

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 897**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/52** (2006.01)

**C12Q 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2014 PCT/US2014/017907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149382**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014 E 14709494 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2972334**

54 Título: **Método basado en enzimas acopladas para el seguimiento electrónico de un indicador biológico**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201313832158**

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

**16.08.2017**

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 2 629 897 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

Método basado en enzimas acopladas para el seguimiento electrónico de un indicador biológico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a indicadores biológicos para probar la eficacia de procesos de esterilización, más específicamente, a métodos basados en enzimas acopladas para el seguimiento de tales indicadores biológicos, en los que tal seguimiento se puede llevar a cabo de forma electrónica.

10

**Antecedentes**

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

15

20

Los indicadores biológicos típicamente consisten en microorganismos inoculados sobre un material soporte. 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 soporte se coloca en un ciclo de esterilización junto con la carga de dispositivos médicos. Después de la terminación del ciclo, el indicador biológico se incuba y se sigue el crecimiento hasta siete días. El crecimiento de un indicador biológico indica que el proceso de esterilización no era adecuado para obtener la esterilización completa y que la carga de dispositivos médicos necesita ser reprocesada antes del uso. La falta de 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 certeza de que la carga de dispositivos médicos es estéril. Desafortunadamente, muchos dispositivos médicos se usan realmente antes de que el usuario sepa los resultados de la incubación completa. Por tanto, hay una necesidad en el marco hospitalario para la detección de esporas de indicador biológico viables en germinación, en el menor tiempo posible.

25

30

Históricamente, la detección de indicadores biológicos viables dependía de medios de detección visuales. El crecimiento y multiplicación de organismos viables se puede ver/detectar como se evidencia por turbidez en el medio de crecimiento. Se pueden necesitar días para que esta turbidez sea perceptible. Otro medio de detección visual y más común es con un indicador de pH colorimétrico. Según los organismos viables empiezan a metabolizar y agotar las fuentes de nutrientes tal como los azúcares que se proporcionan en el medio de crecimiento, excretan productos de desecho ácidos. Según se acumulan estos productos de desecho ácidos en el medio de crecimiento, el pH del sistema disminuye produciendo un cambio de color del medio de crecimiento si está presente un indicador de pH. La detección mediante este medio habitualmente lleva 18-48 horas.

35

40

Más recientemente, se ha usado fluorescencia para detectar la actividad de enzimas que se producen por los organismos de interés añadiendo un sustrato enzimático fluorogénico al medio de crecimiento. Esta metodología más nueva disminuye el tiempo de incubación de días a horas. Sin embargo, la principal limitación para reducir el tiempo de incubación más allá de lo visto para la metodología de fluorescencia es la fluorescencia de fondo inherente que se produce de forma natural con muchos componentes del indicador biológico incluyendo los viales plásticos y medio de crecimiento. Las señales detectables, auténticas, deben ser lo suficientemente altas como para ser distinguibles sobre esta fluorescencia de fondo nativa inherente. Por tanto, para aumentar la sensibilidad del sistema, se necesita o bien reducir la fluorescencia de fondo (ruido) o cambiarse a una tecnología diferente que tenga mayor sensibilidad (señal).

45

50

Por tanto, en el estado de la técnica y la técnica actual, los indicadores biológicos dependen de medios colorimétricos o fluorométricos para determinar la viabilidad. La detección está limitada por la necesidad de que las señales generadas, sean colorimétricas o fluorimétricas, estén por encima de niveles de fondo sustanciales. Esto ha producido tiempos de detección para organismos viables en el orden de horas a días para que se acumule una señal suficiente que sea detectable por encima de los niveles de fondo. Sería beneficioso tanto para hospitales como para pacientes que el tiempo de detección de organismos viables en indicadores biológicos fuera del orden de minutos o menos.

55

60

El documento WO 2008/082728 A2 divulga indicadores de esterilización que comprenden el seguimiento de actividad enzimática detectando el producto modificado por enzima, por ejemplo, métodos fotométricos o conductométricos y el uso de un medio de incubación sin glucosa. El documento WO 2012/012055 A2 divulga un indicador de esterilización que comprende esporas, medio de incubación sin glucosa y electrodos para detectar el potencial de membrana de esporas vivas después del proceso de esterilización.

65

## Compendio

Uno de tales métodos que permite el control sobre la relación de señal respecto a ruido es la detección eléctrica. El seguimiento de cambios en las propiedades eléctricas de sistemas es un medio sensible para seguir otros cambios en ese sistema. Las potencias eléctricas resultantes se pueden después acondicionar por circuitos electrónicos apropiados para proporcionar señales amplificadas y filtradas que son directamente proporcionales al reactivo que las genera.

La presente invención proporciona una detección rápida de microorganismos viables de un indicador biológico usando un método de detección electrónica basado en enzimas acopladas para detectar la acumulación de azúcares sencillos (monosacáridos) tal como glucosa, resultantes de la degradación enzimática de azúcares complejos (disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos). Se indica que el término "azúcar" se usa en el presente documento de forma intercambiable con "sacárido". El sistema basado en enzimas acopladas de la presente invención incluye una combinación de al menos una glucosidasa natural presente en una espora viable y una oxidasa; o la combinación de al menos una glucosidasa natural presente en una espora viable y una deshidrogenasa. El medio de incubación o crecimiento proporcionado para las esporas tras la esterilización es con un azúcar complejo, tal como un disacárido, un oligosacárido y/o un polisacárido, pero libre de un azúcar sencillo. La glucosidasa reacciona con el azúcar complejo añadido al medio de crecimiento y lo degrada a los azúcares sencillos, incluyendo, por ejemplo, al menos una glucosa. Sobre el producto azúcar sencillo actúa bien una oxidasa o deshidrogenasa que produce una transferencia de electrones como parte de su acción sobre el azúcar sencillo. La cantidad de la transferencia de electrones es proporcional a la cantidad del azúcar sencillo producido por esporas viables. La transferencia de electrones libres se puede seguir y medir de forma electrónica. Si el seguimiento electrónico detecta transferencia de electrones, significa que al menos algunas esporas son viables y han sobrevivido el proceso de esterilización, y así muestra que la esterilización no fue eficaz. La enzima puede ser una usada en dispositivos estándar de seguimiento de la glucosa en sangre del estado de la técnica, y de hecho, dispositivos conocidos de seguimiento de glucosa en sangre del estado de la técnica se pueden adaptar fácilmente para uso en determinar la presencia de cualquier glucosa o azúcar sencillo en el medio combinado. Por tanto, la presente invención permite la determinación de la eficacia del proceso de esterilización por un método muy específico, muy sensible que se puede llevar a cabo sencillamente y medido de forma electrónica, usando dispositivos estándar del estado de la técnica, diseñados para uso en seguir los niveles de glucosa en sangre en pacientes diabéticos.

Por tanto, en una forma de realización, la presente invención se refiere a un sistema indicador de esterilización, que incluye:

un vial que incluye:

un primer compartimento que incluye esporas de una o más especies de microorganismo;

un segundo compartimento que incluye un medio de crecimiento que incluye uno o más de un disacárido, oligosacárido o un polisacárido capaz de conversión a un monosacárido por las células que germinan de la una o más especies de microorganismo, y

en donde el vial está libre del monosacárido y está adaptado para combinar los contenidos del primer compartimento con los contenidos del segundo compartimento para la incubación después de que el vial se haya expuesto a un esterilizante;

una enzima capaz de actuar sobre el monosacárido y producir una transferencia de electrones, dispuesta en al menos dos electrodos adaptados para transportar una señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando la enzima actúa sobre el monosacárido, en donde los al menos dos electrodos están colocados para entrar en contacto con los contenidos combinados del primer compartimento y el segundo compartimento durante y/o después de la incubación; y

un aparato enlazado o enlazable a los al menos dos electrodos y adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando la enzima actúa sobre el monosacárido.

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

En una forma de realización, el disacárido es maltosa y el monosacárido es glucosa.

En una forma de realización el disacárido es maltosa que se convierte a glucosa por una glucosidasa producida por o presente en las células que germinan durante la incubación de los contenidos combinados del primer compartimento y del segundo compartimento.

En una forma de realización, la enzima se proporciona junto con uno o más mediadores. En una forma de realización, el uno o más mediadores comprende uno o una mezcla de dos o más de ferroceno, vinilferroceno, 1,1'-dimetilferroceno, carboxiferroceno, 1,1'-dicarboxiferroceno, (dimetilamino)metilferroceno o ferrocianuro.

En una forma de realización, los al menos dos electrodos comprenden grafito, grafeno, carbono, nanotubos de carbono, oro, platino, paladio, plata, níquel o cobre o una combinación o aleación de cualesquiera dos o más de los mismos.

En una forma de realización, la enzima es glucosa oxidasa.

En una forma de realización, la enzima es glucosa deshidrogenasa.

5 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método para determinar la eficacia de un proceso de esterilización, que incluye:

proporcionar el sistema indicador de esterilización como se ha descrito anteriormente;  
exponer el indicador de esterilización a un proceso de esterilización que se pretende que destruya las esporas de las  
10 una o más especies de microorganismo;  
combinar los contenidos del primer compartimento y el segundo compartimento;  
exponer los contenidos combinados a la enzima dispuesta en los dos o más electrodos al tiempo que se incuban los  
contenidos combinados;  
15 con el aparato unido a los electrodos, detectar y medir cualquier señal eléctrica resultante de la transferencia de  
electrones cuando la enzima actúa sobre el monosacárido; y  
determinar si el proceso de esterilización fue eficaz.

