

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 439**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/22 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2014 PCT/US2014/017909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014 E 14709495 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2971063**

54 Título: **Método no basado en enzimas para el seguimiento electrónico de un indicador biológico**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313836787

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

21.09.2017

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 2 633 439 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 no basado en enzimas 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 no basados en enzimas 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 carga procesada misma. 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 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 tales 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 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 fluorométricas, 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, por métodos fotométricos o conductométricos y el uso de un medio de incubación sin glucosa.

65

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.

El documento WO 02/10708 A2 divulga la detección de glucosa resultante de la degradación de di- o polisacáridos por reacción de glucosa oxidasa seguida por detección colorimétrica.

5 **Compendio**

Uno de tales métodos que permite el control sobre la relación 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 medios electrónicos 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 no basado en enzimas para detectar la acumulación de azúcares sencillos tal como glucosa, resultantes de la degradación enzimática de azúcares complejos. El sistema no basado en enzimas de la presente invención incluye una combinación de al menos una glucosidasa natural presente en una espora viable y electrodos adaptados para oxidar un azúcar sencillo, tal como glucosa, producido por la glucosidasa en la espora viable. El medio de incubación o crecimiento proporcionado para las esporas tras la esterilización se proporciona sin el azúcar sencillo y con un azúcar complejo, tal como un disacárido o un polisacárido. 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. El producto azúcar sencillo se expone después a los electrodos en una tira que está adaptada para oxidar selectivamente la glucosa lo que produce una transferencia de electrones como parte de su oxidación del 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 en la oxidación 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. Los electrodos pueden ser los usados 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. En una forma de realización, el sistema y proceso usan 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 comprende:

- esporas de una o más especies de microorganismo;
- un vial que comprende un primer compartimento opcional y un segundo compartimento que contiene un medio de crecimiento que comprende uno o más de un disacárido, un oligosacárido o un polisacárido capaz de conversión a un monosacárido por las esporas que germinan de la una o más especies de microorganismo, el vial está adaptado para combinar los contenidos del segundo compartimento con las esporas para análisis después de que el vial se haya expuesto a un esterilizante;
- una tira electroconductora que comprende tres electrodos adaptados para oxidar el monosacárido y transportar una señal eléctrica resultante de la oxidación del monosacárido, en donde los tres electrodos están adaptados para proporcionar contacto con los contenidos combinados del segundo compartimento y las esporas durante y/o después de la incubación;
- la tira (400) incluye además componentes electrónicos adaptados para proporcionar comunicación eléctrica entre los electrodos; y
- un aparato enlazado o enlazable a los tres electrodos y adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando el monosacárido es oxidado por los electrodos, en donde el sistema está libre del monosacárido antes de la exposición al esterilizante.

En una forma de realización, el primer compartimento está ausente, las esporas se disponen sobre la tira, y la tira inicialmente está separada del segundo compartimento.

En una forma de realización, el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas sobre la tira, y la tira está inicialmente separada tanto del primer compartimento como del segundo compartimento.

En una forma de realización, el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas en el primer compartimento, y la tira está inicialmente separada tanto del primer compartimento como del segundo compartimento.

En una forma de realización, el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas en el primer compartimento, y la tira está inicialmente en el primer compartimento.

En una forma de realización, el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas sobre la tira, y la tira está inicialmente en el primer compartimento.

5 En una forma de realización, el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas en el primer compartimento, y la tira está inicialmente en el segundo compartimento.

En una forma de realización, el monosacárido es glucosa.

10 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 aparato es un lector de glucosa.

15 En una forma de realización, los dos o más electrodos son enlazables a un lector de glucosa mediante un enlace inalámbrico.

En una forma de realización el disacárido es maltosa que se convierte a glucosa por una glucosidasa producida por o presente en las esporas que germinan.

20 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.

25 Según la invención también es un método de determinar la eficacia de un proceso de esterilización usando un sistema indicador de esterilización inventivo, en donde el método comprende, en el siguiente orden: exponer las esporas a un esterilizante en un proceso de esterilización; combinar las esporas con los contenidos del segundo compartimento, e incubar los contenidos combinados; poner en contacto la tira con los contenidos combinados antes y/o durante la incubación y oxidar cualquier monosacárido con los tres electrodos; enlazar el aparato a los tres electrodos; con el aparato unido a los tres electrodos, detectar y medir cualquier señal eléctrica producida por los electrodos de la oxidación; y determinar la eficacia del proceso de esterilización basado en la presencia o ausencia de la señal eléctrica.

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

Breve descripción de las figuras

40 La presente invención puede ser útil con una variedad de aparatos de esterilización. Se pretende que los 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.

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

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

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

60 La figura 5 es una representación esquemática de un incubador/lector de prueba para uso en una forma de 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 el medio de crecimiento, en un incubador/lector de prueba según una forma de realización de la presente invención.

65 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.

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.

10 Descripción detallada

Los indicadores biológicos descritos en lo siguiente dependen de un mecanismo nuevo para detectar viabilidad de esporas. La invención descrita aquí utiliza una señal electrónica que se genera basada en la acumulación de un monosacárido, por ejemplo, glucosa resultante de la capacidad de organismos viables de degradar azúcares complejos. Los métodos de detección electrónica basados en glucosa han estado disponibles sin problemas durante años para seguir los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos. Hasta ahora, sin embargo, no ha habido ni uso ni sugerencia de adaptar estos mecanismos de detección electrónica como un medio para detectar organismos viables después de procesos de esterilización.

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 más útil se pueda utilizar como una fuente de energía por el organismo. 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 una forma de realización de 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, sin embargo, donde la glucosa es prevalente y se mide directamente, en la presente invención, inicialmente no hay glucosa presente, y la glucosa solo 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. Si no sobreviven organismos viables a las condiciones de esterilización, no hay glucosa presente que se vaya a 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. Si y cuando se produce esta degradación, se puede detectar y medir según la presente invención.

