena hacia la región 34 interior del recipiente 30 y en contacto con los microorganismos. Puede ser deseable mover la tapa 20 hacia abajo con un movimiento de torsión para efectuar una apertura mayor o máxima de la barrera 40 rompible para asegurar el drenaje completo del medio de

crecimiento en el recipiente.

5 Como se muestra en las Figs. 3 y 4, la superficie interna de la tapa 20 incluye una segunda proyección 27 anular y la tapa puede ser desplazada hacia abajo hasta una posición tal que la parte superior de la proyección 27 se acople con la parte inferior del reborde 32 sobre el recipiente 30 y la tapa 20 se mantiene en la segunda posición cerrada/activada. La segunda posición cerrada/activada puede servir para mantener la tapa 20 en una relación sellada con el recipiente 30, lo que puede impedir que entren en el sistema microorganismos adicionales. El indicador 10 se incuba luego durante un período de tiempo suficiente para permitir la determinación de la viabilidad del microorganismo. Durante la incubación, cualquier microorganismo viable metabolizará y crecerá, y este metabolismo y crecimiento liberan subproductos en el medio de cultivo. Los subproductos pueden ser detectados por cualquier propiedad seleccionada incluyendo, por ejemplo, cambio de pH, cambio de color, opacidad, fluorescencia y similares.

15 Se apreciará que la tapa 20 no necesita incluir la segunda proyección 27 para mantener el recipiente en la posición cerrada. En una realización alternativa, el recipiente 30 puede incluir otra proyección anular o un conjunto de retenes (no mostrados) en el exterior del recipiente 30 y situado por debajo del reborde 32, proyección o retenes que pueden adaptarse para acoplarse al reborde 29 sobre la tapa para mantener el recipiente 30 en una posición cerrada. La Patente de los Estados Unidos No. 5,770,393 ilustra dicha configuración. En otra realización alternativa, la superficie interior de la tapa 20 y la superficie exterior del recipiente 30 pueden roscarse y la tapa 20 puede ser movida y mantenida en una posición cerrada atornillando la tapa 20 sobre el recipiente 30.

20 Un segundo ejemplo de realización de un sistema indicador biológico de acuerdo con la presente invención se ilustra en las figuras 6-10. Un indicador 100 de esterilización incluye una tapa 110 llena de medio y un recipiente 120. La tapa 110 llena de medio tiene una pared 112 externa, un extremo 111 inferior abierto y un extremo 113 superior cerrado. La tapa 110 incluye una cámara 116 interior definida por una pared 114 interior que está separada de la pared 112 exterior. La cámara 116 define una abertura 115 en el fondo de la pared 114 interior. La cámara 116 interior está adaptada para alojar un fluido 140 y la tapa incluye una barrera (130) rompible dispuesta alrededor de la abertura (115) para encapsular el fluido dentro de la cámara (116).

25 El recipiente 120 tiene un extremo 121 inferior cerrado, un extremo 122 superior abierto, una pared 123 y define una región 124 interior. El recipiente 120 incluye miembros 127 de punción que tienen un borde 128 adecuado para perforar y/o rasgar la barrera 130 rompible.

30 La tapa 110 y el recipiente 120 están adaptados para que la tapa 110 se monte en el recipiente 120 tanto en un encaje a presión como en un encaje de rosca. La tapa 110 incluye una proyección 117 anular adaptada para deslizar sobre las proyecciones 126 sobre el recipiente 120 para acoplar la tapa 110 con el recipiente 120. La tapa 110 también incluye una superficie roscada sobre la superficie interior de la pared 112 definida por las proyecciones 117 y los rebajes 119. La superficie roscada puede acoplarse a las proyecciones 126 (que pueden servir como proyecciones roscadas) sobre el recipiente 120 en una relación de rosca a tornillo y la tapa 110 puede ser movida a una posición totalmente cerrada atornillando la tapa 110 sobre el recipiente 120. Se apreciará que los conjuntos de rosca de tornillo no tienen que tener una configuración de encaje a presión.

35 El indicador 100 puede utilizarse de una manera similar a la descrita con respecto al indicador 10. Los microorganismos pueden colocarse dentro del interior 124 del recipiente 120, por ejemplo, sobre una almohadilla 190 y la tapa 110 puede ser montada sobre el recipiente 120. Como se muestra en la Figura 7, la tapa 110 está montada sobre el recipiente 120 en una primera posición abierta (no activada) deslizando las proyecciones 117 de la tapa 110 sobre las proyecciones 126 del recipiente 120 de tal manera que las proyecciones 126 engranan con las proyecciones 117 y mantienen la tapa 110 en su sitio.

40 El indicador 100 puede entonces someterse a un proceso de esterilización. El vapor de esterilización entra en la tapa 110 cerca del extremo inferior de la tapa 110 a través de un espacio entre la tapa 110 y el recipiente 120. Por ejemplo, en la realización representada en las figuras 6-10, las proyecciones 126 son discontinuas de tal manera que puede haber un espacio o abertura entre la superficie exterior del recipiente 120 y la superficie interna de la pared 112. El esterilizante pasa a través de este espacio/abertura y entra en el espacio 118 formado entre la pared 112 y la pared 114. El esterilizante pasa sobre y alrededor de las proyecciones 117 y sobre el extremo 122 abierto del recipiente 120 y fluye dentro del recipiente a través de un paso 150 definido por un espacio entre la superficie interior de la pared 125 del recipiente y la superficie exterior de la pared 114 sobre la tapa 110, y luego actúa sobre los microorganismos.

45 Después del proceso de esterilización, el indicador 100 se activa moviendo la tapa 110 en una segunda posición cerrada (figuras 8-9) atornillando la tapa 110 sobre el recipiente 120. El atornillar la tapa 110 sobre el recipiente 120 causa que los bordes 128 de los miembros 127 de punción penetren en la barrera 130 rompible, lo que hace que el fluido 140 se drene desde la cámara 116 interior de la tapa 110 hasta el interior del recipiente 120 y entre en contacto con los microorganismos. Como se muestra en las figuras 8 y 9, la tapa 110 puede ser movida a una posición tal que la rosca más alta encaje con las proyecciones 126 para mantener la tapa 110 en una relación

sellada con el recipiente para evitar que microorganismos adicionales entren en el sistema y para proporcionar una trayectoria tortuosa para el paso del medio de esterilización. El indicador 100 puede ser incubado después durante un periodo de tiempo suficiente para determinar la viabilidad de los microorganismos.

5 Generalmente, la tapa (por ejemplo, tapa 20 o tapa 110) puede tener cualquier configuración, forma y/o tamaño como se desee. Además, la configuración, incluyendo la forma y/o volumen de la cámara interna (por ejemplo, cámaras 26 y 116) no está limitada y puede seleccionarse según se desee.

10 Como se ha descrito anteriormente, la tapa 20 en la realización ilustrada en las figuras 1-4 se muestra con aberturas 28 para permitir la entrada del esterilizante de vapor en el indicador. Se apreciará, sin embargo, que no es necesario dotar a una tapa de tal característica. El número, el tamaño, la forma y/o la ubicación de la(s) abertura(s) pueden seleccionarse según se desee. Por ejemplo, la ubicación, la forma y el tamaño de las aberturas en la tapa y/o el recipiente pueden seleccionarse para proporcionar una trayectoria tortuosa para la entrada y salida del vapor de esterilización entre los microorganismos y los ambientes circundantes. El camino tortuoso también puede servir para contrarrestar la contaminación por agentes externos.