Por tanto, la presente invención proporciona una solución elegante y sencilla al problema de determinar rápidamente  
20 la eficacia de un proceso de esterilización, y proporciona un aparato adaptado para tal uso.

### **Breve descripción de las figuras**

La presente invención puede ser útil con una variedad de aparatos indicadores de esterilización. Se pretende que los  
25 dibujos adjuntos proporcionen una representación ejemplar, no limitante de un aparato de esterilización adecuado y  
que demuestren el proceso divulgado, para el fin de proporcionar un mejor entendimiento de la invención, y no se  
pretende que sean limitantes en modo alguno. En los dibujos adjuntos, las partes y características similares pueden  
tener referencias similares.

La figura 1 es una vista transversal esquemática de una primera forma de realización de un indicador de  
30 esterilización adecuado para uso con formas de realización de la presente invención, en una configuración  
preactivada.

La figura 2 es una vista transversal esquemática del indicador de esterilización de la figura 1 en una configuración  
35 activada.

La figura 3 es una vista transversal esquemática de una segunda forma de realización de un indicador de  
esterilización adecuado para uso con formas de realización de la presente invención, en una configuración  
preactivada, similar a la de la figura 1.

La figura 4 es una representación esquemática de una tira electroconductora que contiene tres electrodos  
40 adecuados para uso en una forma de realización de la presente invención.

La figura 5 es una representación esquemática de un incubador/lector de prueba para uso en una forma de  
45 realización de la presente invención.

La figura 6 es una vista transversal esquemática de una forma de realización de un indicador de esterilización  
durante la incubación con una tira electroconductora similar a la de la figura 4 insertada en los contenidos  
combinados del primer y segundo compartimentos, en un incubador/lector de prueba según la presente invención.

Las figuras 7a y 7b son esquemas de reacción que muestran enzimas inmovilizadas en electrodos y una reacción  
50 ejemplar de dos enzimas sobre el azúcar sencillo glucosa.

La figura 8 es una representación esquemática del diseño de un dispositivo de seguimiento de glucosa para uso con  
55 formas de realización de la presente invención.

La figura 9 es una representación esquemática de un dispositivo para recibir la señal producida por una enzima en  
un electrodo, convirtiéndola a una señal digital y transfiriéndola a un microcontrolador.

La figura 10 es un gráfico de barras que muestra los efectos de la concentración de esporas y la concentración de  
60 maltosa en la cantidad de glucosa generada a lo largo del tiempo por una enzima en esporas que germinan de  
*Geobacillus stearothermophilus*.

La figura 11 es un gráfico que muestra los cambios en la señal de fondo medida a lo largo de periodos de incubación  
65 para cada una de cuatro concentraciones de TSB sin glucosa sin organismos viables presentes.

La figura 12 es un gráfico que muestra una comparación entre la señal medida cuando las esporas sobreviven el proceso de esterilización con la señal medida cuando las esporas no sobreviven el proceso de esterilización.

5 Se debe apreciar que por simplicidad y claridad de ilustración, los elementos mostrados en las figuras no se han dibujado necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos elementos pueden estar exageradas unas relativas a otras por claridad. Además, donde se consideró apropiado, los números de referencia se han repetido entre las figuras para indicar elementos correspondientes.

10 Además, se debe apreciar que los pasos y estructuras de proceso descritos posteriormente pueden no formar un flujo de proceso completo para producir un indicador de esterilización utilizable final. La presente invención se puede practicar junto con aparatos y técnicas de procesamiento actualmente usados en la técnica, y solo se incluyen tantos de los pasos de proceso comúnmente practicados como sean necesarios para un entendimiento de la presente invención.

### 15 Descripción detallada

20 Los indicadores biológicos actualmente descritos dependen de un mecanismo diferente para detectar viabilidad de esporas. La invención descrita aquí utiliza una señal electrónica que se genera basada en la acumulación del azúcar sencillo glucosa resultante de la capacidad de organismos viables de degradar azúcares complejos. Los métodos de detección electrónica basados en azúcares han estado fácilmente disponibles durante años para seguir los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos. Hasta ahora, sin embargo, estos mecanismos de detección electrónica no se han usado como un medio para detectar organismos viables después de procesos de esterilización.

25 La mayoría de los organismos tienen capacidades inherentes para degradar azúcares complejos (tal como maltosa) a azúcares sencillos (tal como glucosa) para que la molécula de azúcar sencillo, por ejemplo, glucosa, más útil se pueda utilizar como una fuente de energía por el organismo. El seguimiento de glucosa mediante métodos de detección electrónica ha estado fácilmente disponible durante años para seguir los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos. Las mismas reacciones básicas utilizadas en el seguimiento de los niveles de glucosa en sangre se pueden adaptar para detectar organismos viables, tal como esporas, que pueden sobrevivir un ciclo de esterilización. En la presente invención, los mismos monitores electrónicos de glucosa se pueden adaptar para uso en el seguimiento de la eficacia de procesos de esterilización. A diferencia del seguimiento de la glucosa en sangre, donde la glucosa es prevalente y se mide directamente, en la presente invención la glucosa se obtiene de una molécula de hidrato de carbono compleja indetectable sobre la que primero debe actuar un organismo viable antes de que la glucosa se libere y se pueda detectar. Por tanto, en la presente invención, el azúcar sencillo, habitualmente glucosa, nunca está presente a menos y hasta que un microorganismo viable que ha sobrevivido las condiciones de esterilización que se siguen degrade un hidrato de carbono complejo para formar el azúcar sencillo. Además, se espera que las concentraciones relevantes de glucosa u otro azúcar sencillo sean mucho menores en el medio combinado de la presente invención que en las determinaciones de glucosa en sangre. Mientras que la glucosa en sangre generalmente tiene una concentración en el intervalo desde aproximadamente 2 mM hasta aproximadamente 30 mM, la presente invención es capaz de detectar concentraciones de azúcar sencillo que varían desde solo por encima de los límites mínimos de detección del dispositivo hasta las mismas concentraciones de glucosa que se encuentran en la sangre. Sin embargo, en un indicador de esterilización, tras la esterilización, se espera que casi todas las esporas se hayan destruido y así la concentración de los azúcares sencillos, si hay alguno, se espera que esté y está en el intervalo desde justo por encima de los límites de detección mínimos del dispositivo hasta 0,1 mM, y en otra forma de realización, hasta aproximadamente 0,01 mM, y en otra forma de realización, hasta aproximadamente 0,001 mM.

50 A medida que las esporas viables empiezan a germinar (una actividad vital fundamental) producen y liberan enzimas que las permiten degradar los azúcares complejos a azúcares sencillos más fácilmente utilizables, tal como glucosa. Al formular un medio que es alto en azúcares complejos (seleccionados en base a que pueden ser degradados por las enzimas activas de los organismo de prueba en germinación, que sobreviven seleccionados para el indicador de esterilización) se esperaría un aumento en azúcar sencillo, por ejemplo, glucosa, tras exponer esporas viables a este medio y esta concentración creciente del azúcar sencillo en el medio de crecimiento se puede detectar cuando está en presencia de una segunda enzima, tal como glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa. En las condiciones de esterilización, se pretende que todas las esporas se destruyan y cualquier enzima que las esporas puedan ya poseer también se destruirán. Por tanto, un aumento en el azúcar sencillo detectado después de la exposición de estas esporas al medio de esta invención confirma que los organismos son viables y germinan (prueba de vida). La conversión mediada por esporas de los azúcares complejos a azúcares sencillos representa el primer paso en el proceso de enzimas acopladas de la presente invención.

60 Los organismos de mayor interés para seguir los procesos de esterilización son *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*. *Geobacillus stearothermophilus* produce la enzima alfa-glucosidasa (por ejemplo) que degrada el azúcar complejo maltosa en dos moléculas de glucosa. Esto ejemplifica solo un medio para alcanzar el primer paso en el sistema basado en enzimas acopladas.

Después en el segundo paso, se puede actuar sobre la glucosa después por la glucosa oxidasa (por ejemplo) que producirá entonces ácido glucónico, peróxido de hidrógeno y electrones libres. Los electrones libres producidos por la enzima se siguen electrónicamente. Se puede añadir un mediador para acelerar la transferencia de electrones a un electrodo, para aumentar más la señal. Esto ejemplifica solo un medio para alcanzar el segundo paso en el sistema basado en enzimas acopladas. En otra forma de realización, en el segundo paso, la enzima usada es glucosa deshidrogenasa, que produce glucono-delta-lactona y NADH a partir de glucosa y NAD, que también implica una transferencia de electrones que se puede detectar de forma electrónica.

Por tanto, el segundo paso en el proceso es dependiente del primer paso en el proceso y se dice que está acoplado. La falta para alcanzar la producción del producto final del primer paso (como será el caso si todas las esporas están destruidas) previene el inicio del segundo paso. Así, en ausencia de cualquier producto de la primera reacción (por ejemplo, glucosa convertida a partir de maltosa), no se pueden transferir electrones en el segundo paso acoplado y no se producirá o se observa señal. En este caso, la ausencia de cualquier señal derivada de la transferencia de electrones significaría que la esterilización seguida tuvo éxito.