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, tal como disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos (seleccionados en base a que pueden ser degradados por las enzimas activas de los organismo de prueba viables seleccionados para el indicador de esterilización) se esperaría un aumento en el monosacárido, por ejemplo, glucosa, tras exponer esporas viables a este medio y esta concentración creciente del monosacárido en el medio de crecimiento se puede detectar electrónicamente por electrodos adaptados para oxidar los monosacáridos. En las condiciones de esterilización, las esporas se destruyen y cualquier enzima que las esporas puedan poseer antes de la esterilización se destruirán. Por tanto, un aumento en el monosacárido detectado después de la exposición de estas esporas al medio de esta invención significa que los organismos son viables (prueba de vida). La conversión mediada por esporas de los azúcares complejos a glucosa representa el primer paso en detectar organismos viables según el proceso de la presente invención. El segundo paso es la oxidación de cualquier monosacárido así producido por los dos o más electrodos, y el tercer paso es la detección de cualquier señal eléctrica que acompaña la oxidación.

Los organismos de mayor interés para seguir los procesos de esterilización son *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*. Las esporas que germinan de ambos organismos producen enzimas incluyendo, por ejemplo, alfa-glucosidasa, que puede degradar el azúcar complejo maltosa en dos moléculas de glucosa. Esto ejemplifica solo un medio para alcanzar el primer paso en la presente invención. Otras enzimas producidas por esporas también se pueden usar para degradar otros azúcares complejos, por ejemplo, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos, para producir monosacáridos tal como glucosa.

El monosacárido, por ejemplo, glucosa, se puede oxidar después por los electrodos para alcanzar el segundo paso en la presente invención. El monosacárido se puede detectar por biosensores de glucosa no enzimáticos que usan, por ejemplo, un método cronoamperométrico de potencial fijado para la determinación electroquímica directa de moléculas de monosacáridos recién formadas. Los métodos de potencial de barrido adecuados los conocen los expertos en la materia. Por ejemplo, C. Fang, C. Yi, Y. Yang, Y. Cao y X. Liu, en *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3164 divulga un polímero molecularmente impreso que se puede usar. Otros métodos de detección por biosensores de glucosa no enzimáticos se conocen en la técnica también.

Por tanto, el proceso es dependiente del primer paso en el proceso, en el que cualquier espора que gemina produce una enzima capaz de degradar hidratos de carbono complejos, por ejemplo, maltosa o lactosa, a azúcares más

sencillos, por ejemplo, glucosa. La falta para alcanzar la producción del producto final del primer paso (como será el caso si todas las esporas están destruidas) previene la detección del azúcar sencillo en el segundo paso. Así, en ausencia de cualquier producto de la primera reacción (por ejemplo, glucosa convertida a partir de maltosa), no se producirá o se observará señal. En este caso, la ausencia de cualquier señal derivada de la oxidación de un monosacárido tal como glucosa significaría que la esterilización seguida tuvo éxito.

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

Los ejemplos de oligosacáridos adecuados son fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, manan-oligosacáridos, goma arábica, 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.

La presente invención utiliza una señal electrónica que depende de detectar la aparición de azúcares sencillos que se generan a partir de la degradación de azúcares complejos cuando están en presencia de esporas que germinan de organismos indicadores. Los métodos de detección electrónica basados en azúcares han estado sin problemas disponibles durante años para seguir los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos. Sin embargo, hasta ahora, estos mecanismos de detección electrónicos no se han usado o sugerido para uso como un medio para detectar organismos viables después de procesos de esterilización. Se posibilita aquí por la realización de que las condiciones se pueden ajustar de modo que, en ausencia de esporas viables, supervivientes, no está presente monosacárido, por ejemplo, glucosa, en el sistema y ninguna se detectará, mientras que al mismo tiempo se proporciona una medida muy sensible de cualquiera de los monosacáridos que se hace presente debido a la presencia de esporas que germinan. Por tanto, la presente invención se aprovecha del hecho de que la mayoría de los organismos vivos tienen capacidades inherentes para degradar azúcares complejos (tal como maltosa) a azúcares sencillos (tal como glucosa) para que la molécula de glucosa más útil se pueda utilizar como una fuente de energía por el organismo. El seguimiento de glucosa mediante métodos de detección basados en enzimas (por ejemplo, biosensores basados en glucosa oxidasa) han estado disponibles sin problemas durante años para seguir los niveles de glucosa en sangre de pacientes diabéticos. Estos mismos métodos básicos para seguir los niveles de glucosa en sangre se pueden alterar y adaptar para detectar organismos viables, tal como esporas, que pueden sobrevivir un ciclo de esterilización. Según las esporas viables empiezan a germinar, producen enzimas que las permiten degradar azúcares complejos a azúcares simples 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 organismos viables seleccionados) se esperaría un aumento en la glucosa, tras exponer esporas viables a este medio e incubarlo. En las condiciones de esterilización, las esporas que se destruyen y cualquiera de las enzimas derivadas de la espora que ya poseyera se destruirán.

Por tanto, un aumento en la glucosa detectada después de la exposición de estas esporas a este medio confirma que los organismos son viables. La conversión mediada por esporas que germinan de azúcares complejos a azúcares sencillos se detecta directamente en el proceso electrocatalítico de la presente invención. Esto proporciona un método hasta ahora no disponible para la detección de esporas indicadoras viables sin los requisitos para enzimas exógenamente añadidas o cualquier sustancia química generadora de señal añadida.

