

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 302**

51 Int. Cl.:

A61L 2/26 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

A61L 2/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2014 PCT/US2014/017916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO2014149384**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014 E 14709833 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2968634**

54 Título: **Indicador biológico para agentes esterilizantes oxidantes**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313840509

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

21.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 618 302 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 para agentes esterilizantes oxidantes

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a indicadores biológicos para probar la eficacia de procesos de esterilización, más específicamente, a un indicador mejorado para uso con esterilizantes oxidantes, que permite seguir los efectos del esterilizante en un indicador biológico más lejos en el ciclo de esterilización que los indicadores biológicos convencionales usados con esterilizantes oxidantes.

Antecedentes

Una de las clases más importantes de indicadores son los indicadores biológicos (IB). Los indicadores biológicos proporcionan el mayor grado de garantía de que las condiciones de esterilización se cumplieron en toda la carga procesada. Se pretende que este tipo de indicador represente el peor caso para el sistema de procesamiento proporcionando dentro del o sobre el indicador un número extremadamente alto de organismos muy resistentes a ese proceso particular. Habitualmente esporas bacterianas son los organismos de elección para seguir los sistemas de esterilización.

Los indicadores biológicos típicamente consisten en microorganismos inoculados sobre un material portador. Los microorganismos típicamente son esporas bacterianas que se sabe que son muy resistentes al medio de esterilización particular en el que se van a usar. El material portador puede variar de papel a plástico a acero inoxidable y puede estar en una variedad de configuraciones que varían de superficies planas a envases tal como viales. Los indicadores biológicos que consisten en viales y tapones se conocen como indicadores biológicos autocontenidos (IBAC) porque contienen todos los elementos requeridos para procesar, activar e incubar las muestras. El portador se coloca en un ciclo de esterilización junto con la carga de dispositivo médico. Después de completar el ciclo el indicador biológico se incuba y sigue el crecimiento durante hasta siete días. El crecimiento de un indicador biológico indica que el proceso de esterilización no era adecuado para obtener esterilización completa y que la carga del dispositivo médico necesita ser reprocesada antes de su uso. El no crecimiento de un indicador biológico confirma que las condiciones en el esterilizador eran adecuadas para destruir al menos el número de esporas bacterianas cargadas en el indicador (por ejemplo 10^6 esporas bacterianas) y por tanto proporciona un nivel de garantía de que la carga del dispositivo médico es estéril.

La resistencia de indicadores biológicos a un proceso de esterilización particular se determina tanto por la espora utilizada como por la configuración del indicador biológico (por ejemplo, IBAC o IBAC en un dispositivo de prueba del proceso). Por tanto, para cambiar la resistencia o bien se necesita alterar el método de esporulación o se necesita desarrollar una nueva configuración física del indicador biológico. Tener varios métodos de esporulación para diferentes indicadores biológicos usados en diferentes procesos de esterilización no es deseable desde una perspectiva de fabricación. Diseñar una nueva configuración física para un indicador biológico puede ser caro, por ejemplo, porque se pueden necesitar nuevos moldes. Por tanto, es deseable ser capaz de alterar la resistencia de un indicador biológico preexistente de una manera sencilla.

El peróxido de hidrógeno vaporoso y otros procesos de esterilización oxidantes son muy eficaces en destruir incluso organismos resistentes tal como esporas. Esto es beneficioso para hospitales, ya que permite que muchos dispositivos médicos sensibles al calor se procesen mediante esterilizadores usando peróxido de hidrógeno vaporoso (POV) y otros esterilizantes oxidantes. Sin embargo, la rápida destrucción que resulta de tales esterilizantes oxidantes hace difícil desarrollar indicadores biológicos que sigan eficazmente muy lejos en el ciclo de esterilización. Es decir, puesto que cuando se usan indicadores biológicos convencionales en un proceso de esterilización con esterilizante oxidante, los organismos en los indicadores biológicos se destruyen tan rápidamente, es menos cierto que una dosis eficaz del esterilizante oxidante ha alcanzado y se ha mantenido a niveles eficaces a todas las partes de la carga de dispositivos médicos como debería ser el caso si el indicador se hubiese destruido más despacio.