Los ejemplos de disacáridos adecuados son maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, e isomaltosa.

Los ejemplos de oligosacáridos adecuados son fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, manan-oligosacáridos, goma arábiga, goma guar e hidrolizado de guar.

Los ejemplos de polisacáridos adecuados son almidón, dextrina, glucógeno, celulosa y pectina. Otros polisacáridos posiblemente adecuados incluyen gellan, goma ghatti, karaya, tragacanto, semilla de psyllium, xantana, guar, manano de nuez de tagua, konjac, goma garrofín, tamarindo, tara, carragenanos, alginatos, fucoidanos, laminarina, agar, pululano, goma welan y escleroglucano.

Otros disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos adecuados los pueden conocer los expertos en la materia, y también pueden ser útiles con la presente invención.

Las siguientes reacciones ejemplares muestran el acoplamiento de la enzima natural en cualquier célula en germinación que sobrevive al proceso de esterilización y la enzima añadida al medio de incubación/recuperación (o predepositada en los electrodos mismos) según una forma de realización de la presente invención:



Cuando se aplica un diferencial de voltaje a través de un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, el electrodo de trabajo se polariza y se produce una corriente oxidante resultante de la transferencia de electrones. Esta corriente oxidante se puede medir y es proporcional a la cantidad de glucosa presente en el sistema. Por tanto, en la presente invención, la transferencia de electrones en el segundo paso constituye la corriente, si hay alguna, que se mide.

En una forma de realización, la enzima en la segunda reacción acoplada se proporciona junto con uno o más mediadores. En una forma de realización, el uno o más mediadores comprende uno o una mezcla de dos o más de ferroceno, vinilferroceno, 1,1'-dimetilferroceno, carboxiferroceno, 1,1'-dicarboxiferroceno, (dimetilamino)metilferroceno o un ferrocianuro. Se pueden usar otros mediadores adecuados, tal como los conocidos en las técnicas de seguimiento de glucosa en sangre, como entenderá el experto en la materia.

En una forma de realización, los al menos dos electrodos comprenden grafito, grafeno, carbono, nanotubos de carbono, oro, platino, paladio, plata, níquel o cobre o una combinación o aleación de cualesquiera dos o más de los mismos. Se pueden usar otros materiales de electrodo adecuados, conocidos en las técnicas de seguimiento de glucosa en sangre, como entenderá el experto en la materia.

Con referencia ahora a las figuras, las figuras 1 y 2 muestran un sistema indicador de esterilización 10 útil con una primera forma de realización ejemplar de la presente invención. El sistema indicador 10 comprende una tapa 20 que es acoplable en un envase 30. El envase 30 incluye un extremo inferior, cerrado 31 y un extremo superior abierto, y define un espacio interior 34. La tapa 20 tiene una pared exterior 22, un extremo inferior abierto y un extremo superior cerrado 23. La tapa también incluye una pared (o paredes) interna 24 dispuesta en el interior de la pared externa de la tapa, que forma una pared separada, y define una cámara interna 26. La cámara interna 26 incluye una abertura 25 adyacente al extremo inferior de la(s) pared(es) 24. La cámara 26 contiene un fluido 50, y la tapa 20

incluye una barrera rompible 40 dispuesta alrededor de la abertura 25 de la cámara 26 para encapsular el fluido 50 en la cámara 26.

5 En la forma de realización ilustrada en las figuras 1 y 2, el sistema indicador está configurado por la tapa 20 que se va a acoplar sobre el envase 30 en una relación de presilla. En otras formas de realización, no mostradas, el sistema indicador puede estar configurado para que la tapa se acople en el envase en una relación roscada en la que la tapa se engarza con el envase por roscas y el sistema se activa girando la tapa con respecto al envase, es decir, atornillando la tapa más sobre el envase. Como se muestra en las figuras 1 y 2, el envase 30 incluye una proyección anular 32 que forma un borde o labio adyacente o cerca del extremo superior del envase. La tapa 20 incluye una proyección anular 29 que forma un borde o labio adyacente a la parte inferior de la tapa. La tapa 20 se puede acoplar sobre el envase 30 deslizando el borde 29 de la tapa sobre el borde 32 del envase. El borde 32 del envase 30 engarza el borde 29 en la tapa 20 para prevenir que la tapa 20 y el envase 30 se desacoplen. La tapa 20 y el envase 30 pueden tener tamaños de tal forma que el borde 32 ejerce una cantidad suficiente de presión contra la tapa 20 para prevenir que la tapa 20 se deslice hacia abajo sin aplicar una fuerza externa hacia abajo a la tapa 20. De esta manera, la barrera rompible 40 se puede mantener separada de los bordes 38 de los miembros de punción 36 de modo que la barrera rompible 40 no entra en contacto y/o no se rompe por los miembros de punción hasta el momento que se desee activar el indicador.

20 Como se muestra en las figuras 1 y 2, el envase 30 está adaptado para romper la barrera rompible 40. Los envases incluyen una o más proyecciones 36 (que también se pueden denominar en el presente documento "miembros de punción") que tienen un borde 38 adaptado para romper o perforar la barrera rompible 40 cuando la tapa 20 con la barrera rompible 40 se mueve hacia abajo y la barrera 40 entre en contacto con el borde 38 de la proyección 36. El miembro de punción 36 se muestra como que es integral con y se extiende hacia arriba desde la pared inferior, interna 37 del envase. En otra forma de realización, no mostrada, los miembros de punción 36 se pueden extender tanto desde la pared lateral 35 como desde la pared interior, inferior 37.

30 Para evaluar el proceso de esterilización, se dispone una concentración calibrada de microorganismos en el interior 34 del envase 30. Los microorganismos se pueden disponer directamente en las paredes 35 del envase o se pueden proporcionar en un miembro de soporte (por ejemplo, miembro de soporte 70) que está dispuesto en el envase 30. El indicador de esterilización se ensambla después acoplado la tapa llena con medio de recuperación 20 sobre el envase 30. La tapa 20 se puede acoplar encajando con presillas la tapa 20 en el envase 30 como se ha descrito anteriormente, o, por ejemplo, por un montaje roscado. Con referencia a la figura 1, la tapa llena de medio de recuperación 20 se acopla en el envase 30 en una primera posición, no activada (o abierta) de modo que la barrera rompible 40 permanezca intacta y no es perforada por los miembros de punción 36. Deseablemente, en la primera posición, no activada, la barrera rompible 40 está colocada lejos de y no en contacto con los bordes 38 de los miembros de punción 36.

40 Con el indicador 10 ensamblado tal como se muestra en la figura 1, el indicador de esterilización se puede someter después a un proceso de esterilización. Se muestra que la tapa 20 tiene aperturas 28 a través de las que un vapor esterilizante puede entrar y fluir en el sistema indicador. El esterilizante entra en la tapa a través de las aperturas 28 (en el espacio entre la pared externa 22 y la pared interna 24) y fluye en el envase 30 a través de un espacio 60 definido entre la superficie exterior de la pared interna 24 en la tapa 20 y la superficie interna de la pared 35 en el envase 30. El vapor esterilizante fluye en el envase 30 y actúa sobre los microorganismos del indicador biológico.

45 Después de completar el proceso de esterilización, el indicador de esterilización se puede activar moviendo la tapa 20 hacia abajo hacia en envase 30 a una segunda posición (o cerrada o activada), que se ilustra en la figura 2. La tapa 20 se mueve hacia abajo aplicando una fuerza o presión hacia abajo suficiente en la tapa 20. Según se mueve hacia abajo la tapa 20, la barrera rompible 40 se pone en contacto con el borde 38 del miembro de punción 36, y finalmente se mueve a una posición de modo que el borde 38 del miembro de punción 36 perfora o penetra la barrera rompible 40. Cuando la barrera rompible 40 se perfora, la abertura 25 de la cámara 26 se expone, y el medio de recuperación líquido 50 se vacía en la región interior 34 del envase 30 y en contacto con los microorganismos como se muestra en la figura 2.

55 Como se muestra en las figuras 1 y 2, en esta forma de realización, la superficie interna de la tapa 20 incluye una segunda proyección anular 27, y la tapa se puede mover hacia abajo a una posición tal que la parte superior de la proyección 27 engarza la parte inferior del borde 32 en el envase 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 envase 30, que puede prevenir que entren microorganismos adicionales en el sistema.

60 Se apreciará que, en otra forma de realización, la tapa 20 no incluye la segunda proyección 27 para mantener el envase en la posición cerrada. En una forma de realización alternativa, el envase 30 puede incluir otra proyección anular o un conjunto de fijadores (no mostrado) en el exterior del envase 30 y situados por debajo del borde 32, proyección o fijadores que se pueden adaptar para engranar el borde 29 en la tapa para mantener el envase 30 en una posición cerrada. La patente en EE UU No. 5.770.393 ilustra tal configuración, y esta patente se incorpora al presente documento mediante referencia por sus enseñanzas respecto a configuraciones de tapa y envase. En otra forma de realización alternativa, la superficie interna de la tapa 20 y la superficie externa del envase 30 pueden estar

5 enroscadas, y la tapa 20 se puede mover a y mantener en una posición cerrada atornillando la tapa 20 sobre el envase 30, en la que la tapa 20 se puede enroscar como se muestra, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 8.173.388 B2, que se puede consultar para detalles adicionales sobre esta forma de realización del vial, y que se incorpora por este medio al presente documento mediante referencia por sus enseñanzas respecto a la configuración de vial y tapa de esta y las anteriores formas de realización. Todas estas configuraciones alternativas están dentro del ámbito de la presente invención.