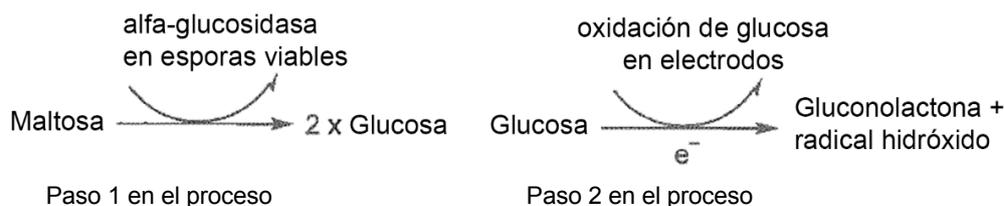
Se divulga un sistema indicador de esterilización, que incluye esporas de una o más especies de microorganismo; un vial que comprende un primer compartimento opcional y un segundo compartimento que contiene un medio de crecimiento que comprende uno o más de un disacárido, un oligosacárido o un polisacárido capaz de conversión a un monosacárido por las esporas que germinan de la una o más especies de microorganismo, el vial está adaptado para combinar los contenidos del segundo compartimento con las esporas para análisis después de que el vial se haya expuesto a un esterilizante; una tira que comprende dos o más electrodos adaptados para oxidar el monosacárido y transportar una señal eléctrica resultante de la oxidación del monosacárido, en donde los dos o más electrodos están adaptados para proporcionar contacto con los contenidos combinados del segundo compartimento y las esporas durante y/o después de la incubación; y un aparato enlazado o enlazable a los dos o más electrodos y adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando el monosacárido es oxidado por los dos o más electrodos, en el que el sistema está libre del monosacárido antes de la exposición al esterilizante. Puesto que el sistema está libre del monosacárido antes de la exposición al esterilizante, cualquier señal eléctrica que se detecte y mida indicaría la presencia de esporas viables, en germinación, y esto indicaría entonces que el proceso de esterilización falló para esterilizar por completo la carga, ya que el indicador contenía esporas supervivientes.

Los electrodos adecuados para uso con la presente invención incluyen una variedad de tipos de electrodos, sensibilidades, intervalos lineales, límites de detección e idoneidad para depósito por chorro de tinta, serigrafía o

métodos similares. La composición y forma física de estos electrodos los define como electrocatalizadores e incluye, pero no están limitados a: capas porosas o intercaladas (por ejemplo, que comprenden uno o más de cobre, níquel, plata, platino y oro), grafito, grafeno, carbono, nanotubos de carbono, nanopartículas (por ejemplo que comprenden, por ejemplo, cobre y nanotubos de carbono, platino dopado y películas metálicas), metales sin modificar tal como cobre, níquel, plata, platino y oro, electrodos químicamente modificados, aleaciones (por ejemplo, níquel-titanio, níquel-cobre y níquel-cromo-hierro), formas electroquímicamente depositadas tal como (por ejemplo, óxidos de cobre y oro/cobre bimetalico) y polímeros y compuestos (por ejemplo, níquel-óxido polimérico y oro/Nafion®). Las sensibilidades descritas varían desde 2×10^{-4} a más de 200 mA por mM (miliamperio por milimol) y los intervalos lineales son tan altos como de 4 a 5 órdenes de magnitud. Los límites de detección pueden alcanzar tan bajo como 2×10^{-8} mM. Aunque muchas de estas propiedades físico-eléctricas están muy por debajo de lo que se necesita de la determinación de glucosa en sangre, son idealmente adecuadas para seguir la generación de glucosa en presencia de un pequeño número de esporas indicadoras supervivientes.

Los sensores de glucosa no enzimáticos se pueden operar usando, por ejemplo, métodos de potencial de barrido tal como barrido lineal, y voltamperometría cíclica y de onda cuadrada. El proceso de electrocatálisis no enzimática se produce cuando el analito (por ejemplo, la glucosa recién surgida) se adsorbe a la superficie del electrodo formando un enlace que alternativamente se adsorbe y desorbe catalizando la oxidación de la glucosa e induciendo la transferencia de electrones. Es este flujo de energía el que es proporcional a la cantidad de glucosa en el sistema y por tanto es el medio por el que se puede detectar la presencia de esporas viables.

Las siguientes reacciones ejemplares representan funciones de la enzima natural en cualquier espora que germina que sobrevive al proceso de esterilización, y de la oxidación por los electrodos en la tira añadida al medio de incubación/recuperación según una forma de realización de la presente invención en la que maltosa es el azúcar complejo (disacárido) y glucosa es el azúcar sencillo o monosacárido:



Quando 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 azúcar sencillo presente en el sistema después de la esterilización e incubación, cuando no había presente ninguna antes de la esterilización e incubación.

Esta invención utiliza organismos que son resistentes al proceso de esterilización que se va a seguir junto con un medio especializado que se ha formulado con azúcares complejos, por ejemplo, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos que se pueden reducir por esporas viables a monosacáridos tal como el azúcar sencillo glucosa. El aumento en los niveles del azúcar sencillo en el sistema si están presentes esporas viables, por tanto, se puede seguir de forma electrónica.

En una forma de realización, los tres 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.

Como se usan en el presente documento, las frases “una señal eléctrica resultante de la oxidación del monosacárido” y “una señal eléctrica resultante de la oxidación de la glucosa” significan que la señal eléctrica es esa señal que resulta de la oxidación, comparada con una señal de fondo, tal como se podría proporcionar mediante el uso de un electrodo de referencia. Por tanto, mientras que puede haber alguna señal eléctrica umbral entre los electrodos, incluso en ausencia de oxidación, es la señal resultante de la oxidación la que es de interés y se mide en la presente invención.

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. Las siguientes descripciones se proporcionan para informar en general cómo funciona un sistema de esterilización ejemplar, y no se pretende que limiten la 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 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 al 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 entra 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 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 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 o en electrodos que pueden estar diversamente localizados. El indicador de esterilización se ensambla después acoplando la tapa llena con medio de recuperación 20 sobre el envase 30. La tapa 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, en esta forma de realización.

45 Después de completar el proceso de esterilización, el indicador de esterilización se puede activar moviendo la tapa 20 hacia abajo hacia el 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.

50 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. El uso de proyecciones 27 es opcional, en otras formas de realización del sistema de esterilización. La patente en EE UU No. 5.770.393 ilustra otras configuraciones adecuadas. En otra forma de realización alternativa, la superficie interna de la tapa 20 y la superficie externa del envase 30 pueden estar enroscadas, y la tapa 20 se puede mover a y mantener en una posición cerrada atornillando la tapa 20 sobre el envase 30, en donde 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.

