



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 299**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94929883 .0**

86 Fecha de presentación : **26.09.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0720657**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.07.1996**

54 Título: **Métodos biológicamente pertinentes para la determinación rápida de la esterilización.**

30 Prioridad: **24.09.1993 US 126197**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

73 Titular/es: **3M Innovative Properties Company**
3M Center, P.O. Box 33427
St. Paul, Minnesota 55133-3427, US

72 Inventor/es: **Burnham, Jeffrey, C.;**
Hageage, George, J.;
Jambard-Sweet, Douglas y
Hendricks, Judy

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 288 299 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

Métodos biológicamente pertinentes para la determinación rápida de la esterilización.

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

10 La invención se refiere a los métodos para determinar rápidamente la eficacia de los procedimientos de esterilización utilizando indicadores que contienen materiales biológicamente relevantes que son funcionalmente comparables a los microorganismos vivos, pero sin ser organismos vivos. Los métodos y los aparatos de la invención son útiles en la industria de la asistencia sanitaria tal como hospitales, laboratorios e instituciones de investigación, en la tecnología de los alimentos y medioambiental, y en todas las tecnologías que utilizan la esterilización en la fabricación, producción o eliminación de residuos.

15 **2. Descripción de los antecedentes**

Principalmente en la industria de la asistencia sanitaria, pero también en muchas otras aplicaciones industriales, casi siempre es necesario monitorizar la eficacia de los procedimientos utilizados para esterilizar equipamiento tal como productos sanitarios, instrumentos y otros artículos que no son desechables. En estos escenarios, la esterilización se define generalmente como el procedimiento que destruye completamente todos los microorganismos viables incluidas estructuras tales como virus y esporas. La práctica estándar en estos hospitales es incluir un indicador de esterilidad en el lote de los artículos que se van a esterilizar. El uso de los indicadores de esterilidad proporciona un método directo y sensible de analizar lo mortífero que resulta el procedimiento de esterilización.

25 Un tipo estándar de indicador de esterilidad biológica incluye una cantidad conocida de esporas microbianas de prueba. Este indicador se coloca en la cámara de esterilización y se expone al procedimiento de esterilización junto con los objetos a esterilizar. A continuación, los microorganismos a comprobar, por ejemplo esporas de *Bacillus stearothermophilus* o de *B. subtilis*, se incuban durante un tiempo especificado en condiciones que favorecen la proliferación y se examina el posible crecimiento, que se determina mediante la presencia o la ausencia de determinados productos metabólicos, de cualquier microorganismo superviviente. El crecimiento positivo indica que el procedimiento de esterilización fue insuficiente para destruir todos los microorganismos. Mientras que el aparato para contener las esporas ha variado continuamente, no ha sido el caso del procedimiento general de detección de la esterilidad. Se describen variaciones de este tema en las patentes de los Estados Unidos n.º 3.239.429, 3.440.144, 4.596.773, 4.717.661, 35 4.732.850 y 5.167.923.

Los indicadores biológicos descritos en cada una de estas patentes contienen una preparación de esporas viables fabricadas a partir de un cultivo procedente de una cepa bacteriana específica y caracterizada por una resistencia predecible a la esterilización. A menudo, las esporas son el organismo de prueba en los indicadores biológicos convencionales porque son mucho más resistentes al procedimiento de esterilización que la mayoría de los organismos. Los indicadores son independientes, lo que significa que poseen las esporas y el medio de incubación en un solo contenedor. No es necesario añadir nada más para realizar la prueba. Después de la esterilización, la ampolla que contiene el medio de incubación se rompe para poner en contacto las esporas con el medio de crecimiento. A continuación se incuba el contenedor completo durante un tiempo especificado y se determinan y se graban los resultados.

Aunque la mayoría de los indicadores se han desarrollado después de 1975 y de la promulgación de la *Medical Devices Act* (Ley de dispositivos médicos), también hay indicadores biológicos que están en el mercado hoy en día y que se desarrollaron antes de 1976 y, por lo tanto, no están gobernados por los requisitos de la Ley. Estos indicadores biológicos comprenden esporas sobre un vehículo dentro de un envase. Después de ser expuesto al procedimiento de esterilización, el vehículo con las esporas se transfiere del envase al medio estéril y se incuba.

Un inconveniente importante de todos estos indicadores de esterilidad es la demora en la obtención de los resultados de la prueba de esterilidad. Estos indicadores de esterilidad normalmente requieren que los microorganismos se cultiven durante al menos dos, y a menudo hasta siete, días para garantizar que cualquier microorganismo superviviente se detecta de forma adecuada. Durante este tiempo, los productos que pasaron por el procedimiento de esterilización no se deben utilizar hasta que se hayan determinado los resultados de la prueba de viabilidad de las esporas. Un resultado de esporas viables indica que no se cumplieron las condiciones de esterilización adecuadas.