10 Como se ha descrito anteriormente, se muestra que la tapa 20 en la forma de realización ilustrada en las figuras 1 y 2 tiene la apertura 28 para permitir el acceso del esterilizante de vapor en el indicador. Sin embargo, se apreciará que la tapa no necesita estar provista de tal característica. El número, tamaño, forma y/o localización de la(s) apertura(s) se puede seleccionar según se desee, con consideración al esterilizante particular con el que el indicador de esterilización se va a usar. Por ejemplo, la localización, forma y tamaño de las aperturas en la tapa y/o el envase se pueden seleccionar para proporcionar una vía tortuosa para la entrada y salida del vapor de esterilización entre los microorganismos y los medios circundantes. La vía tortuosa también puede servir para inhibir o prevenir la contaminación de agentes externos, y para asegurarse que una cantidad adecuada de esterilizante está disponible. Al incluir la vía tortuosa, es más probable que la carga entera se exponga al esterilizante destruyendo de esta manera cualquier microorganismo existente antes de que el organismo de prueba en el indicador de esterilización se destruya.

20 Se pueden proporcionar aperturas en el envase además de o como una alternativa a proporcionar aperturas en la tapa. Si no se proporcionan aperturas en la tapa, la(s) pared(es) interna(s) no necesitan estar localizadas para proporcionar un espacio entre la pared interna de la tapa y la superficie interna del envase. Además, si se proporcionan aperturas en el envase, deben estar localizadas de modo que el medio de crecimiento no se pierda o derrame fuera a través de tales aperturas cuando el indicador se activa y la barrera se rompe.

25 La figura 3 representa un indicador 10 en el que se forma una apertura 80 en la pared lateral 35 del envase 30 en una posición apropiada, además de las aperturas 28 en la tapa 20. La apertura mostrada en la figura 3 está en la pared lateral 35 del envase 30 cerca de la parte superior del envase 30, en proximidad del borde 38 del miembro de punción 36, para evitar la fuga o derrame después de la activación. Como se puede ver de la figura 3, después de la activación, la apertura 80 en esta localización estará cubierta por la tapa 20 en la posición activada. Se indica que el indicador 10 mostrado en la figura 3 incluye la apertura 28 en la tapa 20, pero esto no es necesario. En una forma de realización (no mostrada), el envase 30 incluye la apertura 80 y se usa con una tapa similar a la tapa 20, pero que no incluye una apertura tal como la apertura 28. Por tanto, se puede proporcionar una apertura bien en la tapa o en el envase, o tanto en la tapa como el envase.

35 Después de que se haya completado el proceso de esterilización, la tapa 20 se presiona o enrosca hacia abajo de modo que el borde 38 del miembro de punción 36 penetra y rompe la barrera rompible 40 liberando el medio de crecimiento en el espacio 26 para mezclarlo con e incubar con cualquiera de los microorganismos del indicador biológico que puedan haber sobrevivido el proceso de esterilización. El medio de recuperación 50 puede comprender un medio acuoso o una solución acuosa que proporciona la germinación, metabolismo y posterior crecimiento de organismos según se requiera. El medio acuoso o solución acuosa puede estar tamponado.

40 El indicador de esterilización 10 se incuba después durante un periodo de tiempo suficiente para permitir determinar la viabilidad de los microorganismos. Durante la incubación, cualquier microorganismo viable empezará a germinar, y esta germinación incluye actividad por las enzimas para degradar el disacárido, oligosacárido y/o polisacárido para producir un monosacárido, por ejemplo, degradar maltosa para producir glucosa. Según la presente invención, el "subproducto" glucosa está entonces disponible para que actúe sobre ella la enzima que se proporciona para actuar sobre la glucosa en el segundo paso del sistema de enzimas acopladas, acción que incluye una transferencia de electrones, transferencia de electrones que se detecta a través de la señal eléctrica producida por los dos o más electrodos descritos en el presente documento.

45 En una forma de realización, los contenidos combinados de los dos compartimentos en el envase, con la tapa retirada, se insertan en un incubador, como se muestra y describe con respecto a la figura 6, que se discute a continuación, con una enzima inmovilizada en los electrodos, como se muestra y describe con respecto a las figuras 55 4 y 7, a continuación, donde se lleva a cabo la incubación y la detección de la señal. En otra forma de realización, los contenidos combinados se echan en una bandeja con los electrodos como se muestra y describe con respecto a las figuras 4 y 7 en el fondo de la bandeja, donde tiene lugar la incubación y la detección de la señal. En la forma de realización actualmente más preferida, los contenidos combinados se introducen en un dispositivo de detección de glucosa sustancialmente similar, pero con modificaciones apropiadas, a los bien conocidos para uso en el seguimiento de glucosa en sangre.

60 La figura 4 es una representación esquemática de una tira electroconductora 400 que contiene tres electrodos 402a, 402b y 402c adecuados para uso en una forma de realización de la presente invención. La tira 400 incluye además componentes electrónicos 404 adaptados para proporcionar comunicación eléctrica entre los electrodos 402a, 402b y 402c, y un aparato enlazado o enlazable a los electrodos que está adaptado para detectar y medir las señales eléctricas resultantes de la transferencia de electrones cuando la enzima en los electrodos actúa sobre cualquier

glucosa presente. Como se divulga y describe, uno o más de los electrodos 402a, 402b y 402c tienen unida una enzima capaz de actuar sobre un azúcar sencillo, tal como glucosa, para producir una transferencia de electrones detectable. Como se ha descrito, los al menos dos electrodos, pueden incluir dos electrodos que participan en la transferencia de electrones, mientras que el tercer electrodo puede funcionar como un electrodo de referencia. Otras formas de realización, no mostradas, pueden incluir un número diferente de electrodos. Por ejemplo, el electrodo de referencia se puede omitir, o se puede añadir un electrodo o par de electrodos adicional. Los componentes electrónicos 404 pueden incluir cualquier conexión eléctrica apropiada entre los electrodos y un aparato externo que detecta y mide cualquier señal eléctrica generada. Tales conexiones pueden incluir, pero no están limitadas a, cableado (véase, por ejemplo, la figura 6), contactos eléctricos físicos, por ejemplo, con resorte o tomas, Ethernet, Bluetooth, 802.11, redes de áreas locales inalámbricas (WLAN), Wifi, WiMax y similares, o cualquier otro tipo de comunicación con cable o inalámbrico conocido en la técnica.

La figura 5 es una representación esquemática de un incubador/lector de prueba para uso en una forma de realización de la presente invención. El incubador/lector de prueba puede incluir conexiones eléctricas adecuadas para conectar los tres electrodos descritos con respecto a la figura 4. El incubador/lector de prueba puede incluir controles de calentamiento y atmósfera para proporcionar una temperatura y atmósfera adecuadas para la incubación de los contenidos combinados del primer compartimento y el segundo compartimento del indicador de esterilización. El incubador/lector de prueba puede incluir además circuitos electrónicos adaptados para detectar y medir cualquier señal eléctrica generada cuando la enzima proporcionada en los electrodos convierte un azúcar sencillo, por ejemplo, glucosa, en productos de reacción que incluyen electrones libres, según la presente invención. La figura 6 proporciona un ejemplo de una disposición adecuada para el incubador/lector de prueba representado en la figura 5.

La figura 6 es una vista transversal muy esquemática de un indicador de esterilización ejemplar durante la incubación en un incubador/lector de prueba ejemplar 600, con los electrodos con enzima inmovilizada en su sitio. El incubador/lector de prueba representado en la figura 6 incluye un envase inferior 602 y un tapón o tapa 604. Como se muestra en la figura 6, dispuesto en el incubador/lector de prueba 600 hay un vial indicador de esterilización 606, en el que el medio de recuperación/incubación 608 se ha combinado con organismos de prueba, por ejemplo, *Geobacillus stearothermophilus*, después de un proceso de esterilización que se somete a determinación de eficacia según una forma de realización de la presente invención. El incubador/lector de prueba 600 está equipado con una tira electroconductora 610, similar a la de la figura 4, que se ha insertado en los contenidos combinados del primer y segundo compartimentos en el envase 602, en el incubador/lector de prueba 600 según una forma de realización de la presente invención. El incubador/lector de prueba 600 incluye además conexiones eléctricas 612 entre los tres electrodos en la tira 610 y el circuito eléctrico usado para detectar cualquier actividad eléctrica generada por la conversión enzimática de los azúcares sencillos a sus productos de reacción. En la forma de realización ilustrada en la figura 6, la tira conductora está cableada. En otras formas de realización, la tira conductora se puede comunicar de forma inalámbrica como se describe con respecto a la figura 4.

Las figuras 7a y 7b son esquemas de reacción que muestran una enzima inmovilizada sobre un electrodo y una reacción ejemplar de dos enzimas sobre el azúcar sencillo glucosa. En las formas de realización tanto de la figura 7a como 7b, la enzima apropiada se inmoviliza en el electrodo. En la forma de realización de la figura 7a, la enzima es glucosa oxidasa, y en la forma de realización de la figura 7b, la enzima es glucosa deshidrogenasa. En ambas formas de realización, el sistema se proporcionan co-reactivos apropiados, por ejemplo, oxígeno y NAD, como se muestra. En ambas formas de realización, la acción de la enzima sobre glucosa (o en otras formas de realización, sobre el azúcar sencillo) produce una transferencia de electrones que se puede detectar electrónicamente.