15 Se pueden proporcionar aberturas en el recipiente adicionalmente o como alternativa para proporcionar aberturas en la tapa. Si no se proporcionan aberturas en la tapa, la pared o paredes internas no necesitan estar localizadas para proporcionar un espacio entre la pared interior de la tapa y la superficie interior del recipiente. Adicionalmente, si se proporcionan aberturas en el recipiente, estas deben situarse de manera que el medio de crecimiento no se escape o se derrame a través de dichas aberturas cuando el indicador se activa y se rompe la barrera.

20 El recipiente (por ejemplo, los contenedores 30 o 120) se puede dimensionar y conformar según se desee para adaptarse a un propósito particular. Como se muestra en las realizaciones ilustradas, los recipientes 30 y 120 tienen una forma en general cónica en la que la pared lateral se estrecha hacia el fondo del recipiente. Es decir, la pared lateral es sustancialmente circular en sección transversal de manera que un corte en sección transversal más próximo a la base es de un diámetro menor que un corte en sección transversal más alejado de la base. Adicionalmente, la geometría del interior del recipiente se puede seleccionar como se desee para un propósito particular o para el uso previsto. Generalmente, la región interior está definida por el espacio entre la pared lateral cónica. La región interior puede hacerse más pequeña aumentando el espesor de las paredes laterales. La geometría del recipiente se puede diseñar en general para servir como trayectoria de luz para diversos métodos de detección tales como métodos de detección espectroscópicos. Deseablemente, el recorrido de la luz atraviesa el recipiente. Proporcionando al recipiente un interior que tiene un volumen relativamente pequeño (por ejemplo, geometría ahusada en las realizaciones ilustradas), se utiliza un volumen menor de medio de crecimiento para concentrar los organismos, metabolitos (por ejemplo, enzimas), indicadores y/o moléculas de sustrato. Esto aumenta la señal mientras se mantiene una longitud de trayectoria incrementada para la fuente de luz.

35 También es deseable que la trayectoria de la luz esté sustancialmente libre de cualquier objeto que pueda interferir con la luz desde la fuente de luz. De este modo, con un sistema indicador que emplea elementos de punción configurados como se muestra en los recipientes 30 y 120, el recipiente se orientaría deseablemente en un detector de tal manera que los elementos de punción no obstruyan o interfieran con el trayecto de la luz. Las flechas 160, 170 y 180 de la Figura 10 ilustran trayectorias potenciales de muestreo de luz para analizar espectroscópicamente los sistemas indicadores 10 y 100. Se apreciará que la luz puede ser leída (observada) a lo largo de cualquier cara del recipiente. La flecha 180 ilustra que una fuente de luz puede estar montada en el fondo del pozo de un lector.

40 La tapa y el recipiente están configurados para montar la tapa en el recipiente. La configuración de montaje no está particularmente limitada y, tal como se ilustra en los sistemas indicadores 10 y 100, la tapa puede montarse en el recipiente en una relación de encaje a presión y/o de rosca. Como se muestra en los sistemas indicadores 10 y 100, puede proporcionarse una configuración de encaje a presión proporcionando proyecciones sobre la tapa y el recipiente adaptados para acoplarse entre sí. El diseño de tales configuraciones no está limitado. Del mismo modo, no hay limitación con respecto al diseño de un sistema indicador adaptado para el montaje/cierre de rosca. Se apreciará que también se contemplan otras configuraciones de montaje. Por ejemplo, un sistema indicador puede estar configurado con un mecanismo de enclavamiento externo u otros mecanismos adecuados para montar la tapa en el recipiente y activar el indicador.

50 Como se muestra en las realizaciones ilustradas, el recipiente contiene al menos un miembro de punción (por ejemplo, miembros 36 y 127 de punción) adaptado para penetrar o hacer que la barrera rompible se rompa cuando el sistema indicador se activa. La configuración, el tamaño, la forma, la ubicación y/o el número de elementos de punción pueden seleccionarse según se desee. Por ejemplo, aunque las realizaciones ilustradas se muestran con dos miembros de punción que se extienden desde el fondo del recipiente, se apreciará que se pueden seleccionar uno o más miembros de punción de configuraciones similares u otras. Como se describirá más adelante, el sistema indicador no tiene que incluir un miembro de punción para romper la barrera rompible. Por el contrario, la barrera rompible puede configurarse para autorromperse en un tiempo seleccionado y/o bajo ciertas condiciones.

Como se muestra en la realización de las figuras 6-10, un recipiente 120 puede estar provisto de un miembro de

- 5 soporte tal como, por ejemplo, las patas 129. Puede proporcionarse uno o más miembros de soporte para proporcionar una estructura autoportante y/o para mejorar la estabilidad del indicador. Los miembros de soporte también pueden proporcionar una superficie de contacto adicional para un intercambio de calor mejorado con una superficie calentada (por ejemplo, dentro de un aparato de esterilización o con la característica de incubadora de un detector tal como un fluorómetro).
- 10 La parte inferior del recipiente puede estar provista de una geometría de superficie adecuada para introducir el sistema indicador en un soporte para su colocación en un aparato de esterilización, lector, incubadora, etc. particular, de modo que el contenedor pueda entrar en un lector, incubadora, etc. y/o entrar en el soporte, lector, incubadora, etc. en una orientación adecuada. Por ejemplo, mientras que las patas 129 en el recipiente 120 en las figuras 6-10 pueden servir como miembros de soporte para estabilizar y/o soportar el recipiente, también pueden ayudar a definir una geometría de superficie a lo largo del fondo y lados del recipiente 120. Un soporte, lector, incubadora o similar puede estar provisto de una superficie que tiene ranuras que corresponden a la geometría/diseño superficial del fondo o de los lados del recipiente. Por ejemplo, con referencia a la Figura 11, una base 200, tal como en un esterilizador, un lector, una incubadora, un soporte o similar, puede incluir depresiones o ranuras 202, 204 y 206, dimensionadas y configuradas para recibir una característica correspondiente, tal como la base de las patas 129 y el fondo 121 del recipiente 120. Puede ser deseable proporcionar la base y las paredes laterales del sistema indicador con una geometría particular codificada para su recepción en un soporte particular de un lector, detector, incubadora, etc., para asegurar que el indicador entra en y se coloca dentro del lector/detector de modo que el contenedor se sitúa en el lector en una orientación apropiada. Por ejemplo, con referencia a la Figura 10, puede ser deseable que el sistema 100 indicador se coloque en un lector o detector en una orientación particular para asegurar que el recipiente esté orientado para proporcionar una trayectoria de luz apropiada para la lectura de la muestra. Un sistema indicador también podría ser introducido en una incubadora particular que está fijada o se fija a sí misma a una temperatura apropiada para el organismo biológico que se utiliza, ya que diferentes organismos a menudo requieren diferentes temperaturas para un crecimiento óptimo.
- 15
- 20 Se apreciará que el recipiente no tiene que tener patas 129 para proporcionar al recipiente una geometría de superficie particular adecuada para introducir el indicador en un soporte. Por ejemplo, la base de un recipiente, tal como la base del extremo inferior 31 del recipiente 30 en las figuras 1-4, podría estar provista de un patrón de ranuras, depresiones, proyecciones y similares para proporcionar una geometría de superficie particular.
- 25 La tapa y el recipiente pueden estar hechos de cualquier material que sea capaz de resistir la temperatura y/o productos químicos empleados en un proceso de esterilización particular. Diferentes técnicas de esterilización pueden tener requisitos de material diferentes, y el material empleado puede seleccionarse para adaptarse a un propósito particular o uso previsto. La tapa y/o el recipiente se pueden hacer, por ejemplo, a partir de un material polimérico. Materiales poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, poliolefinas, poliestirenos, policarbonatos, polimetacrilatos, poliimidias, poliésteres, combinaciones de dos o más de los mismos, y similares. Ejemplos de poliolefinas adecuadas incluyen polietileno, polipropileno y similares. Un material de ejemplo para la tapa y/o el recipiente es polipropileno, que es compatible con una variedad de esterilizantes incluyendo peróxido de hidrógeno, vapor, óxido de etileno y ácido peracético. El recipiente y la tapa pueden fabricarse a partir del mismo material o pueden fabricarse a partir de diferentes materiales. Con el fin que sea adecuado para el uso con métodos para detectar el cambio en una propiedad del indicador, el recipiente tiene deseablemente alguna transparencia. Por ejemplo, para los métodos de detección fluorométrica y espectroscópica, el recipiente tiene deseablemente alguna transparencia a la(s) longitud(es) de onda de interés. Si se desea, la tapa y/o el recipiente pueden ser coloreados.
- 30
- 35 La tapa y/o el recipiente se pueden formar por cualquier método adecuado tal como, por ejemplo, por métodos de moldeo como son conocidos en la técnica. La barrera rompible puede ser configurada como se desee y hecha de cualquier material adecuado de tal manera que la barrera pueda romperse para liberar el fluido de la tapa dentro del recipiente. Como se usa en la presente memoria, una barrera rompible no se limita a una estructura que debe romperse, tal como pinchando la barrera con otro objeto (por ejemplo, perforando las barreras 40 o 130 con los bordes afilados de los miembros 36 o 127 de punción, respectivamente). El término "barrera rompible" también puede abarcar una barrera que es "autorrompible" y como resultado de una propiedad física o cambio en la propiedad física bajo ciertas condiciones.
- 40
- 45 En una realización, tal como en las realizaciones ilustradas en las figuras 1-10, la barrera rompible está construida como una capa de barrera que debe ser rota por otro objeto (por ejemplo, miembros de punción) que penetra a través de la barrera. Dicha capa de barrera puede estar formada a partir de un material polimérico, una lámina metálica, o una combinación de dos o más de los mismos. Materiales poliméricos adecuados incluyen poliolefinas, poliestirenos, polimetacrilatos, poliimidias, poliácilamidias, combinaciones de dos o más de los mismos, y similares. Un material polimérico a modo de ejemplo para la barrera rompible es un poliéster orientado biaxialmente. Una combinación de ejemplo de lámina metálica/polímero para la barrera rompible es Alcon DD225, que es una lámina metálica con un lado lacado y un lado recubierto de polipropileno.
- 50
- 55 La barrera se puede proporcionar como una película y puede tener cualquier grosor como se desee, siempre que la película sea capaz de romperse por los miembros de punción cuando la tapa se mueve a una posición cerrada. En