Como se ha descrito anteriormente, la tapa 20 en la forma de realización ilustrada en las figuras 1 y 2 se muestra como que tiene la apertura 28 para permitir el acceso del esterilizante en 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 del 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 ruta tortuosa para la entrada y salida del vapor de esterilización entre los microorganismos y los medios circundantes. La ruta tortuosa también puede servir para inhibir o prevenir la contaminación de agentes externos, y para asegurarse que una cantidad adecuada de esterilizante está disponible. Incluyendo la ruta 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.

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.

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.

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.

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 metabolizar y germinar, y este metabolismo y 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 ser oxidada por los electrodos que se proporcionan, oxidación que se detecta a través de la señal eléctrica producida por los dos o más electrodos descritos en el presente documento.

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 cualquier glucosa presente es oxidada por los electrodos. Como se divulga y describe, los electrodos 402a, 402b y 402c son capaces de actuar sobre un monosacárido, tal como glucosa, para oxidar el monosacárido y producir una transferencia de electrones detectable. Como se ha descrito, los al menos dos electrodos, pueden incluir dos electrodos que participan en la oxidación, mientras que el tercer electrodo puede funcionar como un electrodo de referencia. Otras configuraciones, 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, 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 a través de una de las conexiones descritas. 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 monosacárido, 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.

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 la tira que contiene los electrodos 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 esporas de un organismo de prueba
10 seleccionado, 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 cableadas 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. Como se describe con respecto a la figura 4, el lector/incubador de prueba 600 se puede comunicar con la tira 610 por cualquier método apropiado.

20 La figura 6 es representativa de una forma de realización de un vial 606 en el que solo hay un compartimento, por ejemplo, en el que el primer compartimento opcional está ausente, las esporas se disponen en la tira 610, y la tira 610 inicialmente está separada del segundo compartimento. Como se muestra en la figura 6, la tira inicialmente separada 610 se ha colocado en el medio de crecimiento 608 que contiene uno o más de un disacárido, un oligosacárido y un polisacárido capaces de conversión a un monosacárido por cualquier espora que germina de los uno o más microorganismo, si alguno de los microorganismos hubiera sobrevivido al proceso de esterilización. En la forma de realización en la que el primer compartimento está ausente, el medio de crecimiento 608 no se somete necesariamente al proceso de esterilización; en esta forma de realización, solo es necesario que la tira 610, con las esporas dispuestas sobre ella, se someta a las condiciones de esterilización. Por supuesto, se deben tomar los pasos apropiados para asegurar que el medio de crecimiento está libre de cualquier microorganismo capaz de producir azúcares sencillos a partir de azúcares más complejos y, por tanto, también se puede esterilizar o someter a las mismas condiciones de esterilización que la tira.

Según una forma de realización de la presente invención (no mostrada), un sistema indicador de esterilización incluye un vial en que las esporas están en el primer compartimento y el medio de incubación y la tira están en el
35 segundo compartimento. El vial incluye una tapa y un envase. El envase forma un primer compartimento, y la tapa incluye un segundo compartimento que contiene un medio de incubación o recuperación. Las esporas de un microorganismo adecuado se localizan en el primer compartimento, y en esta forma de realización, las esporas se inmovilizan en un soporte. El envase incluye un miembro de punción, que se coloca para perforar una barrera rompible, cuando el vial se va a activar para incubación después de que se haya sometido a un proceso de esterilización. El sistema indicador de esterilización incluye además una tira electroconductora que tiene tres electrodos, que inicialmente se localiza en el segundo compartimento, es decir, la tapa. La tira es sustancialmente similar a la tira descrita anteriormente con respecto a la figura 4, pero no está limitada a la misma. Como se ha descrito con respecto a la figura 4, la tira incluye componentes electrónicos adecuados para proporcionar un enlace entre los electrodos y un aparato adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando cualquier azúcar sencillo presente, por ejemplo, glucosa, es oxidado por los electrodos. Este es un ejemplo de una forma de realización en la que el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas en el primer compartimento, y la tira inicialmente está en el segundo compartimento.

Según una forma de realización de la presente invención (no mostrada), un sistema indicador de esterilización tiene un vial en que las esporas y la tira están en el primer compartimento, pero están separadas entre sí, y el medio de incubación está en el segundo compartimento. El vial incluye una tapa y un envase. El envase forma un primer compartimento, y la tapa incluye un segundo compartimento que contiene un medio de incubación o recuperación. Las esporas de un microorganismo adecuado se localizan en el primer compartimento, en una forma de realización, las esporas se inmovilizan en un soporte. El envase incluye un miembro de punción, que se coloca para perforar una
55 barrera rompible, cuando el vial se va a activar para incubación después de que se haya sometido a un proceso de esterilización. El sistema indicador de esterilización incluye además una tira que tiene tres electrodos, que está localizada en el primer compartimento. La tira es sustancialmente similar a la tira descrita con respecto a la figura 4, pero no está limitada a la misma. Como se ha descrito con respecto a la figura 4, la tira incluye componentes electrónicos adecuados para proporcionar un enlace entre los electrodos y un aparato adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando cualquier azúcar sencillo presente, por ejemplo, glucosa, es oxidado por los electrodos. Este es un ejemplo de una forma de realización en la que el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas en el primer compartimento, y la tira inicialmente está en el primer compartimento.

65 Según una forma de realización de la presente invención, un sistema indicador de esterilización tiene un vial en que las esporas están en el primer compartimento y el medio de incubación está en el segundo compartimento, y la tira

está separada del vial. El vial incluye una tapa y un envase. El envase forma un primer compartimento, y la tapa incluye un segundo compartimento que contiene un medio de incubación o recuperación. Las esporas de un microorganismo adecuado se localizan en el primer compartimento, en una forma de realización, las esporas se inmovilizan en un soporte 908. El envase incluye un miembro de punción, que se coloca para perforar una barrera rompible, cuando el vial se va a activar para incubación después de que se haya sometido a un proceso de esterilización. El sistema indicador de esterilización incluye además una tira que tiene tres electrodos, que está localizada separada del vial. La tira es sustancialmente similar a la tira descrita con respecto a la figura 4, pero no está limitada a la misma. Como se ha descrito con respecto a la figura 4, la tira incluye componentes electrónicos adecuados para proporcionar un enlace entre los electrodos y un aparato adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando cualquier azúcar sencillo presente, por ejemplo, glucosa, es oxidado por los electrodos. Este es un ejemplo de una forma de realización en la que el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas en el primer compartimento, y la tira inicialmente está separada tanto del primer compartimento como del segundo compartimento.