La figura 8 es una representación esquemática del diseño de una tira de prueba ejemplar para un dispositivo de seguimiento de glucosa para uso con formas de realización de la presente invención. La tira de prueba incluye un área diana, una primera célula electroquímica y una segunda célula electroquímica, con una enzima mostrada entre las células electroquímicas. La enzima en la tira de prueba de la figura 8 sería la enzima que actúa en el azúcar sencillo para efectuar una transferencia de electrones que se pueda detectar electrónicamente como se describe en el presente documento. La tira de prueba incluye dos conjuntos de células electroquímicas. Las células pueden estar colocadas a menos de 500  $\mu\text{m}$  de distancia. Las células incluyen electrodos de trabajo y un contraelectrodo/electrodo de referencia. Si se usa un electrodo de referencia separado del contraelectrodo, se puede poner en una localización adecuada. La zona de la segunda célula electroquímica está situada intermedia a la zona de la primera célula y la zona diana. El líquido que contiene los contenidos combinados de los dos compartimentos del indicador de esterilización entra en contacto con la enzima en, o en ruta a, la primera célula electroquímica mientras el líquido que alcanza la segunda célula no entra en contacto con la enzima. Se aplica potencial entre ambos electrodos de trabajo y contraelectrodos, y se mide el cambio en corriente con el tiempo por separado para cada par. Esto permite la determinación de la concentración de transferencia de electrones inducida por la enzima. Por tanto, las dos células se exponen al mismo líquido, y por tanto controla para sustancias que interfieren, excepto que el líquido en la segunda célula muestra flujo de corriente adicional si el azúcar sencillo, por ejemplo, glucosa, estaba presente en los contenidos combinados y la enzima actuó sobre ella. La resta de un valor para el flujo de corriente del otro permite la determinación de la concentración del azúcar sencillo en los contenidos combinados de los dos compartimentos del indicador de esterilización. Si no hay diferencia, entonces no había azúcar sencillo

presente, y la esterilización se juzga exitosa. Si hay diferencia, entonces el azúcar sencillo estaba presente y la esterilización se juzga no exitosa.

La figura 9 es una representación esquemática de un dispositivo para recibir la señal producida por el electrodo reactivo, que la convierte a una señal digital y la transfiere a un microcontrolador. Como entenderá el experto en la materia, la señal diferencial obtenida del electrodo reactivo en la tira de prueba, modificada y medida por el amplificador de transimpedancia, se alimenta a un convertidor analógico a digital (ADC) y después a una unidad microcontroladora/microprocesadora (MCU/MPU), que a su vez genera los resultados a una pantalla mediante lo cual el usuario puede determinar el desenlace de la prueba, y si la esterilización tuvo éxito.

**Ejemplo 1**

Esporas en germinación de *Geobacillus stearothermophilus* a una población de E5, E6 y E7 esporas por reacción que contiene medio de crecimiento se siguen durante varias horas para fines ilustrativos usando un Analizador Bioquímico (YSI Instruments) usando un electrodo de glucosa. El medio de crecimiento consiste en caldo triptico de soja sin glucosa (TSB) a un 1/8 de la concentración estándar de TSB (para minimizar la interferencia de los componentes del medio), que contiene el azúcar complejo maltosa a una concentración de bien 8,5 g/l o 10,5 g/l. Se toman medidas de glucosa cada 60 minutos. Todas las muestras se normalizan respecto a la lectura inicial de glucosa del medio. Se hacen observaciones durante un periodo de tiempo extendido para medir la cinética global de la reacción para las condiciones seleccionadas. Los resultados se muestran en la figura 10, que muestra los efectos de la concentración de esporas y la concentración de maltosa en la cantidad de glucosa generada a lo largo del tiempo.

**Ejemplo 2**

Esporas de *Geobacillus stearothermophilus* a poblaciones de E5, E6 y E7 se evalúan para cómo de rápido se podría detectar la presencia de organismos viables por los niveles de glucosa producidos según los organismos viables en germinación de las esporas degradan el nivel seleccionado de maltosa en glucosa en varias formulaciones de medio. Los medios se formulan con concentraciones variables de caldo triptico de soja sin glucosa que varían desde 1/8 de la concentración estándar del TSB (caldo triptico de soja) sin glucosa a la concentración estándar completa mientras se mantiene la concentración de maltosa constante a 8,5 g/l. El TSB sin glucosa es una fuente de nutrientes general para bacterias y contiene digerido pancreático de caseína, digerido papaico de soja, y sales y tampones; por tanto, diluyéndolo se reduce eficazmente la cantidad de cualquier componente que interfiera presente en el medio. Las muestras de 'medio solo' se siguen a lo largo de todo el estudio para ver los efectos de las varias concentraciones de TSB en la señal de fondo. Todas las muestras se incuban a 56°C durante cuatro horas tomándose medidas cada 60 minutos. El medio de crecimiento del organismo se sigue monitorizando con un Analizador Bioquímico (YSI Instruments) y un electrodo de glucosa.

La figura 11 muestra los cambios en la señal de fondo relativa medida durante el periodo de incubación para cada una de las cuatro concentraciones de TSB sin organismos viables presentes. Los datos demuestran que la señal de fondo se reduce a concentraciones menores de TSB.

La tabla 1 a continuación muestra los datos normalizados tabulados medidos en muestras con *Geobacillus stearothermophilus* viable. Los datos se normalizan frente al fondo del medio respectivo para ese tiempo de incubación. Todos los valores en o por debajo del valor de uno no son distinguibles del fondo. Los datos normalizados demuestran que los niveles de detección necesarios se reducen cuando la señal de fondo está en su mínimo. A una concentración de TSB sin glucosa 1X, una población de E5 esporas no se puede detectar en 4 horas, mientras que una población de E5 esporas se puede detectar en 4 horas en un medio formulado con TSB sin glucosa 1/2X.

**Tabla 1: Detección de glucosa producida por esporas viables de *Geobacillus stearothermophilus* incubadas en varios medios**

Tiempo (min)	TSB 1X			TSB 1/2X			TSB 1/4X			TSB 1/8X		
	E5	E6	E7	E5	E6	E7	E5	E6	E7	E5	E6	E7
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	0,986	1,028	1,394	1	1,074	1,727	1	1,083	1,812	1,034	1,138	1,942
120	1	1,096	1,849	1,008	1,179	2,634	1,010	1,273	3,505	1,023	1,295	3,590
180	1	1,145	2,342	1,008	1,244	3,417	1,062	1,500	5,219	1,066	1,527	5,022
240	0,987	1,224	2,816	1,016	1,333	4,087	1,059	1,673	6,168	1,136	1,841	6,659

**Ejemplo 3**

Doce indicadores biológicos autónomos que contienen *Geobacillus stearothermophilus* a una población de  $2 \times 10^7$  CPU por SCBI se colocan en una carga de dispositivos de uso médico simulada y se procesan en un ciclo abortado

(es decir, incompleto) con una carga entera en un esterilizador a vapor. Al completarse los ciclos abortados, las muestras se retiran e incuban a 56°C durante tres horas. Las muestras se evalúan para el nivel de glucosa en el medio. La figura 12 es un gráfico que muestra una comparación entre la señal medida cuando las esporas sobreviven el proceso de esterilización con la señal medida cuando las esporas no sobreviven el proceso de esterilización.

#### Ejemplo 4

La detección de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* a una población de 2E6 y suplementadas con  $\alpha$ -glucosidasa a concentraciones que varían desde 0,4 unidades/ml a 9,7 unidades/ml se siguió usando tiras de glucosa comercialmente disponibles y un monitor de glucosa comercialmente disponible. La incubación se realiza en 500  $\mu$ l de TSB sin glucosa 1/2X con maltosa 4,5 g/l y maltosa 5,5 g/l a 56°C durante 4 horas. La concentración de glucosa de cada muestra se mide cada hora sumergiendo una tira de glucosa en el medio de crecimiento y tomando una lectura con el glucómetro. Las tablas 2 y 3 muestran los resultados del estudio para los medios de crecimiento que contienen maltosa 4,5 g/l y maltosa 5,5 g/l, respectivamente. Cualquier lectura de glucosa por encima de una lectura “baja” en el glucómetro indica que están presentes organismos viables en la solución. Todos los datos indican que se pueden detectar organismos viables en menos de una hora. Los números crecientes en la tabla indican que se generan más moléculas de glucosa.