60 Muchas instalaciones de asistencia sanitaria tienen pocos recursos y deben reutilizar sus instrumentos “esterilizados” en menos de 24 a 48 horas, y a menudo inmediatamente. En estos escenarios, el periodo de carencia de siete días para verificar la esterilidad es poco práctico e ineficaz. El Centro para Dispositivos y Sanidad Radiológica (CDRH: *Center for Devices and Radiological Health*) de la Agencia Estadounidense del Medicamento (la FDA por sus siglas en inglés) permite incubaciones de menos de siete días para los nuevos productos sanitarios utilizados por las instalaciones de la asistencia sanitaria, siempre que el fabricante confirme los parámetros de incubación más cortos. Para la validación del tiempo de incubación por el CDRH se necesita un ciclo parcial que produce entre un 30 y un 80% de positivos (supervivientes). Un ciclo de esterilización parcial o incompleto es una exposición a un esterilizador que es inapropiado o ineficaz para la destrucción de microorganismos. El tiempo en el que el 97% de estos positivos muestra-

ron crecimiento es el tiempo de incubación aceptable. Utilizando estas directrices, no ha sido posible previamente que los fabricantes consigan una reducción del periodo de carencia a menos de 2 días.

5 Con estos indicadores biológicos comerciales tradicionales se necesitan aún demoras mayores debido a que hay que instruir a los técnicos y porque se debe disponer de equipamiento limpio en las salas. En algunos casos, es necesario que los técnicos de laboratorio expertos transfieran los microorganismos de prueba desde el envase del indicador de esterilidad al medio de incubación y, después, que utilicen su ojo entrenado para detectar el posible crecimiento de microorganismos en el medio de incubación. A pesar del uso de técnicos instruidos y de otras precauciones similares, de vez en cuando las pruebas producen resultados positivos falsos debido al error humano o a la contaminación del equipamiento limpio en las salas. Como consecuencia, se deben reesterilizar los productos, lo que ocasiona más demoras y un aumento de los costes.

15 Se deben seguir determinados estándares de la industria para asegurar la eficacia del indicador de esterilidad. Estos estándares se refieren a la sensibilidad y la forma del microorganismo empleado, tal como una spora, para el procedimiento de esterilización específico. La uniformidad del producto para garantizar el funcionamiento coherente de un lote al siguiente es muy importante. Otro factor importante es la biocarga natural, el número de microorganismos sobre el producto a esterilizar o en él. El reto para el procedimiento de esterilización excede el reto de la biocarga natural cuando se utiliza el indicador biológico dentro de sus características de funcionamiento. Para cumplir estos estándares de la industria, algunos de los indicadores de esterilidad actualmente disponibles requieren técnicas de manejo complicadas además de periodos de incubación largos.

20 Se ha descrito recientemente, en la patente de los EE. UU n.º 5.073.488, el uso de una enzima y su posterior actividad como un indicador en un intento de solucionar la demora de la detección de la esterilidad.

25 La técnica implica someter una enzima a un ciclo de esterilización. Después de terminar el ciclo de esterilización, se incuba la enzima con un sustrato que se altera con las enzimas y se transforma en un producto detectable. La detección del producto modificado enzimáticamente se realiza por colorimetría o fluorimetría. Las desventajas asociadas a este método residen en que sólo se puede utilizar una enzima en el análisis de esterilidad. Aunque la patente de los EE. UU n.º 5.073.488 no menciona que se contemple la utilización de varias enzimas, cada enzima se mediría aisladamente y no están necesariamente relacionadas por interactividad, ni tan siquiera funcionalmente. No había ningún fundamento racional para utilizar una interacción biológica compleja para imitar el comportamiento de las esporas viables, o que la reacción de la enzima se pudiera amplificar para demostrar una reacción positiva mucho más rápidamente que mediante un análisis enzimático tradicional. A menudo, también se necesitaba un equipamiento especializado para detectar el producto fabricado por la única enzima.

35 **Compendio de la invención**

40 La invención proporciona métodos y aparatos para determinar la eficacia de un ciclo de esterilización sobre la base de la actividad de varias enzimas interactivas que se obtienen de microorganismos. Con estos métodos, la verificación de la esterilidad se consigue muy rápidamente. La invención combina la fiabilidad de los indicadores biológicos convencionales con la velocidad de técnicas más cercanas a las utilizadas por otros indicadores enzimáticos y químicos, y permite la utilización de profesionales con una formación mínima al mismo tiempo que permite conseguir resultados coherentes y fiables.