Según una forma de realización de la presente invención (no mostrada), un sistema indicador de esterilización tiene un vial en que las esporas están en la tira y la tira está en el primer compartimento, y el medio de incubación está en el segundo compartimento. El vial incluye una tapa y un envase. El envase forma un primer compartimento, y la tapa incluye un segundo compartimento que contiene un medio de incubación o recuperación. Las esporas de un microorganismo adecuado se localizan en el primer compartimento en una tira, en esta forma de realización. El envase incluye un miembro de punción, que se coloca para perforar una barrera rompible, cuando el vial se va a activar para incubación después de que se haya sometido a un proceso de esterilización. El sistema indicador de esterilización incluye además una tira que tiene tres electrodos, que está localizada en el primer compartimento. La tira es sustancialmente similar a la tira descrita con respecto a la figura 4, pero no está limitada a la misma, excepto que en esta forma de realización la tira también contiene las esporas. Como se ha descrito con respecto a la figura 4, la tira incluye componentes electrónicos adecuados para proporcionar un enlace entre los electrodos y un aparato adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando cualquier azúcar sencillo presente, por ejemplo, glucosa, es oxidado por los electrodos. Este es un ejemplo de una forma de realización en la que el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas sobre la tira, y la tira inicialmente está en el primer compartimento.

Según una forma de realización de la presente invención (no mostrada), un sistema indicador de esterilización tiene un vial en que las esporas están en la tira y la tira está separada del vial, no hay nada en el primer compartimento, y el medio de incubación está en el segundo compartimento. El vial incluye una tapa y un envase. El envase forma un primer compartimento, y la tapa 1102 incluye un segundo compartimento que contiene un medio de incubación o recuperación. El envase incluye un miembro de punción, que se coloca para perforar una barrera rompible, cuando el vial se va a activar para incubación después de que se haya sometido a un proceso de esterilización. El sistema indicador de esterilización incluye además una tira que tiene tres electrodos, que está localizada separada del vial. Las esporas de un microorganismo adecuado se localizan en la tira, en esta forma de realización. La tira es sustancialmente similar a la tira descrita anteriormente con respecto a la figura 4, pero no está limitada a la misma, excepto que en esta forma de realización, la tira también contiene las esporas. Como se ha descrito con respecto a la figura 4, la tira incluye componentes electrónicos adecuados para proporcionar un enlace entre los electrodos y un aparato adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando cualquier azúcar sencillo presente, por ejemplo, glucosa, es oxidado por los electrodos. Este es un ejemplo de una forma de realización en la que el primer compartimento está presente, las esporas están dispuestas sobre la tira, y la tira inicialmente está separada del primer compartimento y del segundo compartimento.

Se divulga 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.

Los expertos en la materia pueden seleccionar lectores de glucosa no enzimáticos adecuados para uso con la presente invención. Tales lectores que están comercialmente disponibles incluyen Accu-Chek® de Roche Diagnostics, FreeStyleLite® de Abbott Diabetes Care, y One Touch Ultra® de Johnson & Johnson. Un sistema de prueba de desarrollo de laboratorio es la estación de trabajo electroquímica EC épsilon (Bioanalytical Systems, Inc.). Véase también, la Electrochemistry Encyclopedia, "Electrochemical Blood Glucose Test Strips for People with Diabetes", Ben Feldman, Octubre, 2009, para información adicional sobre lectores de glucosa.

Por tanto, en una forma de realización, la presente invención proporciona además un método para determinar la eficacia de un proceso de esterilización usando un sistema indicador de esterilización según la presente invención, en donde el método comprende, en el siguiente orden:

exponer las esporas a un esterilizante en un proceso de esterilización;
combinar las esporas con los contenidos del segundo compartimento, e incubar los contenidos combinados;

poner en contacto la tira con los contenidos combinados antes y/o durante la incubación y oxidar cualquier monosacárido con los tres electrodos;
 enlazar el aparato a los tres electrodos;
 con el aparato unido a los tres electrodos, detectar y medir cualquier señal eléctrica producida por los tres electrodos de la oxidación; y
 5 determinar la eficacia del proceso de esterilización basado en la presencia o ausencia de la señal eléctrica

El método anterior se puede llevar a cabo según los detalles proporcionados en la descripción escrita anterior y junto con el conocimiento de personas expertas en la materia. Mientras que alguna pequeña cantidad de ensayo y experimentación puede ser necesaria para optimizar la producción de un sistema indicador de esterilización adecuado y la conducción de un proceso de esterilización adecuado que emplea el sistema indicador de esterilización divulgado, cualquier tal ensayo o experimentación será solo mínima.

En la presente invención la detección de organismos viables se realiza mediante el seguimiento de una señal electrónica resultante de la aparición de un azúcar sencillo en una población de esporas en germinación de los organismos. Solo las esporas viables que han sobrevivido las condiciones de esterilización pueden expresar esta actividad y así la aparición de un azúcar sencillo es un indicador positivo de esporas viables (un estado de FALLO cuando se evalúa el rendimiento de esterilización). Al contrario, la ausencia del azúcar sencillo en estas condiciones de prueba es una indicación de que ninguna espора en el indicador biológico permanece viable (un estado de PASO para rendimiento del esterilizador eficaz).