Tabla 2: Resultados de las lecturas de glucosa para muestras que contienen maltosa 4,5 g/l

TSB sin glucosa 1/2X + maltosa 4,5 g/l en <i>G. stearothermophilus</i>					
Tiempo (min)	Control – Sin maltosa	Enzima 9,7 unidades/ml	Enzima 4,9 unidades/ml	Enzima 0,9 unidades/ml	Enzima 0,4 unidades/ml
0	ER4	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
60	ER4	425	247	44	36
120	ER4	455	346	81	54
180	ER4	424	358	101	74
240	ER4	440	425	143	99

Tabla 3: Resultados de las lecturas de glucosa para muestras que contienen maltosa 5,5 g/l

TSB sin glucosa 1/2X + maltosa 5,5 g/l en <i>G. stearothermophilus</i>					
Tiempo (min)	Control – Sin maltosa	Enzima 9,7 unidades/ml	Enzima 4,9 unidades/ml	Enzima 0,9 unidades/ml	Enzima 0,4 unidades/ml
0	ER4	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
60	ER4	457	287	51	38
120	ER4	447	389	99	66
180	ER4	440	433	127	90
240	ER4	473	429	147	98

En la presente invención la detección de organismos viables se realiza mediante el seguimiento de una señal electrónica resultante de la degradación de azúcares complejos a azúcares sencillos en una reacción enzimática acoplada en la que una de las enzimas se selecciona de las ya producidas por la espora indicadora y la otra de un conjunto de enzimas reactivas con un azúcar sencillo, por ejemplo, glucosa, suministrada como un componente del sistema divulgado según la invención. Los ejemplos citados en el presente documento muestran el uso demostrado de  $\alpha$ -glucosidasa (natural y encontrada en muchas cepas tanto de *Geobacillus stearothermophilus* como de *Bacillus atrophaeus*) y maltosa (un disacárido que comprende dos moléculas de glucosa). Esta forma de realización es de interés particular porque el material de partida (maltosa) no interacciona con los ingredientes para producir una señal sin interacción con esporas viables que expresan la glucosidasa activa. La maltosa también proporciona dos moléculas de glucosa más que una que es el caso para muchos otros potenciales azúcares como lactosa. Se podrían usar otras enzimas naturales de la espora, por ejemplo, una galactosidasa y un sustrato correspondiente como lactosa (produce una molécula de glucosa y una molécula de galactosa) para alcanzar el mismo fin – aumentar la presencia de un azúcar sencillo, tal como glucosa, en la solución de prueba. En cualquier caso, el producto del primer paso, un azúcar sencillo (por ejemplo, glucosa) interaccionaría con la enzima del ejemplo citado (por ejemplo, glucosa oxidasa) para producir productos de reacción (por ejemplo, peróxido de hidrógeno) y la transferencia de electrones detectable de la presente invención. Como en el primer paso, se pueden usar enzimas alternativas en lugar de glucosa oxidasa, como, por ejemplo, glucosa deshidrogenasa, que también produce electrones detectables. La combinación de estas características representa un sistema y método novedoso y bastante inesperado para determinar la eficacia de un proceso de esterilización. Lo que también es novedoso y bastante inesperado es el uso de un glucómetro portátil para la detección y evaluación de los resultados que producen la designación PASA o FALLA basado en la detección de cualquier espora indicadora viable restante. El sistema y método de la presente invención, por tanto, puede permitir tiempos de lectura tan bajos como segundos a minutos, que también es novedoso y bastante inesperado en el campo del seguimiento de ciclos de esterilización.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema indicador de esterilización, que comprende:
  - 5 un vial que comprende:
    - un primer compartimento que comprende esporas de una o más especies de microorganismo;
    - un segundo compartimento que comprende un medio de crecimiento que comprende uno o más de un disacárido, un oligosacárido o un polisacárido capaces de conversión a un monosacárido por células en germinación de las una o más especies de microorganismo, y
    - 10 en donde el vial está libre de monosacárido y está adaptado para combinar los contenidos del primer compartimento con los contenidos del segundo compartimento para la incubación después de que el vial se haya expuesto a un esterilizante;
    - una enzima, capaz de actuar sobre el monosacárido y producir una transferencia de electrones, dispuesta en dos o más electrodos adaptados para transportar una señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando la enzima actúa sobre el monosacárido, en donde el par de electrodos están colocados para entrar en contacto con los contenidos combinados del primer compartimento y el segundo compartimento durante y/o después de la incubación; y
    - 15 un aparato enlazado o enlazable a los electrodos y adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando la enzima actúa sobre el monosacárido.
  2. El sistema indicador de esterilización de la reivindicación 1 en donde la una o más especies de microorganismo comprende una o ambas de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*.
  3. El sistema indicador de esterilización de cualquiera de la reivindicación 1 o reivindicación 2 en donde el disacárido es maltosa y el monosacárido es glucosa.
  4. El sistema indicador de esterilización de cualquier reivindicación precedente en donde el disacárido es maltosa que se convierte a glucosa por una glucosidasa producida por o presente en las células en germinación durante la incubación de los contenidos combinados del primer compartimento y del segundo compartimento.
  5. El sistema indicador de esterilización de cualquier reivindicación precedente en donde la enzima se proporciona junto con uno o más mediadores.
  6. El sistema indicador de esterilización de la reivindicación 5 en donde el uno o más mediadores comprende uno o una mezcla de dos o más de ferroceno, vinilferroceno, 1,1'-dimetilferroceno, carboxiferroceno, 1,1'-dicarboxiferroceno, (dimetilamino)metilferroceno o ferrocianuro.
  7. El sistema indicador de esterilización de cualquier reivindicación precedente en donde los al menos dos electrodos comprenden grafito, grafeno, carbono, nanotubos de carbono, oro, platino, paladio, plata, níquel o cobre o una combinación o aleación de cualesquiera dos o más de los mismos.
  8. El sistema indicador de esterilización de cualquier reivindicación precedente en donde la enzima es glucosa oxidasa.
  9. El sistema indicador de esterilización de cualquier reivindicación precedente en donde la enzima es glucosa deshidrogenasa.
  10. Un método de determinar la eficacia de un proceso de esterilización, que comprende:
    - 50 proporcionar el sistema indicador de esterilización de cualquier reivindicación precedente;
    - exponer el indicador de esterilización a un proceso de esterilización que se pretende que destruya las esporas de la una o más especies de microorganismo;
    - combinar los contenidos del primer compartimento y el segundo compartimento;
    - 55 exponer los contenidos combinados a la enzima dispuesta en los dos o más electrodos mientras se incuban los contenidos combinados;
    - con el aparato unido a los electrodos, detectar y medir cualquier señal eléctrica resultante de transferencia de electrones cuando la enzima actúa sobre el monosacárido; y
    - determinar si el proceso de esterilización fue eficaz.