45 Una realización de la invención se refiere a un procedimiento biológico para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización, que puede ser sin microorganismos. El procedimiento comprende:

50 a) colocar un indicador que contiene uno o más componentes de una serie de sistemas enzimáticos interactivos en una cámara de esterilización;

b) realizar el procedimiento de esterilización dentro de la cámara;

55 c) añadir los componentes restantes de los numerosos sistemas enzimáticos interactivos a uno o más componentes en el indicador para formar una mezcla; e

d) incubar la mezcla durante un primer periodo de tiempo suficiente para detectar la presencia o la ausencia de un producto para determinar la eficacia del procedimiento de esterilización.

60 Según este método, la interacción biológica sólo se producirá si los componentes sometidos al procedimiento de esterilización no se han destruido o no se han inactivado de algún modo. Los componentes incluyen las propias enzimas, los sustratos para las enzimas y los enzimas, catalizadores, cofactores u otros reactivos necesarios del sistema enzimático. La relación entre los componentes del sistema enzimático es muy importante para una determinación de la esterilidad porque no es simplemente una reacción química o enzimática, sino una interacción enzimática que es reflejo del estado fisiológico de los microorganismos de dentro de la cámara. Este grado de correlación es muy elevado y de una naturaleza fundamentalmente diferente que la proporcionada con los métodos en uso.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento biológico para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización tal y como se describió anteriormente en el que los diversos sistemas enzimáticos interactivos

ES 2 288 299 T3

comprenden un ciclo enzimático seleccionado del grupo que consiste en ciclo fútil, ciclo del sustrato, ciclo de la galactosidasa, ciclo del ácido nítrico o el ciclo del ácido tricarbóxico, un ciclo malato/isocitrato, un ciclo de oxidación-reducción acopladas como la conversión del α -cetoglutarato a glutamato y fosfogluconato, fosforilación cíclica, glucólisis, incluidos los ciclos cinasa fosfatasa, o una combinación de los mismos. Según este método, uno o más componentes del ciclo biológico se someten al procedimiento de esterilización tras el cual se añaden los restantes componentes del ciclo para iniciar el ciclo. La inactivación de cualquier componente inhibe la terminación del ciclo y la creación de una cantidad significativa de producto, lo que indica que se ha completado el procedimiento de esterilización con éxito.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento biológico para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización tal y como se describe anteriormente, en el que el sistema interactivo comprende un sistema de amplificación enzimática tal como una cascada de coagulación/fibrina, una cascada del complemento, una cascada de tripsina/tripsinógeno o una combinación de las mismas. Las propias enzimas se amplifican lineal o logarítmicamente durante la incubación con el sustrato, lo que produce una fabricación rápida del sustrato modificado enzimáticamente, o producto, que se detecta fácilmente.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento de dos fases para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización. El procedimiento comprende:

a) colocar un indicador que contiene uno o más componentes de una serie de sistemas enzimáticos interactivos y una muestra de microorganismos en una cámara de esterilización;

b) realizar el procedimiento de esterilización dentro de la cámara,

c) retirar el indicador de la cámara,

d) añadir los restantes componentes de los diferentes sistemas enzimáticos interactivos a uno o más componentes en el indicador para formar una mezcla, y añadir un medio líquido a la muestra de microorganismos para formar un cultivo;

e) incubar la mezcla durante un primer periodo de tiempo suficiente para detectar la presencia o la ausencia de un producto para realizar un primer paso de determinación de la eficacia del procedimiento de esterilización; y

f) incubar el cultivo durante un segundo periodo de tiempo suficiente para detectar la presencia o la ausencia de un producto metabólico de la muestra de microorganismos para realizar una segunda etapa de determinación de la eficacia del procedimiento de esterilización.

En este procedimiento de dos fases se puede realizar una determinación inicial de esterilidad muy rápida seguida de otra segunda etapa de comprobación que implica el cultivo real de los propios microorganismos biológicamente importantes tratados con la esterilización.

También se proporciona:

Un procedimiento sin microorganismos para determinar la supervivencia de un microorganismo de un entorno esterilizante que comprende las etapas secuenciales de:

a) exponer uno o más componentes de diferentes sistemas enzimáticos interactivos a un entorno esterilizante;

b) añadir los componentes restantes de los diversos sistemas enzimáticos interactivos a uno o más componentes sometidos al entorno esterilizante; y

c) detectar la actividad de los diversos sistemas enzimáticos interactivos para determinar la supervivencia del microorganismo del entorno esterilizante.

Otra realización de la invención se refiere a un indicador para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización que comprende un contenedor exterior que tiene paredes impermeables a los líquidos y que no absorben gases, al menos una abertura en las paredes exteriores del contenedor cubierta con una tapa que permite el paso de los gases, conduciendo dicha, al menos una, abertura a una cámara que contiene numerosos sistemas enzimáticos interactivos sin microorganismos con una barrera que permite el paso de los gases entre los sistemas enzimáticos y la, al menos una, abertura. Estos componentes se pueden fijar a un soporte sólido que flota libremente en una disolución no acuosa o parcialmente acuosa. Los indicadores pueden ser totalmente independientes, en los que, después de la esterilización, el usuario simplemente coloca los dos viales dentro del indicador, uno que contiene algunos componentes y el otro el resto de componentes del sistema enzimático, para mezclar sus contenidos. Si se encuentra presente cualquier actividad enzimática, las enzimas más las coenzimas, cofactores y catalizadores necesarios interactuarán con el sustrato para formar un producto detectable que se puede analizar para determinar la eficacia del procedimiento de esterilización.