El documento WO00/50634 A1 divulga un indicador de esterilización útil para probar la eficacia de procedimientos de esterilización que desinfectan objetos poniéndolos en contacto con un procedimiento de esterilización líquido. El indicador incluye un envase externo que tiene un extremo abierto y un material de cubierta asociado con el extremo abierto que es impermeable a líquidos y bacterias. Se recubre una matriz de gel de enzima sobre una superficie en el envase externo que comprende un gel polimérico biológicamente inerte y una fuente de una enzima activa dispersada en el gel. La enzima tiene una actividad que se correlaciona con la supervivencia de al menos un microorganismo de prueba y se usa comúnmente para seguir la eficacia de un procedimiento de esterilización. Una ampolla rompible en el envase externo contiene un sustrato que es capaz de reaccionar con cualquier enzima activa que permanezca después de haber sometido el indicador a un procedimiento de esterilización para proporcionar una indicación detectable de que un procedimiento de esterilización era ineficaz.

65

El documento WO94/28164 A1 divulga un indicador biológico que utiliza inmovilización para aumentar la termoestabilidad del biomaterial contenido en el indicador. Debido a la termoestabilidad aumentada del biomaterial, el indicador se puede utilizar para seguir la esterilización con o sin materiales o dispositivos de embalaje de prueba convencionales.

5 El documento WO2008/082728 A2 divulga un indicador de esterilización y un proceso para concentrar una señal generada limitándola a una superficie mínima, en un volumen mínimo y pH mínimo y tamponando el crecimiento o mediando influencias.

10 Por tanto, una necesidad para una solución al problema previamente sin resolver de destrucción demasiado rápida de indicadores biológicos por esterilizantes oxidantes ha existido durante algún tiempo. La presente invención se pretende para abordar este problema.

15 Compendio

El concepto inventivo descrito en esta divulgación incluye el uso de aditivos químicos al indicador biológico, en el que el aditivo químico ralentiza la cinética de destrucción de esporas cuando se exponen a esterilizantes oxidantes tal como peróxido de hidrógeno vaporoso, óxido de etileno y ozono. En la presente invención, las esporas se propagan y recogen como es habitual, pero antes de inocular el indicador biológico con las esporas, las esporas se resuspenden (a una concentración de uso) en una solución química. La solución química incluye al menos un metal de transición, que inhibe la acción de esterilizantes oxidantes tal como peróxido de hidrógeno, óxido de etileno y ozono, o rompe o descompone el esterilizante oxidante en componentes no reactivos.

20 Para los fines de la presente invención, las acciones de los aditivos químicos pueden incluir una o más de (a) inhibición de la acción del esterilizante oxidante, que puede incluir la formación de complejos, y (b) la rotura o descomposición del esterilizante oxidante, que puede incluir reacciones de descomposición catalítica y/o neutralización química. A estos aditivos generalmente se hace referencia como que reaccionan (y términos equivalentes tal como reacción o ser reactivo) con el esterilizante oxidante. Por tanto, el término "reactivo con un esterilizante oxidante" se juzga, para los fines de la presente invención, que incluye cualquier acción que ralentiza la cinética de destrucción de esporas en el indicador biológico, que específicamente incluye tanto inhibición de la acción de como descomposición y/o neutralización de, el esterilizante oxidante.

25 Por tanto, según formas de realización de la presente invención, se proporciona un indicador de esterilización para esterilizantes oxidantes, que comprende:

35 un primer compartimento que comprende esporas de una o más especies de microorganismos;
 un segundo compartimento que comprende un medio de crecimiento y configurado para contener los contenidos combinados de un primer compartimento y un segundo compartimento para la incubación después de que el indicador de esterilización se haya expuesto a un esterilizante oxidante; y
 40 un agente dispuesto en el medio de crecimiento y seleccionado para indicar viabilidad de las esporas después de que el indicador de esterilización se haya expuesto al esterilizador oxidante;
 en donde las esporas en el primer compartimento se han pretratado con un compuesto que comprende un metal de transición que es reactivo con un esterilizante oxidante y las esporas comprenden el ion de metal de transición.