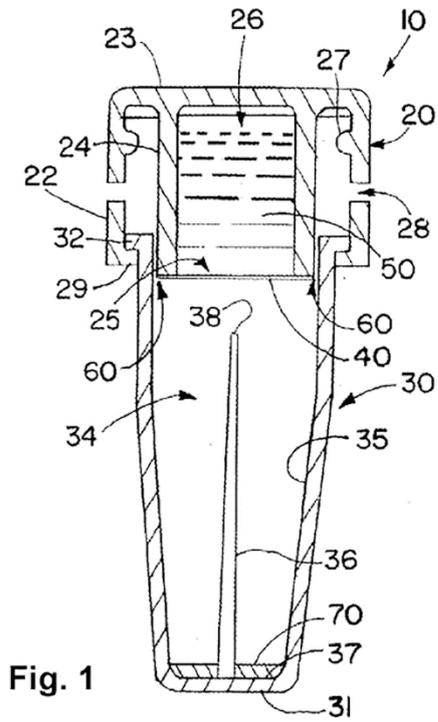


Fig. 1

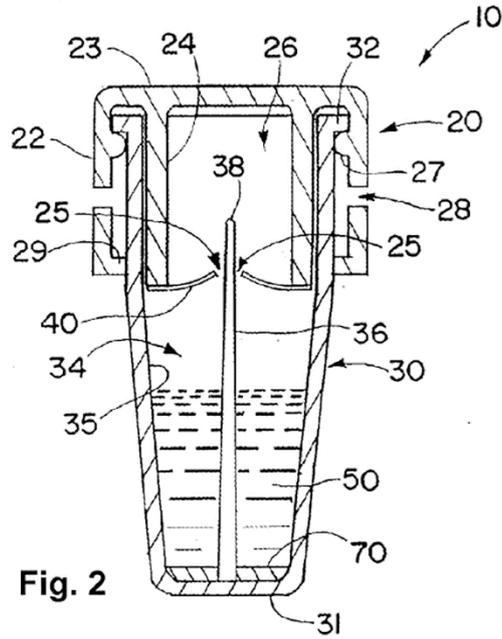


Fig. 2

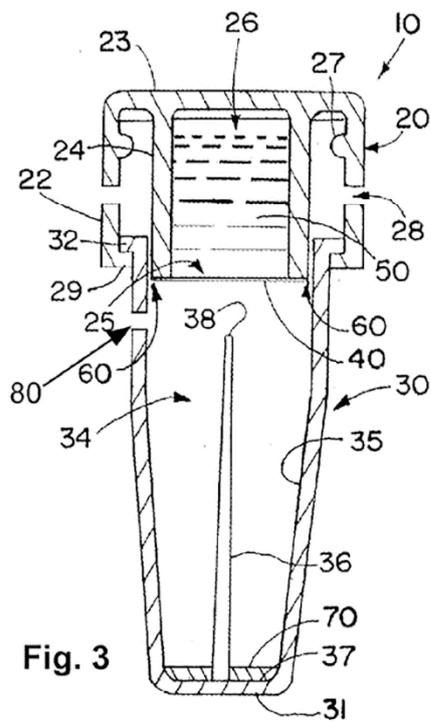


Fig. 3

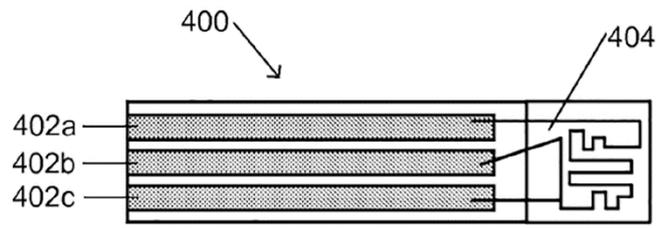


Fig. 4

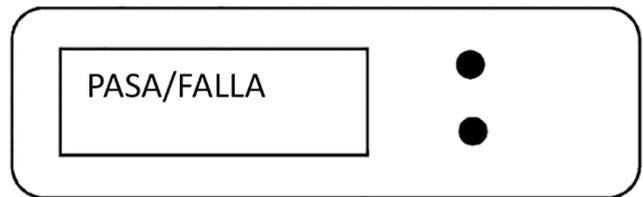


Fig. 5

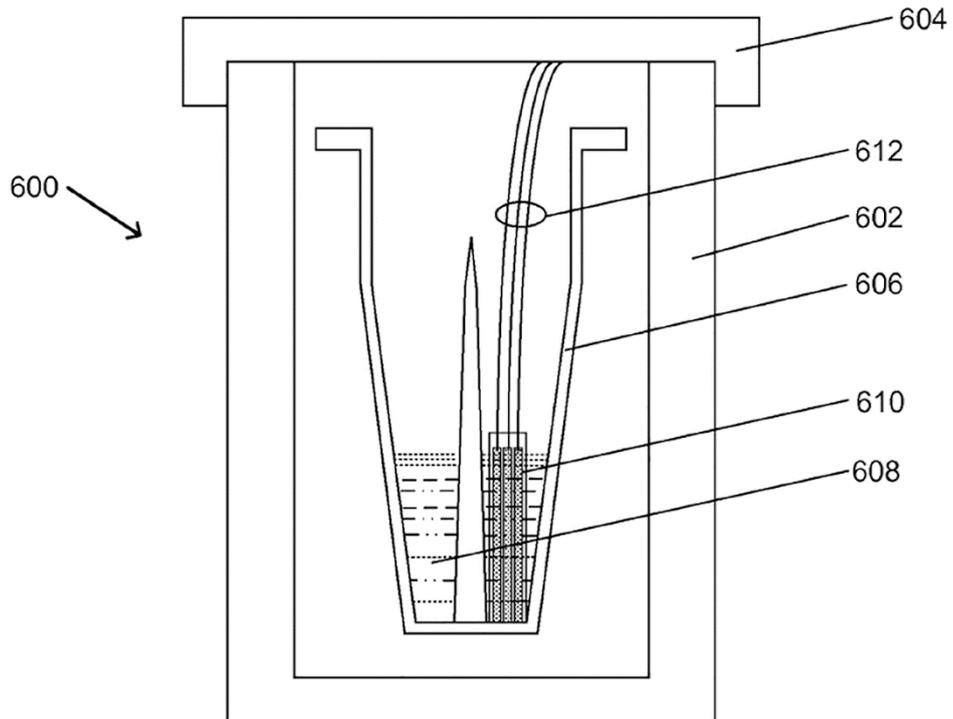


Fig. 6

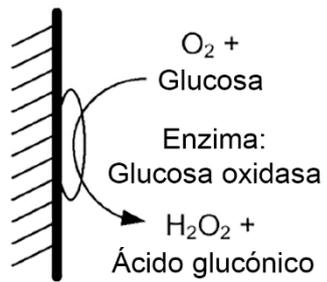