ES 2 288 299 T3

Otras realizaciones y ventajas de la invención se presentan en parte en la descripción que sigue y, en parte, serán obvias a partir de su descripción, o se pueden aprender a partir de la práctica de la invención.

Descripción de los dibujos

5

Figura 1. Esquema genérico de la interacción de las enzimas y el revelado del color en un disco de celulosa.

Figura 2. Esquema específico de una interacción de dos enzimas de alcohol deshidrogenasa/diaforasa y el producto modificado enzimáticamente, compuesto que se forma como resultado de una reacción catalizada por enzimas, revelándose el color sobre un disco de celulosa.

Figura 3. Esquema específico de una interacción de tres enzimas de fosfatasa alcalina/alcohol deshidrogenasa/diaforasa y revelado del color sobre un disco de celulosa.

15 Figura 4. Esquema específico de una sola enzima (fosfatasa alcalina) sobre un modelo de disco con una interacción enzimática adicional posterior al esterilizador (alcohol deshidrogenasa) para la amplificación y el revelado del color sobre un disco de celulosa.

Figura 5. Comparación de la termoestabilidad y el grado de reacción de un solo componente (enzima) inmovilizado frente a varios componentes (enzimas) inmovilizados sobre discos.

Figura 6. Diagrama de la estructura del contenedor.

Figura 7. Diagrama del funcionamiento preferido de un contenedor con numerosos componentes.

25

Figura 8. Fotografía de discos de muestra con las densidades de color informatizadas.

Figura 9. Relación entre el sistema multienzimático y la inactivación de las esporas viables de *Bacillus stearothermophilus*.

30

Figura 10. Diagrama de un soporte sólido estratificado.

Descripción de la invención

35 La invención soluciona los problemas y las desventajas asociados a las estrategias y diseños actuales, y da a conocer nuevos métodos y aparatos para determinar la esterilidad microbiana. Generalmente, se han utilizado los organismos vivos tales como las esporas bacterianas como indicadores para analizar los procedimientos de esterilización para demostrar que las condiciones eran suficientes para exterminar de manera eficaz cualquier posible vida dentro de un área definida. Con los indicadores de esterilidad tradicionales que contienen esporas vivas no se puede determinar la

40 viabilidad de las esporas con ningún grado de precisión significativo. Las condiciones varían enormemente durante la fabricación, transporte, almacenamiento y uso. La viabilidad de las esporas a lo largo estas condiciones inconstantes no se puede calcular con precisión. Simplemente hay demasiadas variables a considerar, y los requisitos para la variabilidad, al menos los pocos que son definibles de manera clara, son tan diversos como las composiciones genéticas de las propias esporas.

45

Si se pueden concebir las esporas bacterianas como redes de sistemas enzimáticos en interacción rodeados de una pared celular, entonces, cuando las esporas bacterianas pierden su viabilidad debido a la esterilización, también se pueden inactivar algunos sistemas enzimáticos dentro de la espora. En consecuencia, puede ser posible utilizar sistemas enzimáticos interactivos en vez de esporas para determinar si se cumplieron las condiciones de esterilización. Estos métodos deben cumplir los estándares de la FDA para los indicadores biológicos de esterilidad, deberían ser muy eficaces, de fácil estandarización y fáciles de utilizar para permitir que incluso quienes estén mínimamente instruidos consigan unos resultados fiables sin ayuda de una formación, gastos o instrumentación especializadas. Tampoco habría riesgo de contaminación microbiana asociada a los propios indicadores porque ninguna espora ni otros microorganismos se podrían introducir en la cámara a pesar del hecho de que los indicadores proporcionan el análisis más

50

55 biológicamente afín disponible.

La invención da a conocer los procedimientos y los aparatos para determinar la eficacia de un ciclo de esterilización basado en la recuperación de la actividad de varios sistemas enzimáticos interactivos obtenidos de microorganismos. Utilizando los procedimientos de la invención, se determina la verificación de la esterilidad a partir de la terminación de los resultados de la prueba que, sorprendentemente, se pueden conseguir muy rápidamente debido a que la fiabilidad de los indicadores biológicos convencionales se combina con la velocidad de las técnicas que son cercanas a las utilizadas por los indicadores enzimáticos y químicos. Además, y a diferencia de las esporas, a los sistemas enzimáticos que contienen enzimas, coenzimas, catalizadores, sustratos u otros reactivos de un sistema interactivo, se les determina la viabilidad como la estabilidad, y la estabilidad se puede cuantificar con mucha precisión de forma individual así como en sistemas multienzimáticos. Por lo tanto, con los sistemas enzimáticos interactivos no sólo se aumenta la velocidad, sino que también se puede conseguir un nivel de estandarización claramente superior al obtenido con las técnicas biológicas convencionales u otras técnicas enzimáticas.