una realización, la barrera rompible tiene un espesor en el intervalo de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 mils. En otra realización, la barrera rompible tiene un espesor en el intervalo de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.5 mils. La barrera rompible puede estar formada como una construcción de capa única o una construcción multicapa. La barrera rompible puede estar diseñada para facilitar la punción de la barrera por los miembros de punción. Por ejemplo, la capa de barrera puede estar provista de un área de debilidad para ayudar a perforar eficazmente la barrera. Pueden proporcionarse áreas de debilidad, por ejemplo, proporcionando la barrera con una o más áreas que son más delgadas y más fáciles de perforar (es decir, requieren menos fuerza de punción) en relación con el resto de la capa de barrera. Las áreas de debilidad también pueden proveerse proporcionando a la película una línea de rayado, línea de troquel, línea perforada o similar. Como se muestra en las figuras 1 y 5, la película 40 incluye una línea 42 cortada por troquel.

En otra realización, la barrera rompible puede ser autorrompible y estar formada a partir de un material que sufre un cambio físico durante el calentamiento, cambio físico que da lugar a la rotura de la barrera. Por ejemplo, en una realización, la barrera puede estar formada a partir de un material polimérico que tiene un punto de fusión seleccionado de tal manera que el indicador se activa calentando el indicador (a una temperatura seleccionada) provocando de ese modo que la barrera se rompa por fusión y liberación del medio de crecimiento en el recipiente. En otra realización, la capa de barrera puede estar formada a partir de una película termoencogible que tiene propiedades adecuadas para facilitar la rotura de la película tras la exposición a una temperatura seleccionada. Por ejemplo, la película puede ser una película termoencogible que tiene una resistencia al desgarramiento relativamente baja, de tal manera que la película se desgarrará al encogerse, liberando de este modo el medio de crecimiento en el recipiente. Los materiales para una barrera que se rompen por fusión o desgarramiento (debido a la contracción) son verificables por los expertos en la técnica y pueden seleccionarse con base en el método de esterilización particular que se emplea y/o en las condiciones deseadas para activar el indicador. Las películas termoencogibles incluyen típicamente películas orientadas, tales como, por ejemplo, películas de polipropileno orientadas. En una realización, la barrera puede estar adaptada para romperse en o alrededor de la temperatura de esterilización (siempre que el indicador sea expuesto al proceso de esterilización durante un período de tiempo suficiente antes de romper la barrera). En otra realización, puede ser deseable que la barrera no sufra el cambio físico autorrompible (por ejemplo, fusión, encogimiento y/o rasgado) hasta después de que el sistema indicador haya sido expuesto a las condiciones de esterilización durante un período de tiempo suficiente. Es decir, puede ser deseable que la barrera no experimente el cambio deseado en la propiedad física a las temperaturas de esterilización, sino que exhiba el cambio a una temperatura mayor que la temperatura de esterilización. En este caso, el sistema indicador puede estar expuesto a las condiciones de esterilización a una primera temperatura durante un período de tiempo seleccionado y luego expuesto a una segunda temperatura (mayor que la temperatura de esterilización) para hacer que la barrera se rompa (tal como por fusión o encogimiento o desgarramiento). La barrera autorrompible puede ser particularmente adecuada para su uso en procedimientos de esterilización por vapor o por calor seco.

La tapa y el recipiente pueden formarse por cualquier método adecuado para conformar la forma y/o configuraciones deseadas. Las tapas y recipientes formados a partir de materiales poliméricos pueden formarse por diversos métodos de moldeo tales como, por ejemplo, moldeo por inyección.

La tapa lleno de medios puede proveerse proveyendo una estructura de tapa que tiene una cámara interna adecuada para contener el medio líquido. La cámara interior puede entonces llenarse con un medio de crecimiento seleccionado y una barrera rompible puede estar unida a la cámara interior para cubrir la abertura de acceso de la cámara y encapsular el medio de crecimiento dentro de la cámara interior. La barrera rompible puede estar unida a la cámara por cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo, un adhesivo, soldadura sónica, termosellado y similares. La barrera rompible puede tener una o ambas caras tratadas con corona, tratadas con un adhesivo, revestidas con una laca o película de polímero, o metalizadas para facilitar la fijación de la película a la cámara. Una capa de barrera de ejemplo es una lámina de aluminio lacada, que facilita el termosellado a una variedad de materiales poliméricos incluyendo polipropileno.