45 En una forma de realización, la una o más especies de microorganismo comprende una o ambas de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*.

50 En una forma de realización, el agente indica viabilidad de las esporas por medio de uno o más de un cambio de color, o producción de fluorescencia en presencia de esporas viables.

55 En una forma de realización, el agente es un indicador de pH. En una forma de realización, el indicador de pH comprende verde brillante, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, rojo de cresol, azul de metileno, rojo neutro, rojo fenol, resazurina o azul de timol.

En una forma de realización, el agente es un indicador fluorescente. En una forma de realización, el indicador fluorescente es una proteína fluorescente que cambia de color.

60 En una forma de realización, el agente comprende al menos dos electrodos adaptados para proporcionar una señal eléctrica detectable.

En una forma de realización, el agente comprende una sal de tetrazolio.

65 En una forma de realización, el ion del metal de transición comprende uno o más de hierro, cobre, manganeso, titanio, cinc, vanadio, plata, platino, níquel, molibdeno, cobalto y cromo.

En una forma de realización, el ion de metal de transición es hierro en $K_3[Fe(CN)_6]$ o $Fe_7(CN)_{18}$. El ferrocianuro de potasio normalmente tiene agua de hidratación, y se puede expresar como $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Se indica que el azul de Prusia también se puede identificar por la fórmula $[Fe_4[Fe(CN)_6]_3]$, que es empíricamente la misma que $Fe_7(CN)_{18}$. Se indica que la fórmula idealizada para azul de Prusia es $Fe_7(CN)_{18}$, pero que el azul de Prusia normalmente tiene agua de hidratación. En una forma de realización, el azul de Prusia tiene una fórmula $Fe_7(CN)_{18} \cdot xH_2O$ donde x es habitualmente 14-16. El azul de Prusia normalmente se emplea como una dispersión coloidal muy fina, ya que no es soluble en agua.

En una forma de realización, el esterilizante oxidante comprende uno o más de peróxido de hidrógeno, óxido de etileno y ozono.

En una forma de realización, la presente invención proporciona además un proceso para determinar la eficacia de un proceso de esterilización utilizando esterilizantes oxidantes, que comprende:

- proporcionar un indicador de esterilización según la presente invención,
- exponer el indicador de esterilización y uno o más artículos que se van a esterilizar a un esterilizante oxidante; y
- determinar por inspección del medio de crecimiento incubado si la esterilización fue eficaz.

Descripción detallada

El peróxido de hidrógeno en estado vaporoso es muy eficaz destruyendo microorganismos, pero esta eficacia en la destrucción hace difícil diseñar y desarrollar indicadores biológicos de la manera tradicional que sigan una parte significativa del ciclo. Un medio eficaz de aumentar la resistencia inherente de un indicador biológica es añadir un componente que inhiba la acción del esterilizante activo o rompa el esterilizante activo en componentes no reactivos.

La concentración de los aditivos en solución se puede variar para adaptar o ajustar la resistencia del indicador biológico para seguir eficazmente más del ciclo de esterilización. Los indicadores biológicos, especialmente en químicas oxidativas tal como peróxido de hidrógeno vaporoso, se destruyen rápidamente y habitualmente solo seguirán los primeros minutos (o segundos en algunos productos convencionales) de un ciclo de esterilización. La presente invención proporciona beneficiosamente indicadores biológicos que siguen más del ciclo que solo los primeros minutos o segundos de esterilización.