Fig. 7a

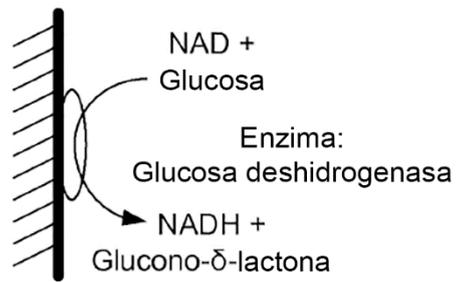


Fig. 7b

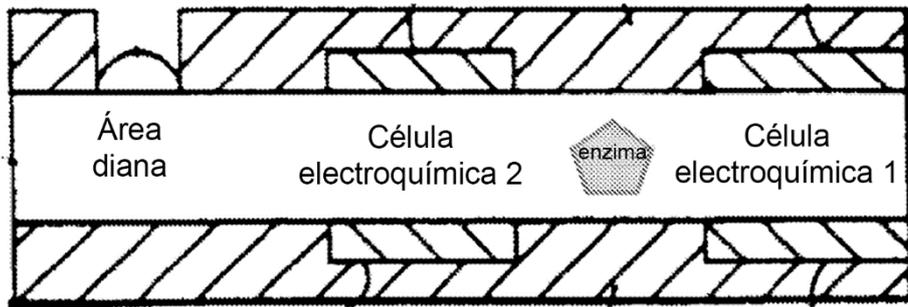


Fig. 8

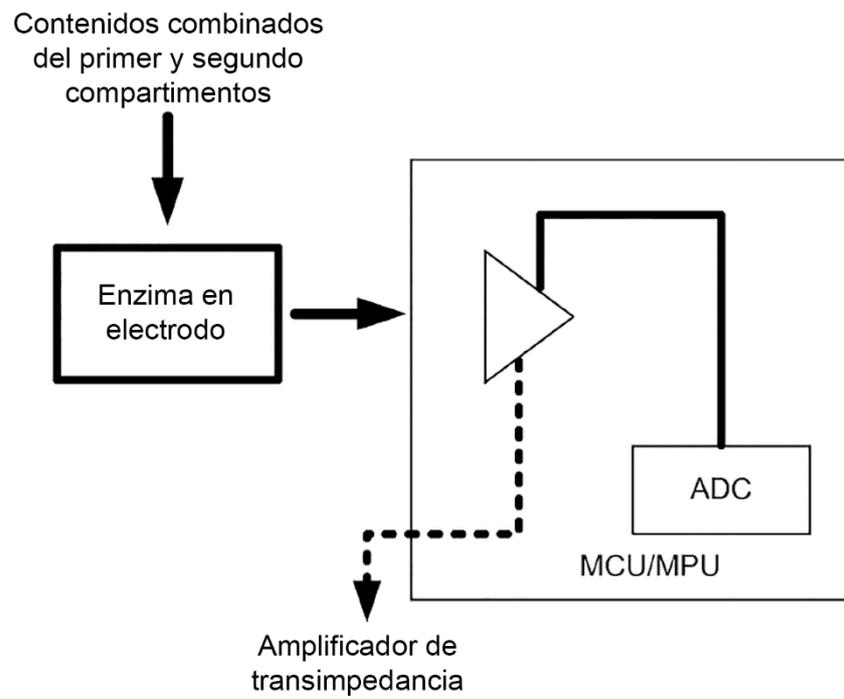


Fig. 9

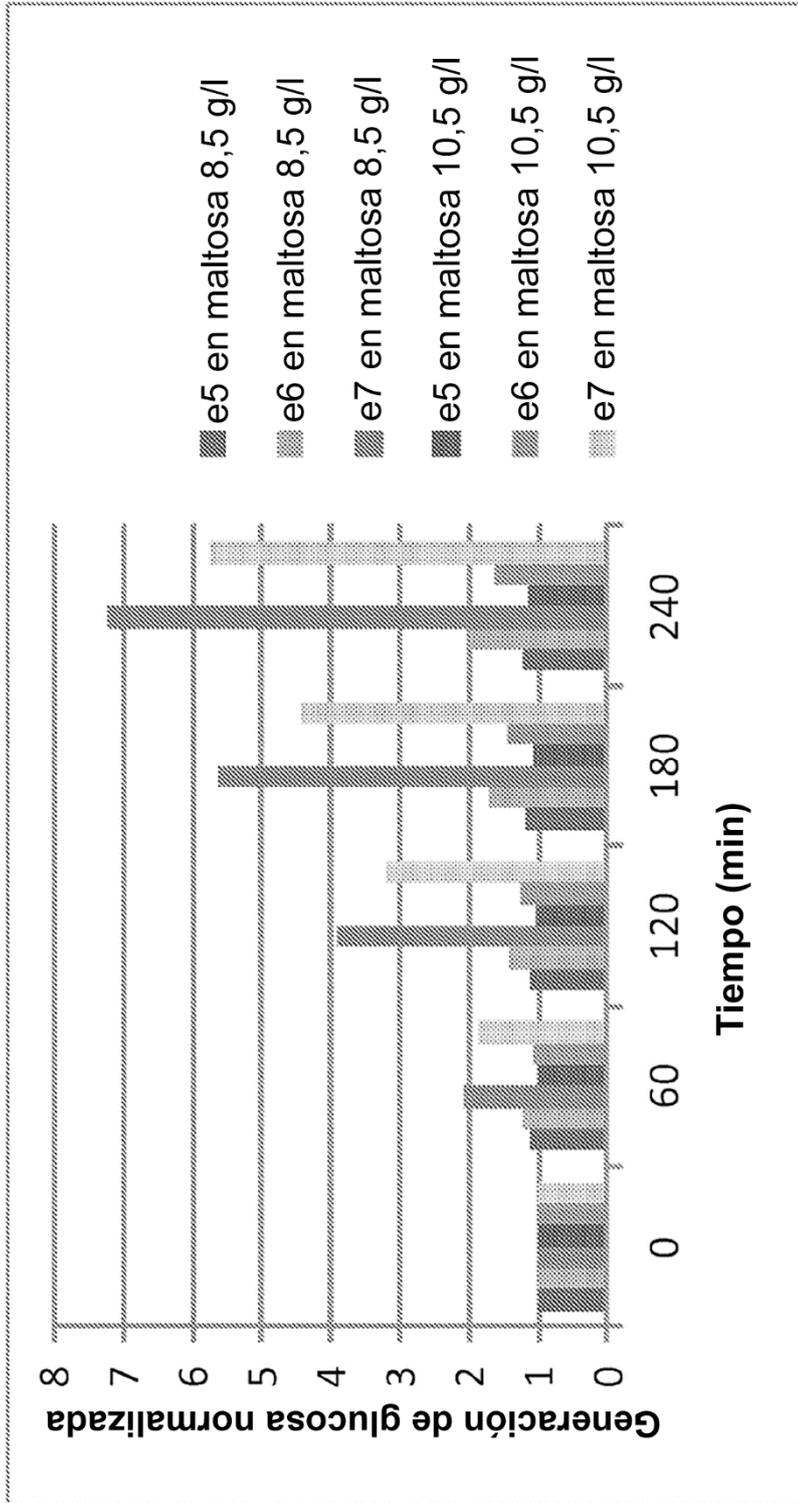


Fig. 10

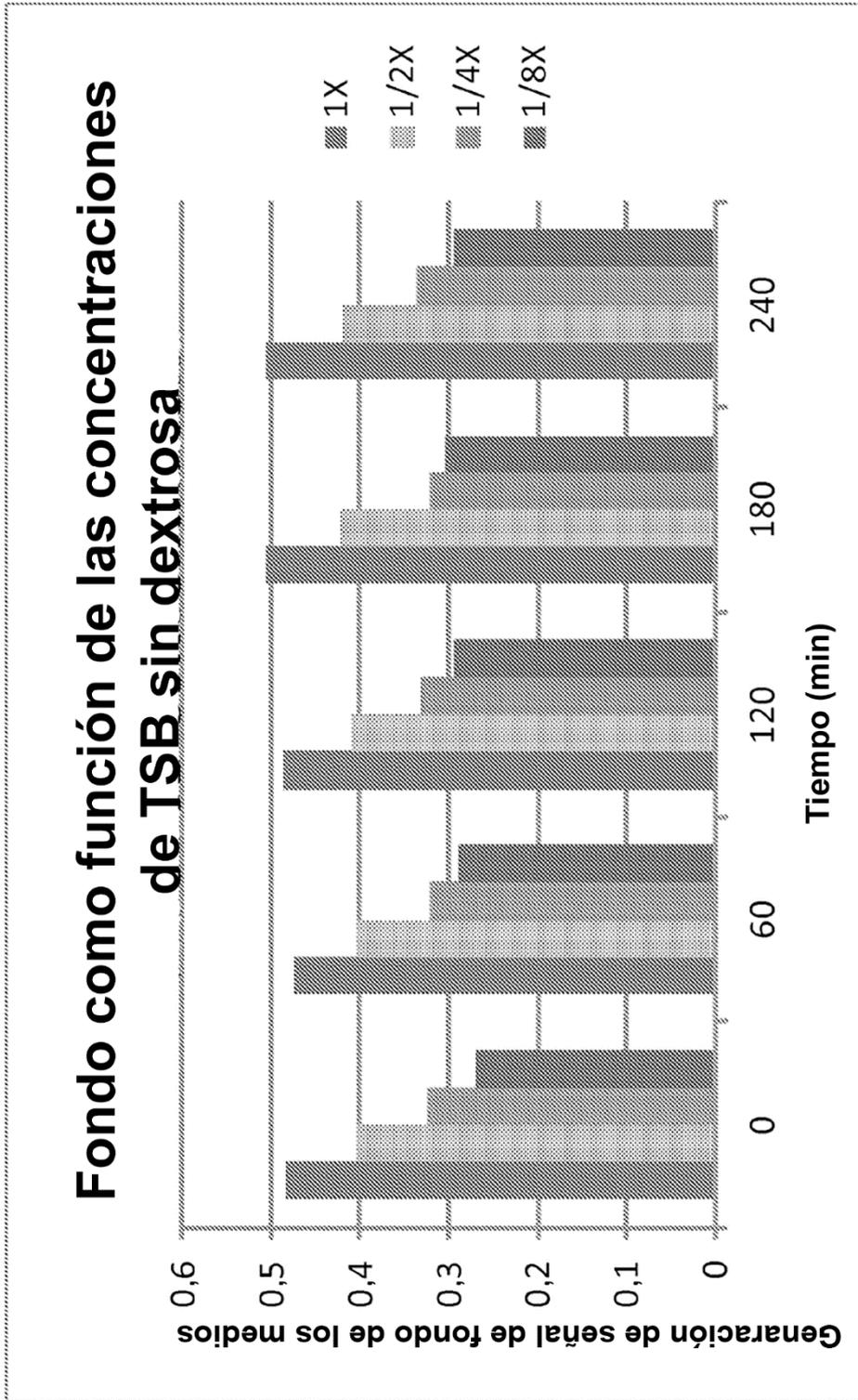


Fig. 11

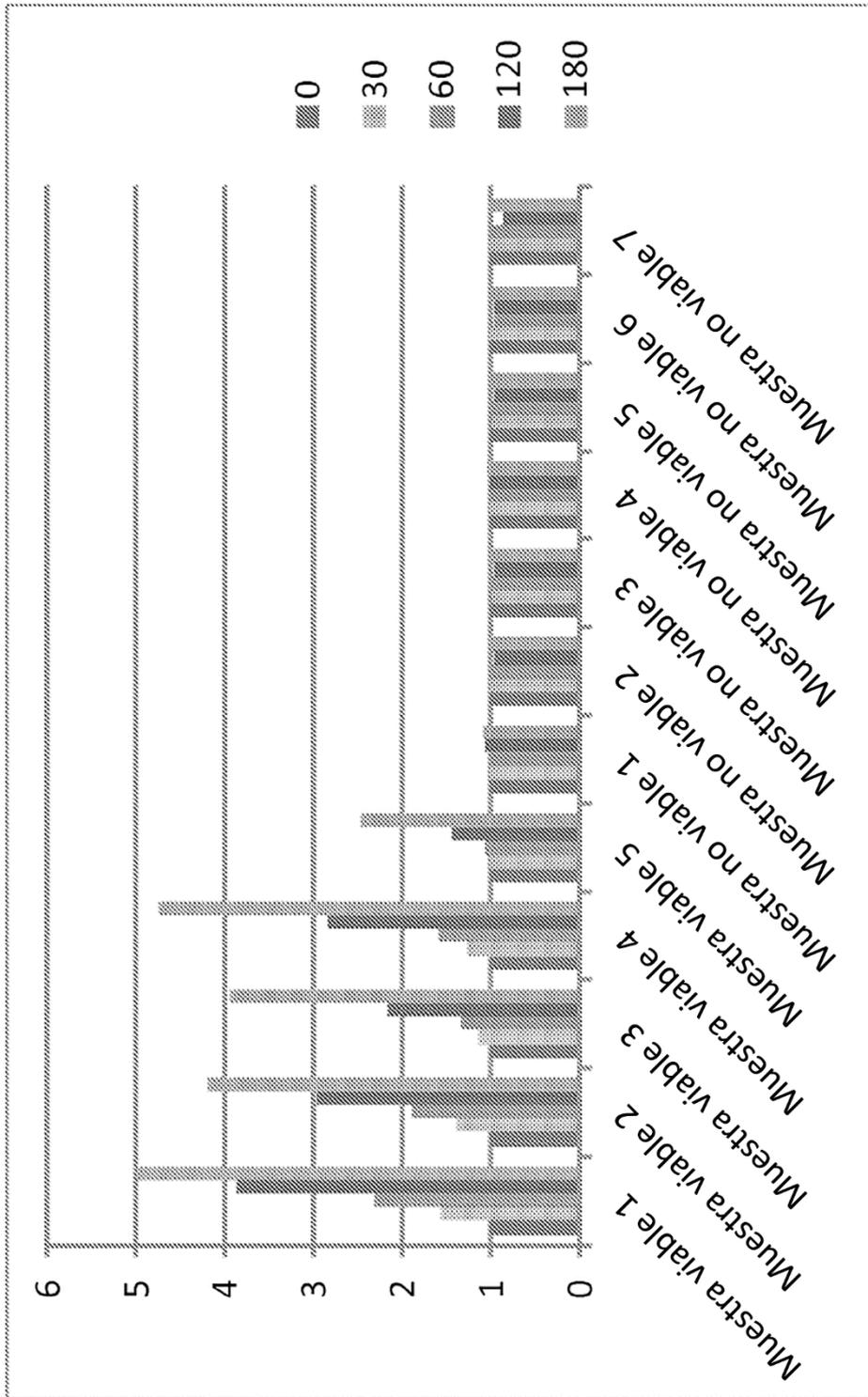


Fig. 12