El microorganismo de ensayo puede seleccionarse según se desee en base al proceso de esterilización que se está evaluando. Generalmente, el microorganismo de ensayo debe tener una alta resistencia al proceso de esterilización que se está evaluando. Las esporas bacterianas son microorganismos de ejemplo, porque generalmente tienen una alta resistencia a muchos procesos de esterilización diferentes. Otros microorganismos adecuados incluyen levaduras, hongos y bacterias en estado vegetativo. Ejemplos de esporas bacterianas incluyen, por ejemplo, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus atrophaeus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Aspergillus niger* y similares. Se puede usar un solo tipo de microorganismos de ensayo o combinaciones de microorganismos de ensayo. La concentración de microorganismos de ensayo puede seleccionarse según se desee para un propósito particular. En una realización, la concentración de microorganismos de ensayo puede estar en el intervalo de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (ufc).

Como se ha descrito anteriormente, los microorganismos de ensayo pueden inocularse en el fondo o en las paredes del recipiente. Alternativamente, los microorganismos pueden colocarse sobre un soporte, el cual se dispone

entonces dentro del recipiente. Puede utilizarse cualquier material de soporte adecuado incluyendo, por ejemplo, un soporte basado en celulosa, un soporte basado en fibra de vidrio o un soporte polimérico. Un ejemplo no limitativo de un soporte adecuado incluye un elemento inoculado con esporas que se envuelve o se encapsula en una membrana hidrofílica microporosa como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,516,648, que se incorpora aquí como referencia.

El medio de crecimiento puede seleccionarse según se desee para un propósito particular o para el uso pretendido. Ejemplos de medios de crecimiento adecuados incluyen soluciones acuosas de caldo de digestión de soja-caseína, dextrosa triptona y tioglicolato fluido. Un medio de crecimiento de ejemplo es Caldo Soja Tripticasa (TSB). En aplicaciones de vapor o calor seco, se pueden usar medios de agar. Los medios basados en agar son generalmente semisólidos a temperatura ambiente, y tras la exposición al vapor o al calor seco, el agar se funde. Tras la activación del indicador, se rompe la barrera rompible y el agar fundido fluye hacia el recipiente que contiene los microorganismos de ensayo y generalmente permanece líquido a las temperaturas utilizadas para el control.

El medio de crecimiento puede comprender un indicador que sufre un cambio de propiedad, el cual es capaz de ser detectado y/o medido, en respuesta al crecimiento de un microorganismo particular. Por ejemplo, el detector puede proporcionarse para reaccionar con un metabolito particular (por ejemplo, una enzima) producido por los microorganismos en crecimiento, lo que da como resultado un cambio de color, un cambio de pH, un cambio de color, un cambio en la fluorescencia (por ejemplo, que fluoresce o fluorescencia), un cambio en la turbidez, y similares. Deseablemente, el metabolito se selecciona de tal manera que se logra una detección relativamente rápida o temprana de la actividad del microorganismo. Deseablemente, el indicador está presente en una cantidad suficiente para proporcionar cantidades detectables del indicador, en presencia del metabolito, dentro de un período de aproximadamente dos horas (o menos) después de la finalización del proceso de esterilización. El indicador puede seleccionarse en base al microorganismo de ensayo que se está utilizando y al metabolito de interés. Los metabolitos adecuados y un indicador apropiado para detectar el metabolito son fácilmente determinables por los expertos en la técnica. Un ejemplo no limitativo de un metabolito adecuado de interés es una enzima tal como alfa amilasa, que se secreta en una bacteria tal como *Bacillus subtilis*, proteasas, y similares. Los indicadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, moléculas biológicamente activas, colorantes fluorescentes, colorantes, sustancias cromogénicas, pigmentos, ácidos, bases, compuestos radiomarcados, moléculas que exhiben fluorescencia, moléculas que dejan de fluorescer y similares. Un ejemplo de indicador es un sustrato fluorescente tal como, por ejemplo, 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopirósido (MUD), 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactopirósido (MUG) y similares.

El método de detección puede seleccionarse en base a la propiedad de interés y puede incluir, por ejemplo, métodos de detección fluorométricos, visuales, de pH y espectroscópicos. La detección de un cambio medible en una propiedad indicadora dentro de un período de tiempo establecido indica la viabilidad de microorganismos y una esterilización inadecuada. La ausencia de un cambio medible dentro del período de tiempo establecido demuestra que el proceso de esterilización fue letal para los microorganismos de ensayo y, por lo tanto, adecuado.

El medio de crecimiento también puede contener una sustancia que reduce la toxicidad del medio de crecimiento hacia el metabolito. Las sustancias reductoras de la toxicidad adecuadas incluyen, por ejemplo, carbón activado, albúmina de suero bovino, un almidón soluble y similares.

Aunque se ha descrito el método de utilización del indicador de esterilización con respecto a los indicadores biológicos, se apreciará que el indicador no está limitado y puede utilizarse como un indicador enzimático, un indicador biológico/enzimático dual y similares. En una realización, el indicador de esterilización puede usarse como un indicador enzimático. En tal aplicación, se puede colocar una enzima activa en el recipiente y un sustrato que reacciona con la enzima puede colocarse en la cámara interior de la tapa y sellarse dentro de la cámara interior de la tapa mediante la barrera rompible. La enzima activa puede estar impregnada sobre una tira de soporte y dispuesta dentro del recipiente. El indicador se somete entonces a un proceso de esterilización. El esterilizante entra en el recipiente y entra en contacto con la enzima activa en la tira portadora. Después del procedimiento de esterilización, el indicador puede ser activado como se ha descrito anteriormente moviendo la tapa hacia abajo de tal manera que la barrera rompible se rompe (por ejemplo, siendo puncionada por los miembros de punción dentro del recipiente) y el sustrato fluye dentro del recipiente donde puede entrar en contacto con la enzima en la tira de soporte.

La eficacia del procedimiento de esterilización puede evaluarse evaluando la actividad de la enzima. La enzima y el sustrato se eligen de manera que el sustrato reaccione con la enzima activa para formar un producto detectable. Generalmente, la inactivación de la enzima se correlacionará con la muerte de los microorganismos de ensayo en el indicador. La enzima seleccionada para uso en un indicador biológico debe ser al menos tan resistente (y deseablemente más resistente) a un procedimiento de esterilización como microorganismos que pueden estar presentes como contaminantes. La enzima debe permanecer suficientemente activa para formar un producto enzimático-sustrato detectable después de un ciclo de esterilización que no logra matar microorganismos contaminantes, pero que se inactivará mediante un ciclo de esterilización que mata microorganismos contaminantes. Si el procedimiento de esterilización funciona correctamente, la enzima es inactivada durante el procedimiento, y no hay ningún producto detectable. Si el procedimiento de esterilización no funciona correctamente, la enzima no se inactiva y la enzima reaccionará con el sustrato para formar un producto detectable. El producto de sustrato

enzimático puede ser detectable como un cambio de color, una señal fluorescente, una señal luminiscente, o similar.

La enzima y el sustrato no están limitados y pueden seleccionarse según se desee para un propósito particular o para un uso previsto. Un experto en la técnica será capaz de determinar y seleccionar un sustrato apropiado que reaccionará con una enzima activa para producir un producto que sea detectable por fluorescencia, cambio de color y similares.