Las sustancias químicas oxidantes se pueden descomponer en componentes no reactivos en presencia de ciertas sustancias químicas reactivas. Por ejemplo, se ha encontrado que el peróxido de hidrógeno vaporoso se descompone en presencia de la mayoría de los metales de transición tal como hierro, cobre, níquel y manganeso. Cuando materiales que contienen estos metales se procesan a través de un esterilizador de peróxido de hidrógeno vaporoso, se ha encontrado que la concentración de peróxido de hidrógeno en la proximidad de estos materiales disminuye debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno a componentes no reactivos. La presente invención se aprovecha de este descubrimiento para ralentizar la cinética de destrucción en indicadores biológicos usados para seguir esterilizantes oxidantes, tal como peróxido de hidrógeno vaporoso.

Según la presente invención, se usan reactivos de metales de transición que comprenden compuestos de hierro, cobre, níquel y manganeso para reaccionar con esterilizantes oxidantes para inhibir el efecto del esterilizante oxidante sobre el indicador biológico empleado en el indicador de esterilización usado en procesos de esterilización oxidantes. Se ha encontrado que los compuestos de hierro descomponen el peróxido de hidrógeno en componentes no reactivos. Por ejemplo, dos compuestos de hierro preferidos son ferrocianuro de potasio y azul de Prusia. El ferrocianuro de potasio es soluble en agua y el azul de Prusia, aunque no es soluble en agua, forma una dispersión coloidal fina en agua.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un indicador de esterilización para esterilizantes oxidantes, que incluye un primer compartimento que comprende esporas de una o más especies de microorganismos, en donde las esporas se han pretratado con y comprenden un compuesto que comprende un ion de metal de transición que es reactivo con un esterilizante oxidante; un segundo compartimento que comprende un medio de crecimiento y adaptado para combinar los contenidos del primer compartimento con los contenidos del segundo compartimento para la incubación después de que el indicador de esterilización se haya expuesto a un esterilizante oxidante; y un agente dispuesto en el medio de crecimiento y seleccionado para indicar viabilidad de las esporas después de que el indicador de esterilización se haya expuesto al esterilizante oxidante.

El primer y el segundo compartimentos pueden ser cualquier dispositivo indicador de esterilización convencional, adecuado, tal como una vial con un tapón adaptado para contener el medio de crecimiento, y un envase en el que se pueden colocar las esporas. Las esporas se pueden colocar directamente en el envase, o se pueden colocar en un portador que se coloca después en el portador. Se divulga uno de tales viales adecuados en la solicitud de patente en EE UU publicada No. US 2010/0081165, que se puede consultar para detalles adicionales. Otro indicador de esterilización adecuado incluye un portador y un soporte, con el indicador biológico soportado por el portador. Se divulga uno de tales portador y soporte en la solicitud de patente en EE UU publicada No. US 2012/0196355, que se puede consultar para detalles adicionales. Otros indicadores de esterilización adecuados que tienen dos

compartimentos, uno que contiene un indicador biológico y uno que contiene un medio de crecimiento, los pueden seleccionar adecuadamente para uso con la presente invención los expertos en la materia.

Como se ha indicado anteriormente, en una forma de realización, la una o más especies de microorganismos comprende una o ambas de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*. Estos dos microorganismos se usan comúnmente en indicadores biológicos. *Geobacillus stearothermophilus* se usa más comúnmente con peróxido de hidrógeno vaporoso, y *Bacillus atrophaeus* se usa más comúnmente para esterilizantes de óxido de etileno.

En una forma de realización, el agente indica viabilidad de las esporas por medio de uno o más de un cambio de color, o producción de fluorescencia en presencia esporas viables. El experto en la materia puede seleccionar adecuadamente el agente. En general, el agente puede ser cualquier agente adecuado. La característica importante de la presente invención es la capacidad de ralentizar la destrucción de las esporas, y el indicador es solo para indicar el peor de los casos cuando las esporas no se han destruido del todo. Los siguientes agentes se consideran adecuados, pero se pueden usar en su lugar agentes adicionales, como entenderá el experto en la materia.