En una forma de realización, la presente invención usa o adapta para uso un glucómetro, tal como uno usado para la determinación no enzimática de las concentraciones de glucosa en sangre para pacientes diabéticos. Sin embargo, hay una diferencia crucial entre la presente invención y el uso conocido de tales glucómetros, y esa se refiere a la concentración del monosacárido, por ejemplo, glucosa, que se determina. Las concentraciones de glucosa en sangre generalmente varían desde aproximadamente 2 mM (milimolar) hasta aproximadamente 30 mM. Las concentraciones del monosacárido, por ejemplo, glucosa, determinadas según la presente invención son mucho menores, aproximándose a los límites de la instrumentación existente. Como se sabe, el límite de detección cuando se usa, por ejemplo, electrodos modificados de nanohilo de CuO y un método cronoamperométrico de potencial fijado es aproximadamente 0,0005 mM, o 4 log menor que las concentraciones estándar de glucosa en sangre. Como se sabe, el límite de detección cuando se usan polímeros molecularmente impresos injertados en electrodos de oro ("MIP Au") es aproximadamente 2×10^{-6} mM, o 6 log menor que las concentraciones estándar de glucosa en sangre, cuando se usan métodos de potencial de barrido de seguimiento electrónico. Los límites de detección anteriores se divulgan en *Electrochemical Non-Enzymatic Glucose Sensors: A Perspective and an Evaluation*, Kathryn E Toghil y Richard Compton; *Int. J. Electrochem. Sci.*, 5 (2010) 1246-1301. Mientras que hay ejemplos de sensibilidades mayores, lo anterior claramente demuestra la desviación significativa de la presente invención de los métodos comerciales existentes.

Según formas de realización de la presente invención, los límites de detección de concentraciones del monosacárido, por ejemplo, glucosa, que indicarían la presencia de esporas viables en germinación, que sobrevivieron el proceso de esterilización mejorarían mucho sobre los indicadores de esterilización del estado de la técnica y con respecto a determinaciones de glucosa en sangre. Los límites de detección mejorados proporcionan determinaciones mucho más rápidas de la eficacia del proceso de esterilización que se prueba. Esto es porque, si ha fallado el proceso de esterilización, y han sobrevivido las esporas, según las esporas empiezan a germinar, las concentraciones iniciales del monosacárido serán muy bajas. Al permitir la detección de concentraciones muy bajas del monosacárido, con la presente invención, el retraso de tiempo antes de que se detecte cualquier monosacárido se puede reducir a minutos o incluso segundos, comparado con las horas o días requerido por indicadores de esterilización convencionales. Esto representa una mejora importante y significativa con respecto a indicadores de esterilización convencionales.

Un factor que posiblemente puede limitar el nivel más bajo que se puede detectar por la presente invención es la pureza del disacárido, oligosacárido o polisacárido usado en el medio de crecimiento. Si estos sacáridos superiores son impuros y contienen cantidades significativas del monosacárido asociado, puede ser necesario purificar más el disacárido. Alternativamente o además, se pueden analizar muestras blanco para determinar un nivel basal, usando el mismo medio de crecimiento pero sin esporas, muertas o vivas. En tal caso, la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando el monosacárido se oxida por los electrodos sería esa señal que supera cualquier señal basal que se obtiene usando las muestras blanco.

La presente invención, en una forma de realización, se refiere al uso de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, que son el organismo indicador aceptado para la evaluación de ciclo de esterilizador usando vapor y peróxido de hidrógeno vapor. La presente invención, en otra forma de realización, se refiere al uso de esporas de *Bacillus atrophaeus*, que son el organismo indicador aceptado para esterilizadores que usan óxido de etileno y calor seco como esterilizante. La presente invención es única en el uso de un oligosacárido añadido (por ejemplo, maltosa) como el sustrato para glucosidasa asociada a esporas, natural (por ejemplo, alfa-glucosidasa) para generar niveles crecientes de azúcares sencillos, por ejemplo, glucosa, como el analito cuya posible aparición a partir de esporas viables tras la esterilización se sigue al evaluar la eficacia del proceso de esterilización relevante. La ausencia de

niveles emergentes del azúcar sencillo es la indicación de que las esporas del indicador de esterilización ya no son viables y por tanto evidencia de un proceso de esterilización con éxito. A la inversa, la presencia de niveles emergentes del azúcar sencillo, que es el subproducto de esporas viables en germinación, es la indicación del fallo del esterilizador para producir las condiciones necesarias para una esterilización con éxito. Este mismo proceso se podría usar con otras enzimas asociadas a esporas (por ejemplo, beta-galactosidasa) para convertir otros di-, oligo- o polisacáridos (por ejemplo, lactosa) para generar el azúcar sencillo analito, por ejemplo, glucosa. Puesto que la presencia de enzimas asociadas a esporas activas, o su producción después del suceso de esterilización en evaluación, se produce muy pronto en el proceso de germinación, los organismos indicadores todavía tendrán todas las propiedades morfológicas y de membrana de las esporas, aunque en el punto en el que el azúcar sencillo se detecta, las esporas están solo empezando a germinar. En una forma de realización preferida, el hidrato de carbono suplementado es maltosa que tiene beneficios particulares. Como el primer beneficio, el disacárido no interacciona con el electrodo para producir una señal sin interacción con esporas viables, en germinación que expresan la enzima activa, por ejemplo, glucosidasa. Como otro beneficio, la maltosa proporciona dos moléculas de glucosa más que una, que es el caso para muchos otros potenciales azúcares complejos como lactosa. Se podrían usar otras enzimas naturales de la espora, como beta-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 glucosa en la solución de prueba. En cualquier caso, el producto del primer paso (por ejemplo, glucosa) interaccionaría con el biosensor de electrodos del ejemplo citado para producir la señal detectable de la presente invención. Un tercer beneficio es la capacidad de usar un biosensor de glucosa de mano para la detección y evaluación de los resultados que producen la designación PASA o FALLA con respecto a las esporas indicadoras viables restantes. El uso de tal biosensor permite tiempos de lectura desde segundos a minutos que también es nuevo en el campo de seguimiento de ciclos de esterilización.

Una ventaja importante de la presente invención es el tiempo de lectura más rápido para indicadores biológicos. Además, puesto que la señal se mide de forma electrónica existe la oportunidad de acondicionar y amplificar la señal. Además, con un algoritmo sencillo que correlaciona la relación directa de corriente de oxidación respecto a cantidad de azúcar sencillo no se requerirá la interpretación de PASA o FALLA por el usuario. Otra ventaja sobre tecnología similar es que es independiente de cualquier enzima añadida que añade coste, reduce el periodo de validez y somete el rendimiento del sensor biológico a difusión de velocidad limitante e influencias de la cinética enzimática.