Se puede obtener una enzima activa a partir de diversas fuentes, tales como (i) la enzima aislada purificada derivada de un microorganismo apropiado, (ii) un microorganismo para el cual la enzima es nativa o añadida por ingeniería genética, o (iii) un microorganismo al que se ha añadido la enzima durante la esporulación o el crecimiento de manera que la enzima se incorpora o se asocia con el microorganismo. Enzimas adecuadas incluyen enzimas derivadas de microorganismos formadores de esporas, tales como *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*. Las enzimas de microorganismos formadores de esporas que son útiles en los indicadores biológicos de la invención incluyen, pero no se limitan a,  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\alpha$ -D-glucosidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, butirato esterasa, caprilato esterasa lipasa, miristato lipasa, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, quimiotripsina, fosfohidrolasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, tirosina aminopeptidasa, fenilalanina aminopeptidasa,  $\beta$ -D-glucuronidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, N-acetil-B-glucosaminodasa,  $\beta$ -D-celobiosidasa, alanina aminopeptidasa, prolina aminopeptidasa y una esterasa de ácidos grasos, derivados de microorganismos que forman esporas.

Son conocidos en la técnica sustratos cromogénicos y fluorogénicos que reaccionan con enzimas para formar productos detectables y que son adecuados para uso en el indicador de esterilización de la invención. Los sustratos se pueden clasificar en dos grupos basándose en la manera en la que crean una señal visualmente detectable. Los sustratos del primer grupo reaccionan con enzimas para formar productos modificados por enzimas que son ellos mismos cromogénicos o fluorescentes. Los sustratos en el segundo grupo forman productos modificados por enzimas que deben reaccionar adicionalmente con un compuesto adicional para generar una señal de color o fluorescente. Una serie de sustratos fluorogénicos para enzimas de diverso origen que son conocidos, comercialmente disponibles, y han sido utilizados en procedimientos enzimológicos. Entre ellos se encuentran una variedad de derivados 4-metilumbeliferilo fluorogénicos (hidrolizables a 4-metilumbeliferona); derivados de 7-amido-4-metil-cumarina; derivados de diacetilfluoresceína; y fluorescamina.

Los derivados útiles de 4-metilumbeliferilo incluyen, pero no se limitan a, 4-metilumbeliferil-2-acetamido-4,6-O-bencilideno-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido; acetato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida; 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\alpha$ -D-glucosaminida; 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida; ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetil neuramínico; 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -L-arabinofuranosida; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -L-arabinósido; butirato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-celobiósido; metilumbeliferil- $\beta$ -D-N,N'-diacetilquitobiosido; elaidato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-fucósido; 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -L-fucósido; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -L-fucósido; 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactósido; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactósido; 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucósido; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucósido; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido; p-guanidinobenzoato de 4-metilumbeliferilo; heptanoato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-manopiranosido; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-manopiranosido; oleato de 4-metilumbeliferilo; palmitato de 4-metilumbeliferilo; fosfato de 4-etilumbeliferilo; propionato de 4-metilumbeliferilo; estearato de 4-metilumbeliferilo; sulfato de 4-metilumbeliferilo; 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-N,N',N''-triacetilquitotriosa, 4-metilumbeliferil 2,3,5-tri-o-benzoil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido, cloruro de 4-metilumbeliferil-p-trimetilamonio cinamato y 4-metilumbeliferilo B-D-xilósido.

La presente invención puede entenderse adicionalmente con referencia al siguiente ejemplo. Los ejemplos no pretenden limitar la invención de manera alguna, sino sólo para ilustrar adicionalmente diversos aspectos de la invención.

#### Ejemplos

Se diseña un indicador biológico autocontenido que tiene una tapa y un recipiente similares a los ilustrados en las figuras 6-10. La tapa y el recipiente se forman a partir de polipropileno a través de un proceso de moldeo. La tapa se llena con 0.5 ml de un medio de crecimiento que contiene un sustrato fluorescente. El medio de crecimiento tiene la siguiente formulación:

|   |       |
|---|-------|
| Digestión pancreática de caseína:       | 17 g  |
| Digestión enzimática de harina de soja: | 3 g   |
| Cloruro sódico:                         | 5 g   |
| Fosfato dipotásico:                     | 2.5 g |
| Dextrosa:                               | 2.5 g |

## ES 2 614 913 T3

Agua destilada: 1 litro

Al medio de crecimiento anterior se añaden 0.2 g de 4-metil-lumbeliferil- $\beta$ -D-galactopironósido (MUG) como sustrato fluorescente. La cámara interior de la tapa llena con medio se cubre con una barrera rompible formada a partir de una hoja de aluminio lacada de 1 mil de espesor. La película de cubierta se fija a la cámara interior por termosellado.

5 El fondo del recipiente se inocula con  $10^5$  o  $10^6$  ufc (unidades formadoras de colonias) de *Geobacillus stearothermophilus*. La tapa está montada en el recipiente y la muestra es tratada en autoclave. Después del  
10 tratamiento en autoclave, el indicador se activa atornillando la tapa con una fuerza mayor o igual a aproximadamente 4 libras/pulgada, lo que hace que la barrera rompible sea rota por los miembros de punción. Un indicador de control que contiene  $10^5$  o  $10^6$  ufc de *Geobacillus stearothermophilus* se activa de una manera similar. Los indicadores se incuban entonces a 55-60°C en una incubadora/lector de fluorescencia de 8 pozos y 2 temperaturas disponible en STERIS Corporation. El lector fluorescente excita la muestra a 365 +/- 20 nm y detecta la emisión de la muestra a 420 +/- nm.

15 En aun otra realización, se usan  $10^5$  o  $10^6$  ufc de *Bacillus atrophaeus* en lugar de *Geobacillus stearothermophilus* para la evaluación de esterilización basada en óxido de etileno y el indicador activado resultante se incuba a 37°C en el lector fluorescente de 8 pozos, de 2 temperaturas, descrito anteriormente.

Reivindicaciones

1. Un indicador de esterilización autocontenido para determinar la efectividad de un proceso de esterilización, comprendiendo el indicador de esterilización:
  - 5 un recipiente (30) polimérico para contener una concentración de microorganismos y/o una enzima, teniendo el recipiente un extremo (33) superior, un extremo (31) inferior y una abertura en el extremo superior; y
    - 10 una tapa (20) para contener un medio de crecimiento, teniendo la tapa una pared (22) exterior, un extremo (23) superior cerrado, un extremo (21) inferior, una abertura adyacente al extremo inferior de la tapa (20), y una pared (24) interior, que está separada de la pared (22) exterior, definiendo una cámara (26) interior que tiene una abertura adyacente al extremo inferior de la tapa (20), la cámara interior para contener un medio (50) de crecimiento y/o un sustrato reactivo con la enzima, comprendiendo la tapa una barrera (40) rompible que recubre la abertura (25) de la cámara (26) interior y al menos una proyección (36) dispuesta dentro del recipiente para perforar la barrera (40) rompible formada a partir de un material polimérico, una lámina metálica o una combinación de los mismos.
  - 15 2. El indicador autocontenido de esterilización según la reivindicación 1, en el que la tapa (20) se puede montar sobre el recipiente (30) en una primera posición en la que la barrera (40) rompible está separada del borde de al menos una proyección, y la tapa (20) es movable a una segunda posición en la que la proyección (36) hace que la barrera rompible se rompa liberando de este modo un medio (50) de crecimiento en el recipiente (30); o
    - 20 en el que la tapa (20) y el recipiente (30) están configurados para montar la tapa (20) en el recipiente (30) en una relación de ajuste a presión; o
      - 20 en el que la tapa (20) y el recipiente (30) están configurados para montar la tapa (20) y el recipiente (30) en una relación de rosca de tornillo; o
        - 25 en el que la tapa (20) y el recipiente (30) están formados independientemente de un material polimérico que se elige entre una poliolefina, un poliestireno, un poli(met)acrilato, un poliéster, una poliimida, una poliacrilamida, un policarbonato o una combinación de dos o más de ellos; o
          - 25 en el que la tapa (20) y el recipiente (30) están formados independientemente de un material polimérico que comprende una poliolefina seleccionada de polietileno, polipropileno, o una combinación de los mismos.
    3. El indicador de esterilización autocontenido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el recipiente (30) comprende además al menos dos elementos (70) de soporte que se extienden desde la superficie exterior del recipiente (30); o
      - 30 en el que al menos uno de la tapa (20) y/o el recipiente (30) comprende al menos una abertura (28) a través de la cual entra un esterilizante en el recipiente (30); o
        - 35 en el que la barrera (40) rompible comprende un material polimérico elegido entre una poliolefina, un poliestireno, un poli(met)acrilato, un poliéster, una poliimida, una poliacrilamida, un policarbonato o una combinación de dos o más de los mismos.
    4. El indicador de esterilización autocontenido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que al menos un lado de la barrera (40) rompible es tratado con corona; o
      - 35 en el que al menos un lado de la barrera rompible es metalizado.
    5. El indicador de esterilización autocontenido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4,
      - 40 en el que la barrera (40) rompible es autorrompible y es rompible por fusión; o
        - 40 en el que la barrera (40) rompible está formada a partir de una película termoencogible; o
          - 40 en el que la barrera (40) rompible está unida a la cámara (26) de la tapa (20) mediante un adhesivo, un sellado térmico, soldadura sónica o una combinación de dos o más de los mismos; o
            - 40 en el que el indicador define al menos una trayectoria tortuosa para la entrada de esterilizante en el recipiente (30).
      6. Un método para evaluar la eficacia de la esterilización que comprende:

- proporcionar un indicador biológico autocontenido que comprende (a) un recipiente (30) polimérico que comprende una parte superior, un fondo, una abertura en la parte superior, y que define una región interior; y (b) una tapa (20) que tiene una pared (22) exterior y una pared (24) interior, que está separada de la pared (22) exterior, definiendo una cámara (26) interior, conteniendo la cámara interior un medio de crecimiento, definiendo la cámara (26) interior una abertura (24) adyacente al fondo de la tapa (20) y la cámara (26), comprendiendo además la tapa (20) una barrera (40) rompible, formada a partir de un material polimérico, una lámina metálica o una combinación de los mismos que recubre la cámara (26); en el que el recipiente (30) del indicador (10) biológico autocontenido comprende al menos una proyección (36) adyacente a la parte superior del recipiente (30) y la barrera (40) rompible se rompe al mover la tapa (20) desde la primera posición a una segunda posición en la que la al menos una proyección (36) hace que la barrera (40) rompible se abra,
- inocular el recipiente (30) con microorganismos que tienen una alta resistencia a la esterilización montando la tapa (20) sobre el recipiente (30) en una primera posición de tal manera que la barrera rompible no se rompa;
- someter los microorganismos a un proceso de esterilización;
- hacer que la barrera (40) rompible de la tapa (20) se rompa de manera que el medio (50) de crecimiento fluya en la región (34) interior del recipiente (30) y entre en contacto con los microorganismos;
- incubar los microorganismos y el medio (50) de crecimiento en condiciones suficientes para promover el crecimiento de microorganismos; y
- detectar la viabilidad de los microorganismos; o proporcionar un indicador de esterilización autocontenido que comprende (a) un recipiente (30) polimérico que comprende una parte superior, un fondo, una abertura en la parte superior, y que define una región (34) interior; y (b) una tapa (20) que tiene una pared externa, una pared interior separada que define una cámara interior, conteniendo la cámara (26) interior una solución que comprende un sustrato reactivo con una enzima activa, definiendo la cámara (26) interior una abertura (25) adyacente al fondo de la tapa (20) y la cámara (26), comprendiendo además la tapa (20) una barrera (40) rompible, formada a partir de un material polimérico, una lámina metálica o una combinación de los mismos, que recubre la cámara (26); en el que el contenedor (30) del indicador (10) biológico autocontenido comprende al menos una proyección (36) adyacente a la parte superior del recipiente (30) y se rompe la barrera (40) rompible moviendo la tapa (20) desde la primera posición a una segunda posición en la que la al menos una proyección (36) hace que se rompa la barrera (40) rompible, disponiendo una concentración de enzimas activas dentro del recipiente (30), teniendo las enzimas una alta resistencia a la esterilización;
- montar la tapa (20) sobre el recipiente (30) en una primera posición de manera que la barrera (40) rompible no esté rota;
- someter las enzimas a un proceso de esterilización;
- hacer que la barrera (40) rompible de la tapa (20) se rompa de manera que la solución que comprende el sustrato fluya hacia la región (34) interior del recipiente (30) y entre en contacto con las enzimas; y
- detectar la actividad de las enzimas.
7. El método según la reivindicación 6,
- en el que el medio de cultivo (50) comprende agar; o
- en el que los microorganismos están dispuestos sobre una superficie (35) interna del recipiente (30); o
- en el que los microorganismos se depositan sobre un sustrato que está dispuesto en la región (34) interior del recipiente (30); o
- en el que la tapa (20), el recipiente (30) o ambos definen al menos una trayectoria tortuosa para la entrada del esterilizante en el recipiente (30).
8. Un sistema (10) indicador biológico que comprende:
- el indicador de esterilización autocontenido de la reivindicación 1;
- una concentración de microorganismos dispuesta dentro del recipiente (30);

y

un medio (50) de crecimiento líquido dispuesto y sellado dentro de la cámara interior de la tapa.

- 5 9. El sistema (10) indicador biológico de acuerdo con la reivindicación 8, estando montada la tapa (20) sobre el recipiente (30) para el movimiento entre una primera posición y una segunda posición, en la que la barrera (40) rompible se desplaza desde el miembro (36) de punción en la primera posición y el miembro (36) de punción perfora y rompe la barrera (40) rompible cuando la tapa (20) se mueve desde la primera posición a la segunda posición.
- 10 10. El sistema (10) indicador biológico según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que al menos uno de la tapa (20) y/o el recipiente (30) comprende al menos una apertura (28) para recibir un fluido de esterilización; o
- 10 en el que la tapa (20) comprende al menos una apertura (28) y la tapa (20) coopera con el recipiente (30) para admitir el fluido esterilizante en el recipiente (30); o
- 15 en el que el extremo (31) inferior del recipiente (30) define una base con una superficie externa, y la superficie exterior de la base define una geometría de superficie, proporcionando la geometría de superficie un patrón de bloqueo, que puede ajustarse conjuntamente a un patrón correspondiente de un aparato para sostener el sistema (10) indicador biológico; o
- 15 en el que el extremo (31) inferior del contenedor (30) define una superficie de base, y la superficie de base y al menos un miembro de soporte definen una geometría de superficie de base que proporciona un patrón de bloqueo, que se ajusta conjuntamente con un patrón correspondiente de una superficie de un aparato para sostener el sistema (10) indicador biológico.
- 20 11. El sistema (10) indicador biológico según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, que comprende además al menos un elemento (70) de soporte que se extiende desde la superficie exterior del recipiente (30).