En una forma de realización, el agente es un indicador de pH. En una forma de realización, el indicador de pH comprende verde brillante, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, rojo de cresol, azul de metileno, rojo neutro, rojo fenol, resazurina o azul de timol. En una forma de realización, el indicador de pH es púrpura de bromocresol, y en otra forma de realización, el indicador de pH es rojo fenol.

En una forma de realización, el agente es un indicador de fluorescencia. En una forma de realización, el indicador de fluorescencia es una proteína fluorescente que cambia de color. Tales proteínas fluorescentes que cambian de color se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Macmillan, "Color-shifting fluorescent proteins highlight biology," Vanderbilt University Medical Center Reporter, 2009. Véase también, por ejemplo, Subach, et al., "Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking", Nature Chemical Biology 5, 118-126 (2009), y Terskikh, et al., "Fluorescent Timer: Protein That Changes Color with Time", Science, Vol. 290 no. 5496 pp. 1585-1588 (2000). El experto en la materia puede seleccionar adecuadamente otros indicadores fluorescentes.

En una forma de realización, el agente comprende al menos dos electrodos adaptados para proporcionar una señal eléctrica detectable. La señal eléctrica detectable se puede detectar, por ejemplo, mediante una tira que tiene dos o más electrodos, tal como se divulga bien en la solicitud en EE UU No. 13/832.158 titulada MÉTODO BASADO EN ENZIMA ACOPLADA PARA EL SEGUIMIENTO ELECTRÓNICO DE INDICADOR BIOLÓGICO, presentada el 15 de marzo de 2013, o la solicitud en EE UU No. 13/836.787, titulada MÉTODO DE DETECCIÓN NO BASADO EN ENZIMAS PARA EL SEGUIMIENTO ELECTRÓNICO DE INDICADOR BIOLÓGICO, presentada el 15 de marzo de 2013, se pueden seleccionar adecuadamente para uso en detectar una señal eléctrica.

En una forma de realización, el agente comprende una sal de tetrazolio. Las sales de tetrazolio adecuadas incluyen, por ejemplo, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-(-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), cloruro de yodonitrotetrazolio (INT), ácido 3,3,-[(fenilamino)carbonil]-3,4-tetrazolio-bis(4-metoxi-6-nitro)bencenesulfónico sódico hidrato (NTT), y disulfonato de 4-[3-(4-idofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno (WST-1). Como se sabe en la técnica, el corte de las sales de tetrazolio por enzimas de células que son metabólicamente activas produce la formación de productos detectables, tal como cristales de formazán. Si estas sales de formazán son solubles en agua se pueden hacer medidas colorimétricas directamente al final del ensayo usando el sobrenadante. Si la sal de formazán no es soluble en agua, se debe realizar la solubilización de los cristales antes de que se puedan hacer medidas de absorbancia de luz. Para la presente invención, las sales de formazán solubles en agua son preferidas.

En una forma de realización, el ion del metal de transición comprende uno o más de hierro, cobre, manganeso, titanio, cinc, vanadio, plata, platino, níquel, molibdeno, cobalto y cromo. Se puede usar cualquier reactivo de metal de transición adecuado. En una forma de realización, el reactivo de metal de transición es uno o una combinación de compuestos de hierro, cobre, níquel o manganeso. Los compuestos de hierro son particularmente eficaces para uso en desactivar peróxido de hidrógeno. Los compuestos de cobre son eficaces para uso en desactivar óxido de etileno. Los compuestos de hierro y manganeso son eficaces para uso en desactivar ozono. Otros compuestos de metales de transición que se sabe reaccionan con esterilizantes oxidantes tales como los usados en la presente invención los pueden seleccionar adecuadamente para uso con la presente invención los expertos en la materia.