60

65

La invención proporciona la verificación del procedimiento de esterilización en menos de 60 minutos, preferiblemente en unos 5 a 15 minutos y más preferiblemente en menos de aproximadamente 1 minuto. Esto aumenta considerablemente la eficacia y la seguridad globales operativas del equipamiento de asistencia sanitaria al verificar la esterilidad antes de utilizar los artículos procesados. La invención implica la detección rápida de cualquier actividad enzimática interactiva superviviente, lo que se relaciona directamente con la probabilidad estadística de que sobreviva alguna espora biológica u otros microorganismos en una muestra de prueba. Los sistemas enzimáticos interactivos comprenden grupos o colecciones de enzimas, que incluyen coenzimas, cofactores, catalizadores, sustratos y cualquier otro reactivo necesario. La interactividad de grupo es fundamentalmente diferente de cualquier actividad sola o combinación de actividades individuales porque, sorprendentemente, proporciona un reflejo mucho más exacto del procedimiento biológico sin necesidad de microorganismos vivos. Además, proporciona una mayor flexibilidad con respecto a las diferentes técnicas de esterilización, proporciona una garantía de la esterilidad que no está disponible con las técnicas convencionales y proporciona un intervalo más amplio de garantía de esterilidad para microorganismos distintos. Por ejemplo, algunas moléculas orgánicas estables al calor que se encuentran débilmente asociadas a una enzima a menudo son necesarias para que continúe dicha reacción enzimática, y son necesarias para el funcionamiento de otras enzimas en el grupo. La inactivación de estas moléculas, que no se correlacionarían necesariamente con la ausencia de actividad de una enzima aislada, se correlaciona con la esterilidad.

En una realización de la invención, el procedimiento comprende someter a un procedimiento de esterilización al menos uno, y preferiblemente numerosos, componentes de un sistema enzimático. El sistema enzimático comprende una mezcla conocida de enzimas, coenzimas, catalizadores, cofactores, sustratos, otros reactivos de reacción o combinaciones de los mismos, que se aloja en un indicador, preferiblemente en un medio no acuoso o sólo parcialmente acuoso. Los componentes tienen una actividad interdependiente que se correlaciona con la viabilidad de los microorganismos utilizados en los indicadores biológicos del estado actual de la técnica. Después de que se termine el procedimiento esterilizante, se retira, si es necesario, el indicador de la cámara de esterilización y se hace reaccionar con una mezcla específica de reactivos indicadores, los componentes que quedan del sistema. Se observa un resultado positivo sólo cuando cada componente expuesto sobrevive a la desnaturalización y es capaz de funcionar interactivamente para producir un producto detectable modificado enzimáticamente. El producto modificado enzimáticamente, como un indicador de la actividad residual, es detectable a simple vista en 1 a 60 minutos. Cualquier cambio detectado, que es preferiblemente un cambio de color, es una indicación al observador de que el ciclo de esterilización no había inactivado determinados componentes y, por lo tanto, era insuficiente para asegurar la esterilización de otros artículos durante el procedimiento de esterilización. Y al contrario, una ausencia de un cambio de color indica que el procedimiento de esterilización había inactivado al menos uno de los componentes, lo que evitó que tuviera lugar la reacción interactiva y, por lo tanto, un equivalente de detectar rápida y directamente la supervivencia de las esporas bacterianas en una prueba convencional similar. Dicho de otro modo, la ausencia de un producto detectable modificado enzimáticamente dentro del periodo de tiempo establecido indica que un ciclo de esterilización ha sido mortal para el funcionamiento del sistema enzimático interactivo así como mortal para una población de 10^6 esporas viables de *Bacillus stearothermophilus*. Generalmente, estos valores se expresan como valores D , que es el tiempo que se tarda, a una determinada temperatura, en reducir la población viable de los microorganismos de prueba a un 10% de su valor original.

El procedimiento de esterilización útil en la práctica de la invención puede ser, por ejemplo, un procedimiento de vapor a presión o esterilización en el autoclave, un procedimiento químico que utiliza el óxido de etileno u otro producto químico adecuadamente mortal, calor seco de temperaturas entre unos 50°C a unos 200°C, e irradiación que incluye las radiaciones gamma, beta y otras radiaciones. Estos procedimientos se utilizan en la industria de la asistencia sanitaria, pero también en industrias relacionadas con la tecnología medioambiental, la fabricación de alimentos, la eliminación de residuos y en las tecnologías en las que se necesita una esterilidad absoluta o casi absoluta.