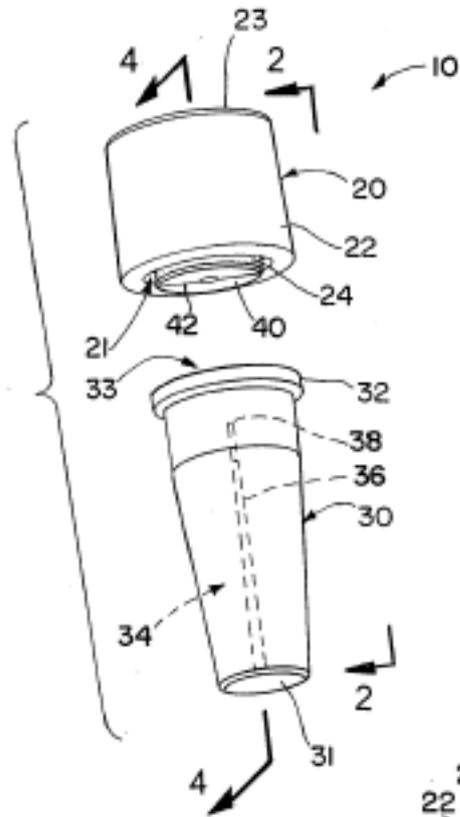


FIG. 1

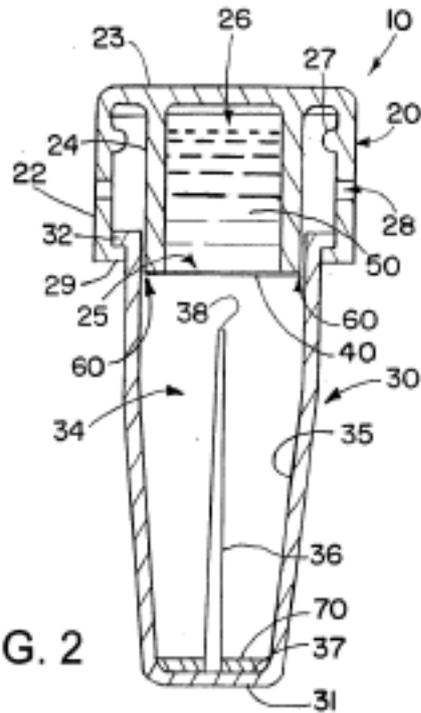


FIG. 2

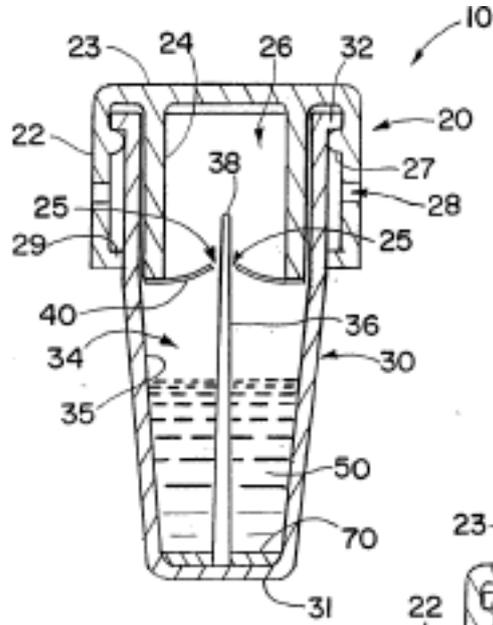


FIG. 3

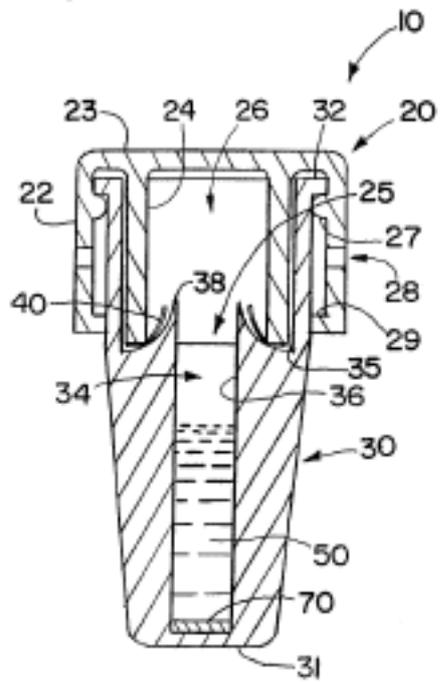


FIG. 4

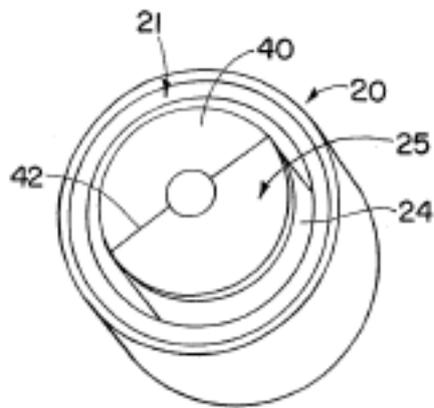


FIG. 5

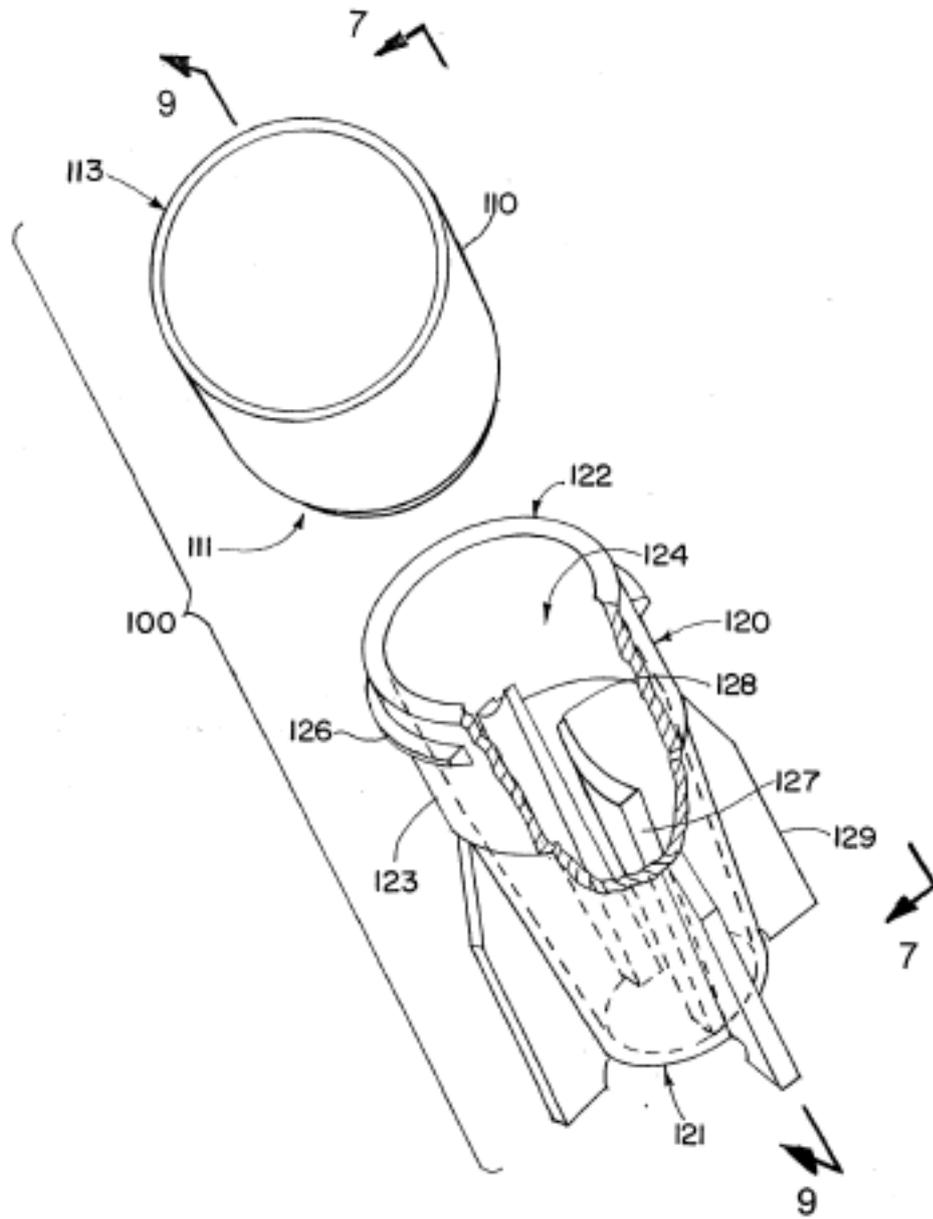