En una forma de realización, el ion de metal de transición es hierro en forma de ferrocianuro de potasio, $K_3[Fe(CN)_6]$ o hierro en forma de azul de Prusia, $Fe_7(CN)_{18}$. El ferrocianuro de potasio normalmente tiene agua de hidratación, y se puede expresar como $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Se indica que el azul de Prusia también se puede identificar por la fórmula $[Fe_4[Fe(CN)_6]_3]$, que es empíricamente la misma que $Fe_7(CN)_{18}$. Se indica que la fórmula idealizada para azul de Prusia es $Fe_7(CN)_{18}$, pero que el azul de Prusia normalmente tiene agua de hidratación. En una forma de realización, el azul de Prusia tiene una fórmula $Fe_7(CN)_{18} \cdot xH_2O$ donde x es habitualmente 14-16. El azul de Prusia normalmente se emplea como una dispersión coloidal muy fina, ya que no es soluble en agua.

En una forma de realización, el esterilizante oxidante comprende uno o más de peróxido de hidrógeno, óxido de etileno y ozono.

En una forma de realización, la presente invención proporciona además un proceso para determinar la eficacia de un proceso de esterilización utilizando esterilizantes oxidantes, que comprende:

- 5 proporcionar un indicador de esterilización según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, exponer el indicador de esterilización y uno o más artículos que se van a esterilizar a un esterilizante oxidante; y determinar la eficacia por posterior crecimiento y cambio de color del indicador de pH.

10 Como entenderá el experto en la materia, los fundamentos del proceso de esterilización descrito en el presente documento son sustancialmente similares a los conocidos en la técnica, excepto para el suministro de esporas de una o más especies de microorganismo que se han pretratado con y comprenden un compuesto que comprende un ion de metal de transición que es reactivo con un esterilizante oxidante. Este pretratamiento de las esporas proporciona "protección" temporal contra la acción del esterilizante oxidante para el fin de "ralentizar" el efecto del esterilizante oxidante sobre el indicador de esterilización, aunque sin ralentizar el efecto del esterilizante oxidante sobre la carga en tratamiento en el proceso de esterilización. Como se ha indicado anteriormente, se pretende que la presente invención proporcione una mejor estimación de la eficacia del tratamiento de esterilización extendiendo el tiempo requerido para destruir todas las esporas de microorganismos en el indicador de esterilización, más lejos en el proceso de esterilización. Por tanto, la presente invención es capaz de compensar la rapidez con la que los esterilizantes oxidantes actúan sobre indicadores de esterilización convencionales, y por tanto mejorar sobre ellos.

20 Ejemplos

En los siguientes ejemplos se proporcionan resultados de ensayo usando ambas de estas sustancias químicas en la resuspensión de esporas para uso en indicadores biológicos.

25 Ejemplo 1:

Esporas de *Geobacillus stearothermophilus* resuspendidas en ferrocianuro de potasio

30 Se resuspenden esporas de *Geobacillus stearothermophilus* en concentraciones de ferrocianuro de potasio que varían desde 0,5 µg/ml a 200 mg/ml en muestras que tienen una concentración de esporas de 1E8 por ml (1x10⁸ esporas por mililitro). Se inoculan viales IBAC con 20 µl (≈ 2 millones de esporas) de cada una de las suspensiones de muestra y se secan al aire al menos durante la noche. Los IBAC se tapan después y se corren en un recipiente VHP BIER durante los tiempos mostrados en la tabla 1, a continuación, usando inyección de 0,8 g de peróxido de hidrógeno al 59%. La tabla 1 muestra los resultados de crecimiento para las muestras ensayadas. La comparación de los resultados de crecimiento de los IBAC que contienen aditivos con los controles demuestra que los aditivos han aumentado significativamente la resistencia del sistema de indicador biológico.