El indicador, que contiene al menos uno y, preferiblemente, una colección de componentes de un sistema enzimático definido sobre un soporte sólido o en disolución, se coloca en una cámara de esterilización. El procedimiento de esterilización se realiza dentro de la cámara y, si es necesario, se retira el indicador de la cámara, y los componentes restantes del sistema se añaden al indicador para formar una mezcla. A continuación se incuba la mezcla durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que se forme el producto a partir de la interacción de las enzimas con el sustrato. Utilizando la radioactividad, la actividad enzimática, eléctrica o fluorimétrica, o de algún otro modo, un sustrato detectablemente marcado, el producto se detecta utilizando técnicas convencionales para determinar la eficacia del procedimiento de esterilización. Según este procedimiento, la interacción biológica sólo se producirá si el(los) componente(s) sometido(s) al procedimiento de esterilización no se han destruido o no se han inactivado de algún modo. La relación entre los componentes es muy importante para una determinación de la esterilidad porque no es simplemente una reacción química o enzimática, sino una interacción enzimática que refleja el supuesto estado fisiológico de los microorganismos dentro de la cámara.

La capacidad de los métodos de la invención para determinar rápidamente la capacidad de destrucción de un ciclo de esterilización se basa en el descubrimiento de que la supervivencia de la capacidad funcional de un sistema enzimático es necesaria para la producción de un producto modificado enzimáticamente. La rapidez con que se forma el producto modificado enzimáticamente a partir de las enzimas interaccionantes se debe, al menos en parte, a la inmovilización en la que la estrecha cercanía de dos o más componentes del sistema enzimático sobre un soporte sólido común de tal forma que está limitado el intercambio controlado por difusión con la mayor parte de la disolución. Este procedimiento se complementa además al canalizar componentes, o unir entre sí, dos o más componentes de reacciones secuenciales en una superficie o microentorno para limitar adicionalmente el intercambio controlado por

difusión con la mayor parte de la disolución. La canalización de componentes en relación con las enzimas se describe en I. Gibbons *et al.* (*Meth. Enzymol.* 136: 93-103, 1987).

La capacidad que tienen los componentes de un sistema enzimático para sobrevivir en condiciones en las que sólo se destruirán parcialmente los microorganismos de prueba es dependiente del uso de una barrera semipermeable hidrófoba entre el esterilizador y las enzimas, y de que el sistema enzimático interactivo siga siendo activo después de un ciclo de esterilización que sea insuficiente para destruir los microorganismos de prueba. Esto proporciona una correlación directa de la viabilidad de las esporas con la actividad interactiva de las enzimas del sistema que, después de un ciclo de esterilización inadecuado, es suficiente para convertir un sistema de sustrato para las enzimas en una concentración del producto detectable a simple vista dentro de un tiempo relativamente corto, preferiblemente de 1 a 60 minutos. El fundamento para la correlación entre la actividad enzimática y otros componentes en función de la germinación y el crecimiento de microorganismos se debe a la concordancia de ambos en relación con la fiabilidad de que funcionan las coenzimas y los sistemas enzimáticos interaccionantes obtenidos biológicamente. Normalmente, la supervivencia de las enzimas antes de la esterilización es óptima en un entorno no acuoso. El medio no acuoso mejora la estabilidad y también crea una barrera semipermeable dependiente del tiempo para el esterilizador.

El indicador de esterilidad demuestra que existe una correlación directa entre las condiciones para destruir un microorganismo y las condiciones para inactivar un componente de una red de enzimas interaccionantes. En el caso de un sistema enzimático interactivo de amplificación, si uno cualquiera de los componentes clave, enzimas, coenzimas, cofactores, sustratos, catalizadores u otros reactivos, del sistema se inactiva totalmente al añadir una disolución indicadora, no se producirá ningún cambio de color.

Las enzimas útiles en la práctica de la presente invención son enzimas, incluidas las enzimas microbianas intra- y extracelulares, cuyas actividades interdependientes se correlacionan con la germinación y el crecimiento de microorganismos que se utilizan normalmente en indicadores de esterilidad biológicos en el estado actual de la técnica, de aquí en adelante citados como microorganismos de prueba. Por "se correlaciona" se quiere decir que la interacción enzimática se puede utilizar para predecir el crecimiento futuro de los microorganismos viables residuales que permanecen después de una esterilización parcial, inadecuada o fallida. Los componentes son los que, después de un ciclo de esterilización inadecuado que no llega a ser mortal para los microorganismos de prueba, siguen siendo suficientemente activos para reaccionar con los componentes que quedan de un sistema enzimático que produce un producto detectable modificado enzimáticamente en 1 a 60 minutos, incluso estando inactivados después de la exposición al esterilizador que sería mortal para los microorganismos de prueba. Preferiblemente, este producto sería detectable a simple vista. Los ejemplos de enzimas interactivas incluyen casi cualquier combinación de, generalmente, una sintasa y una catabolasa tales como transferasas y epimerasas; fosfatasa y cinasas o fosforilasas; deshidrogenasas e hidrogenasas o diaforasas; oxidasas y desoxidasas; esterases o diesterases y polimerasas; fosfatasa, deshidrogenasas y diaforasas; deshidrogenasas y reductasas; y deshidrogenasas y oxidorreductasas. Estas enzimas catalizan la interconversión de uno o más sustratos y, normalmente, en asociación con una coenzima o un cofactor.