La aplicación de la detección de glucosa no enzimática en análisis de sangre (para la que hay una gran cantidad de datos disponibles) está influida por inhibidores encontrados en la sangre y suero y se debe usar en condiciones fisiológicas incluyendo pH neutro. Puesto que estos inhibidores no están presentes en preparaciones de esporas usadas en el sistema indicador de esterilización de la presente invención, y puesto que se pueden usar intervalos mucho más amplios de temperatura, pH, fuerza iónica u otras condiciones con esporas, tales condiciones se pueden ajustar para optimizar las necesidades electrocatalíticas del sistema de electrodos sin tener en cuenta las restricciones de mantener condiciones fisiológicas. Por ejemplo, se puede alcanzar una sensibilidad mucho mayor a valores de pH que no sería posibles en otros sistemas indicadores biológicos basados en enzimas.

Mientras que los principios de la invención se han explicado en relación a ciertas formas de realización particulares, estas formas de realización se proporcionan para fines de ilustración.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema indicador de esterilización (10), que comprende:
 - 5 esporas de una o más especies de microorganismo;
 - un vial que comprende un primer compartimento opcional y un segundo compartimento que contiene un medio de crecimiento que comprende uno o más de un disacárido, un oligosacárido o un polisacárido capaces de conversión a un monosacárido por esporas en germinación de las una o más especies de microorganismo, estando el vial adaptado para combinar los contenidos del segundo compartimento con las esporas para
 - 10 análisis después de que el vial se haya expuesto a un esterilizante;
 - una tira electroconductora (400) que comprende tres electrodos (402a, 402b, 402c) adaptados para oxidar el monosacárido y transportar una señal eléctrica resultante de la oxidación del monosacárido, en donde los tres electrodos (402a, 402b, 402c) están adaptados para proporcionar contacto con los contenidos combinados del segundo compartimento y las esporas durante y/o después de la incubación;
 - 15 la tira (400) incluye además componentes electrónicos (404) adaptados para proporcionar comunicación eléctrica entre los electrodos (402a, 402b, 402c); y
 - un aparato enlazado o enlazable a los tres electrodos (402a, 402b, 402c) y adaptado para detectar y medir la señal eléctrica resultante de la transferencia de electrones cuando el monosacárido es oxidado por los tres electrodos (402a, 402b, 402c),
 - 20 en donde el sistema está libre del monosacárido antes de la exposición al esterilizante.
2. El sistema indicador de esterilización (10) de la reivindicación 1 en donde el primer compartimento está ausente, las esporas se disponen en la tira (400), y la tira (400) inicialmente está separada del segundo compartimento.
- 25 3. El sistema indicador de esterilización (10) de la reivindicación 1 en donde el primer compartimento está presente, las esporas se disponen en la tira (400), y la tira (400) inicialmente está separada tanto del primer compartimento como del segundo compartimento.
- 30 4. El sistema indicador de esterilización (10) de la reivindicación 1 en donde el primer compartimento está presente, las esporas se disponen en el primer compartimento, y la tira (400) inicialmente está separada tanto del primer compartimento como del segundo compartimento.
- 35 5. El sistema indicador de esterilización (10) de la reivindicación 1 en donde el primer compartimento está presente, las esporas se disponen en el primer compartimento, y la tira (400) inicialmente está en el primer compartimento.
- 40 6. El sistema indicador de esterilización (10) de la reivindicación 1 en donde el primer compartimento está presente, las esporas se disponen en la tira (400), y la tira (400) inicialmente está en el primer compartimento.
- 45 7. El sistema indicador de esterilización (10) de la reivindicación 1 en donde el primer compartimento está presente, las esporas se disponen en el primer compartimento, y la tira (400) inicialmente está en el segundo compartimento.
8. El sistema indicador de esterilización (10) de cualquier reivindicación precedente en donde el monosacárido es glucosa.
9. El sistema indicador de esterilización (10) de cualquier reivindicación precedente en donde la una o más especies de microorganismo comprende una o ambas de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*.
- 50 10. El sistema indicador de esterilización (10) de la reivindicación 8 en donde el aparato es un lector de glucosa.
11. El sistema indicador de esterilización (10) de cualquier reivindicación precedente en donde los tres electrodos (402a, 402b, 402c) son enlazables a un lector de glucosa por un enlace inalámbrico.
- 55 12. El sistema indicador de esterilización (10) de cualquier reivindicación precedente en donde el disacárido es maltosa que se convierte a glucosa por una glucosidasa producida por o presente en las esporas en germinación.
- 60 13. El sistema indicador de esterilización (10) de cualquier reivindicación precedente en donde los tres electrodos (402a, 402b, 402c) 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.

14. Un método para determinar la eficacia de un proceso de esterilización usando un sistema indicador de esterilización (10) de cualquier reivindicación precedente, en donde el método comprende, en el siguiente orden:

- 5 exponer las esporas a un esterilizante en un proceso de esterilización;
combinar las esporas con los contenidos del segundo compartimento, e incubar los contenidos combinados;
poner en contacto la tira (400) con los contenidos combinados antes y/o durante la incubación y oxidar cualquier monosacárido con los tres electrodos (402a, 402b, 402c);
enlazar el aparato a los tres electrodos (402a, 402b, 402c);
10 con el aparato unido a los tres electrodos (402a, 402b, 402c), detectar y medir cualquier señal eléctrica producida por los tres electrodos (402a, 402b, 402c) de la oxidación; y
determinar la eficacia del proceso de esterilización basado en la presencia o ausencia de la señal eléctrica.