Tabla 1: Resultados de crecimiento con ferrocianuro de potasio

Muestra		Tiempo de exposición (min)		
		0,75	1	16
		Muestras destruidas/totales		
Control (sin aditivo)		20/40	21/38	19/19
Ferrocianuro de potasio (K ₃ [Fe(CN) ₆])	200 mg/ml	0/10	0/10	0/10
	25 mg/ml	0/10	0/10	0/10
	15 mg/ml	-	-	0/10
	5 mg/ml	-	-	0/10
	100 µg/ml	-	-	5/10*
	10 µg/ml	-	-	9/10
	5 µg/ml	0/10	3/10*	9/10
	1 µg/ml	0/10	2/10*	8/10*
	0,5 µg/ml	0/10	3/10*	7/10*

40 * NOTA: Los valores individuales en los resultados descritos pueden variar ligeramente arriba o abajo, pero se muestra una tendencia global que indica que según aumenta la concentración de ferrocianuro de potasio, el número de supervivientes también aumenta.

45 Como se puede ver en los datos en la tabla 1, la mitad o más de las esporas indicadoras se destruyen en el grupo control en tan poco como 0,75 minutos, y después de 16 minutos no hay supervivientes en absoluto. Sin embargo, con tan poco como 100 µg/ml del ferrocianuro añadido la mitad de las esporas expuestas sobreviven los 16 minutos de exposición enteros. Correspondientemente, se requiere menos (de 0,5 a 5 µg/ml) para reducir la tasa de destrucción observada para el grupo control a 1 minuto de exposición (21/38) a menos del 50%. Cualquiera de las cantidades ensayadas de ferrocianuro es suficiente para eliminar toda la destrucción de esporas a 0,75 minutos incluso aunque la mitad se destruyen en el grupo no tratado con ferrocianuro.

50 Ejemplo 2:

Esporas de *Geobacillus stearothermophilus* resuspendidas en azul de Prusia

5 Se resuspenden esporas de *Geobacillus stearothermophilus* en concentraciones de azul de Prusia que varían desde 0,5 µg/ml a 123 mg/ml a una concentración de esporas de 1E8 por ml. Se inoculan viales IBAC con 20 µl (≈ 2 millones de esporas) de la suspensión apropiada y se secan al aire al menos durante la noche. Los IBAC se tapan después y se corren en un recipiente VHP BIER durante los tiempos enumerados a continuación, usando inyección de 0,8 g de peróxido de hidrógeno al 59%. La tabla 2 muestra los resultados de crecimiento para las muestras ensayadas. La comparación de los resultados de crecimiento de los IBAC que contienen aditivos con los controles demuestra que los aditivos han aumentado significativamente la resistencia del sistema de indicador biológico.

Tabla 2: Resultados de crecimiento con azul de Prusia

Muestra		Tiempo de exposición (min)		
		0,75	1	16
		Muestras destruidas/totales		
Control (sin aditivo)		20/40	21/38	19/19
Azul de Prusia (Fe ₇ (CN) ₁₈)	123 mg/ml	0/10	0/10	0/10
	25 mg/ml	0/10	0/10	0/10
	15 mg/ml	-	-	0/10
	5 mg/ml	-	-	0/10
	100 µg/ml	-	-	8/10
	10 µg/ml	-	-	8/10
	5 µg/ml	0/10	3/10	7/10*
	1 µg/ml	0/10	1/10*	6/10*
	0,5 µg/ml	0/10	2/10*	10/10

* NOTA: Los valores individuales pueden variar ligeramente arriba o abajo, pero se muestra una tendencia global que indica que según aumenta la concentración de azul de Prusia, el número de supervivientes también aumenta.

15 Como se puede ver de la tabla 2, se obtienen resultados comparables para azul de Prusia comparados con los resultados obtenidos para ferrocianuro de potasio (Tabla 1), lo que indica que estos compuestos que contienen hierro son eficaces para retrasar la tasa de destrucción de peróxido de hidrógeno vaporoso y por tanto extender la supervivencia (y la capacidad de las esporas tratadas para seguir los rendimientos) mucho más lejos en ciclos de peróxido de hidrógeno estándar.

20 Los dos agentes ejemplificados anteriormente (ferrocianuro de potasio y azul de Prusia, aunque preferidos, no son los únicos compuestos que se pueden usar para degradar esterilizantes oxidantes.