Ejemplos de coenzimas y cofactores útiles en la invención incluyen dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), NADH, NADP, NADPH, acetilo, biotina, coenzima-A (CoA), componentes del sistema del complemento, pirofosfato de tiamina (TPP), fosfato de piridoxal, cobamida, tetrahidrofolato, flavina y hemo. Estas enzimas catalizan la transferencia de grupos acilo (CoA), la transferencia de grupos derivados de una cetona (TPP), la transferencia de CO₂ (biotina), la transaminación, descarboxilación y racemización de aminoácidos (fosfato de piridoxal), las transferencias y reducciones de grupos carbono (tetrahidrofolato), y las transferencias de grupos metilo (cobamida). Las reacciones redox también juegan un papel importante en el metabolismo biológico y sus cofactores asociados incluyen, en orden de potencial decreciente, ferredoxina, ácido lipoico, NAD y NADP, flavinas y hemos. Las flavinas en las flavoproteínas y los hemos en los citocromos están estrechamente unidos a la proteína y funcionan más como grupos prostéticos que como cofactores en sentido estricto. Otros catalizadores también pueden ser componentes indispensables de un sistema enzimático. Ejemplos de catalizadores típicos incluyen los aniones o cationes de metales, otros elementos simples o algunas sustancias complejas tales como un polímero polisacárido, un lípido u otro ácido graso, una membrana o una sustancia inerte. Los componentes que son sustratos incluyen, por ejemplo, sacáridos o polisacáridos, ácidos nucleicos o nucleótidos, productos químicos y compuestos químicos, ácidos grasos, aminoácidos o péptidos, y otros sustratos más especializados tales como el bromuro de difenil-tetrazolio, el violeta de feniltetrazolio y el cloruro de ditetrazolio, que son detectables a simple vista. Los componentes se pueden detectar utilizando sustratos marcados que se convierten en productos identificables utilizando marcadores tales como una sustancia cromógena, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente, un estereoisómero, una sustancia metálica, un isótopo estable o un isótopo radioactivo. Cada uno de estos componentes tanto si son enzimas, coenzimas, catalizadores o sustratos de un sistema enzimático se pueden someter a un procedimiento de esterilización tal y como se describe en la presente memoria para verificar la esterilidad en un procedimiento más relevante desde el punto de vista biológico que el que está disponible en la actualidad.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento biológico para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización tal y como se describió anteriormente, en el que los componentes de un sistema enzimático interactivo comprenden un ciclo interactivo tal como un ciclo de fructosa (en el que se interconvierte la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-difosfato mediante la acción de cinasas y fosfatasa), la glucólisis que incluye ciclos cinasa/fosfatasa, el ciclo de la galactosidasa (en el que se interconvierte la galactosa-1-fosfato en glucosa-1-fosfato mediante la acción de uridiltransferasas y de epimerasas), un ciclo de sustrato o fútil (un ciclo enzimático que virtualmente no realiza nada salvo la escisión de un nucleótido trifosfato (NTP) en un nucleótido difosfato (NDP) tal como ATP en ADP o GTP

ES 2 288 299 T3

en GDP mediante la acción de cinasas y fosfatasa), el ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbónicos (en el que se interconvierte el piruvato en ácido oxaloacético en un procedimiento de varias etapas en el que intervienen fosfatasa, cinasas, epimerasa, fosforilasa y transferasa), la fosforilación cíclica, un ciclo malato/isocitrato, un ciclo de oxidación-reducción acopladas (en el que las oxidasas y las reductasas añaden o retiran determinados electrones de un compuesto) tales como la conversión del α -cetoglutarato en glutamato y 6-fosfogluconato, o combinaciones de los mismos. Estos y otros ciclos se describen en la mayoría de los manuales de bioquímica tales como *Biochemistry 3rd Ed.* (L. Stryer Ed., W.H. Freeman y Co., N.Y. 1988) y *Biochemistry* (D.E. Metzler Ed., Academic Press, N.Y. 1977).