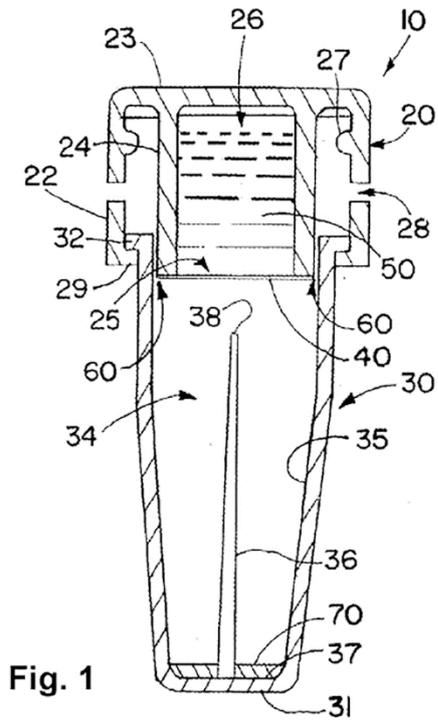


Fig. 1

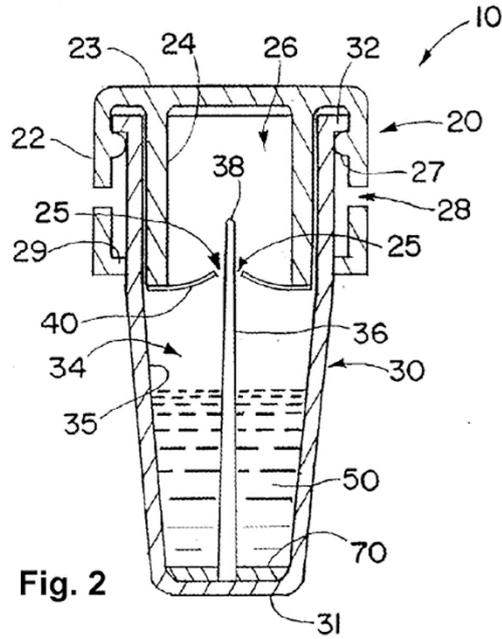


Fig. 2

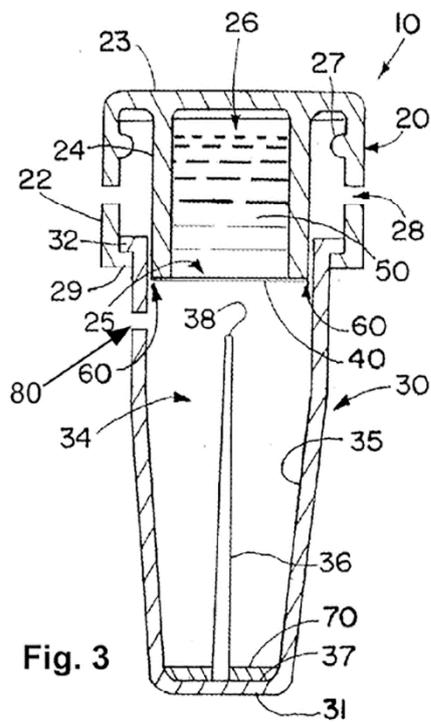


Fig. 3

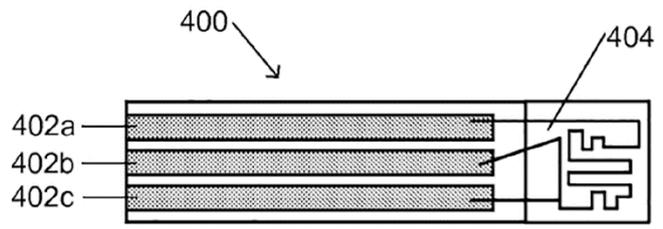


Fig. 4

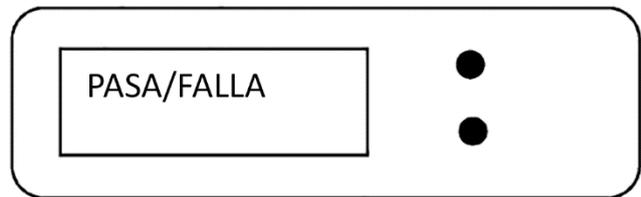


Fig. 5

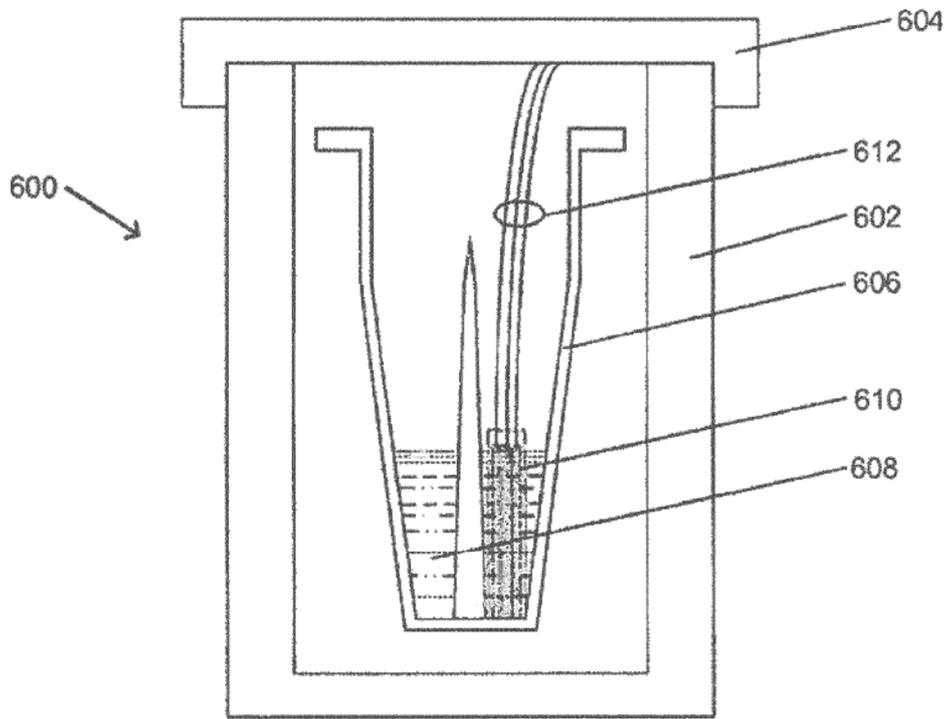


Fig. 6