25 Una ventaja importante de la presente invención es la capacidad de “adaptar” o “ajustar” la resistencia de un indicador biológico a esterilizantes oxidantes cambiando solo la concentración de los aditivos en la solución usada para resuspender las esporas. Esto elimina la necesidad para múltiples métodos de esporulación requeridos para alcanzar diferentes características/perfiles de resistencia de esporas o diferentes moldes para cambiar físicamente las características de resistencia de los envases IBAC. En la presente invención se usan aditivos químicos biocompatibles que descomponen el esterilizante oxidante a subcomponentes que son no reactivos hacia las esporas para aumentar, alargar y modificar la resistencia de un indicador biológico. Debido a que estas modificaciones son dependientes de la concentración, esto proporciona un control sin precedentes de cultivos de esporas tras la propagación que se pueden usar a lo largo de una amplia gama de condiciones de ciclo esterilizante oxidante.

35

REIVINDICACIONES

1. Un indicador de esterilización para esterilizantes oxidantes, que comprende:
 - 5 un primer compartimento que comprende esporas de una o más especies de microorganismos; un segundo compartimento que comprende un medio de crecimiento y configurado para contener los contenidos combinados del primer compartimento y del segundo compartimento para la incubación después de que el indicador de esterilización se haya expuesto a un esterilizante oxidante; y un agente dispuesto en el medio de crecimiento y seleccionado para indicar viabilidad de las esporas después de que el indicador de esterilización se haya expuesto al esterilizador oxidante,
 - 10 **caracterizado en que** las esporas en el primer compartimento se han pretratado con un compuesto que comprende un metal de transición que es reactivo con un esterilizante oxidante y las esporas comprenden el ion del metal de transición.
- 15 2. El indicador de esterilización de la reivindicación 1 **caracterizado en que** la una o más especies de microorganismos comprende una o ambas de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*.
3. El indicador de esterilización de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 **caracterizado en que** el agente indica viabilidad de las esporas por medio de uno o más de un cambio de color, o producción de fluorescencia en presencia de esporas viables.
- 20 4. El indicador de esterilización de la reivindicación 3 **caracterizado en que** el agente es un indicador de pH.
5. El indicador de esterilización de la reivindicación 4 **caracterizado en que** el indicador de pH comprende verde brillante, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, rojo de cresol, azul de metileno, rojo neutro, rojo fenol, resazurina o azul de timol.
- 25 6. El indicador de esterilización de la reivindicación 3 **caracterizado en que** el agente es un indicador de fluorescencia.
- 30 7. El indicador de esterilización de la reivindicación 6 **caracterizado en que** el indicador de fluorescencia es una proteína fluorescente que cambia de color.
8. El indicador de esterilización de la reivindicación 1 **caracterizado en que** el agente comprende al menos dos electrodos adaptados para proporcionar una señal eléctrica detectable.
- 35 9. El indicador de esterilización de la reivindicación 3 **caracterizado en que** el agente comprende una sal de tetrazolio.
- 40 10. El indicador de esterilización de cualquier reivindicación precedente **caracterizado en que** el ion de metal de transición comprende uno o más de hierro, cobre, manganeso, titanio, cinc, vanadio, plata, platino, níquel, molibdeno, cobalto y cromo.
- 45 11. El indicador de esterilización de la reivindicación 8 **caracterizado en que** el ion de metal de transición es hierro en $K_3[Fe(CN)_6]$ o $Fe_7(CN)_{18}$.
12. Un proceso para determinar la eficacia de un proceso de esterilización que utiliza esterilizantes oxidantes, que comprende:
 - 50 proporcionar un indicador de esterilización según cualquier reivindicación precedente; exponer el indicador de esterilización y uno o más artículos que se van a esterilizar a un esterilizante oxidante; y determinar por inspección del medio de crecimiento incubado si la esterilización fue eficaz.
- 55 13. El proceso de la reivindicación 12 **caracterizado en que** el esterilizante oxidante comprende uno o más de peróxido de hidrógeno, óxido de etileno y ozono.