FIG. 6

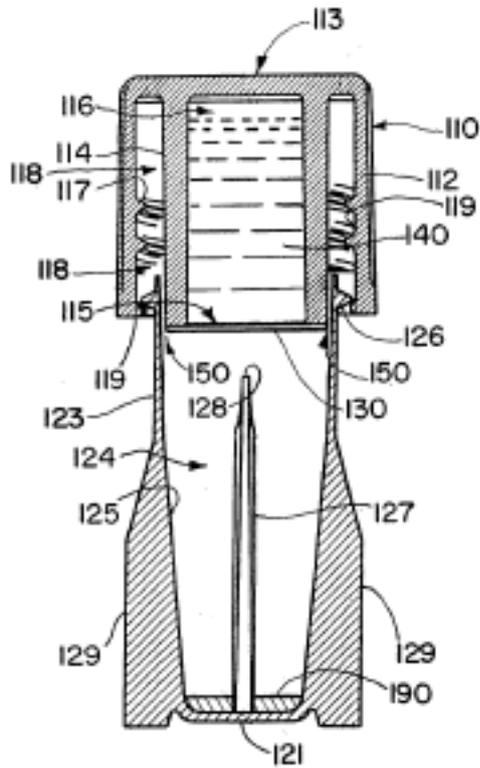


FIG. 7

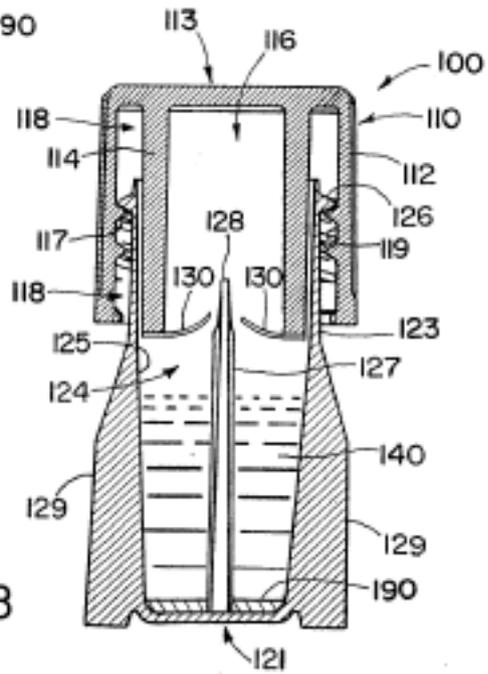


FIG. 8

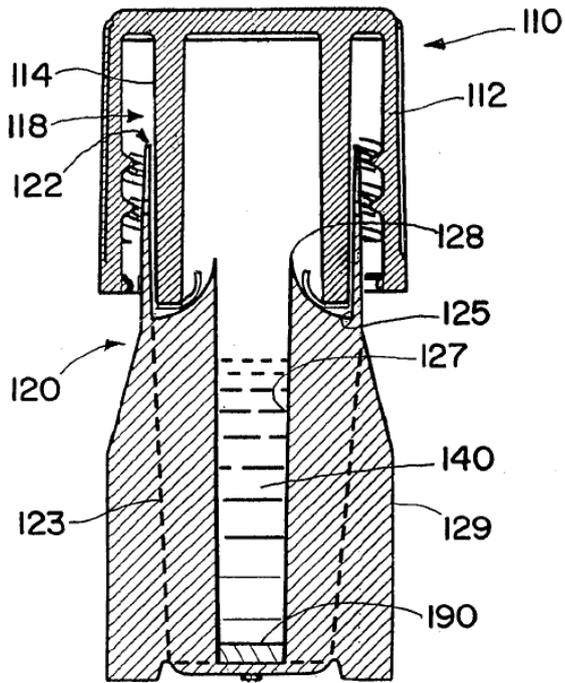


FIG. 9

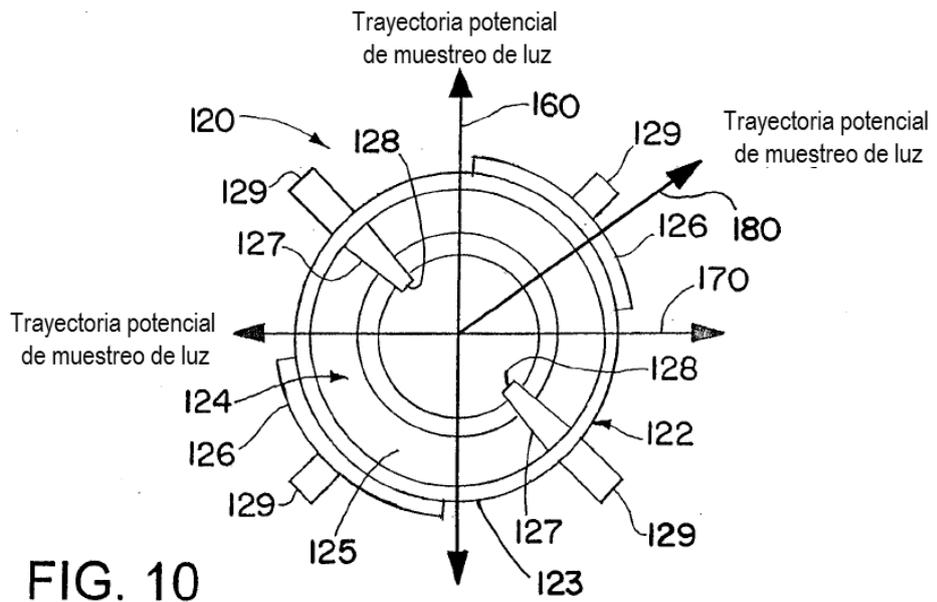


FIG. 10

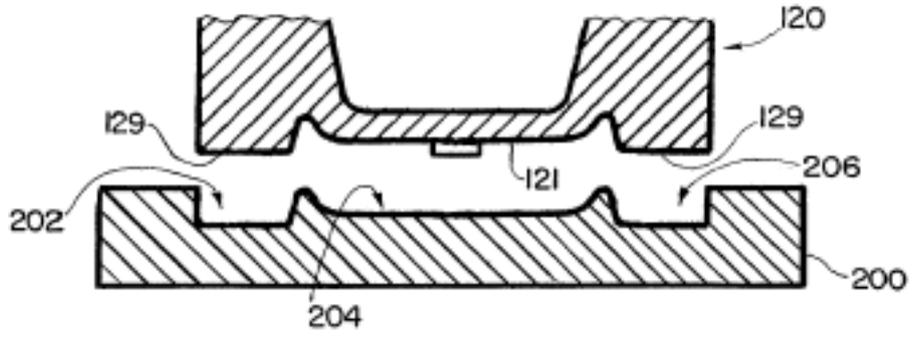


FIG. 11