De acuerdo con este método, el(los) componente(s) de un ciclo biológico enzimático se someten al procedimiento de esterilización. La inactivación del(de los) componente(s) inhibe la terminación del ciclo y la creación de cualquier cantidad significativa del producto, lo que indica que se ha completado el procedimiento de esterilización con éxito. La rapidez y la sensibilidad de la detección de la actividad enzimática se deben a la formación del producto modificado enzimáticamente a partir de la red de componentes interaccionantes del sistema enzimático tal como mediante un ciclo enzimático. Un ciclo enzimático es la interdependencia de muchas enzimas sobre la interconversión de coenzimas entre las enzimas de tal forma que las dos enzimas crean un ciclo de conversión de un intermediario que tiene dos formas. Esta red puede comprender la interconversión continua de coenzimas entre las enzimas interaccionantes tales como, por ejemplo, la interconversión de el acetil-coenzima A reducido (Ac-CoA) en Ac-CoA oxidado, NAD o NADP en NADH o NADPH respectivamente, o NTP en NDP. En el ciclo puede participar el sustrato, una coenzima asociada o las propias enzimas, y directamente contribuye a la rapidez con la que se obtienen los resultados.

Por ejemplo, en la figura 2, se inmovilizan la deshidrogenasa alcalina y la diaforasa en un disco de celulosa. Las dos enzimas crean un ciclo de conversión de un intermediario que tiene las dos formas: $\text{NAD} \leftrightarrow \text{NADH}$. La alcohol deshidrogenasa cataliza la conversión de etanol a acetaldehído con ayuda de una coenzima, el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), que también se convierte en NADH. La diaforasa convierte el yodonitrotetrazolio (INT) en formazán al mismo tiempo que también reconvierte de nuevo el NADH en NAD. Estas dos coenzimas se inmovilizan sobre un soporte sólido que se somete a un ciclo de esterilización tras el cual se añaden NAD, etanol e INT para formar así el sistema enzimático completo. La supervivencia y la interacción exitosa de todas las enzimas interactivas de la prueba es un indicador para la producción de un producto detectable a simple vista por modificación enzimática. En este caso, se forman y se detectan con facilidad el acetaldehído y el formazán, una forma reducida de un colorante de tetrazolio que absorbe intensamente en el intervalo visible.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización que comprende las etapas que se describieron anteriormente, en el que el sistema enzimático comprende un sistema de amplificación. Los sistemas de amplificación aumentan la cantidad de producto formado gracias a una cascada. Las enzimas de un sistema de amplificación también se describen en la mayoría de manuales de bioquímica tales como *Enzymes, 3rd Ed.* (M. Dixon y E.G. Webb Eds., Academic Press, N.Y. 1979). Las enzimas también pueden ser de tal forma que la detección visual del producto modificado enzimáticamente sea dependiente de la supervivencia de todas las enzimas diferentes. Algunos procedimientos naturales están controlados por los sistemas enzimáticos de amplificación (D.L. Bates, *Annates De Biologie Clinique* 47: 527-32, 1989). La cascada de coagulación de la fibrina, la cascada tripsina/tripsinógeno, la cascada del complemento y los ciclos cinasa/fosfatasa de la glucólisis son ejemplos de amplificación enzimática.

En un ciclo de amplificación enzimática, el producto de una etapa se utiliza como catalizador en la etapa siguiente. Un ejemplo típico sería un sistema de disco de dos enzimas que comprende tripsina y quimotripsina. La quimotripsina se añade a un soporte sólido y se somete a un ciclo de esterilización. La tripsina más el sustrato se añadirían a la quimotripsina a la terminación del ciclo que cataliza la conversión del sustrato en producto y también la conversión de la quimotripsina en la tripsina. En consecuencia, con muy poca cantidad de tripsina, suponiendo que la quimotripsina no se ha inactivado, se puede crear muy rápidamente una gran cantidad de producto convertido por la tripsina. Y al contrario, la tripsina, el sustrato o la coenzima se podrían someter al ciclo de esterilización y añadirle posteriormente la quimotripsina para proporcionar un método alternativo de detección mediante amplificación enzimática.

En general, en un sistema enzimático interactivo, normalmente no es necesario inactivar más que uno de los componentes presentes para evitar que se forme el producto de la reacción. Las enzimas que se ha encontrado que cumplen los requisitos descritos anteriormente son las que dependen de la oxidación o la reducción de las coenzimas NAD, NADH, NADP y NADPH. La naturaleza obligatoria de la interdependencia mediante la conversión entre las formas reducidas y oxidadas de estas coenzimas dictamina que las enzimas aparezcan por pares, para que la primera enzima requiera la oxidación de la forma reducida de la coenzima y la segunda enzima requiera la reducción de la forma oxidada de la coenzima. Tales sistemas enzimáticos incluyen, pero sin limitarse a ellos, alcohol deshidrogenasa y citocromo reductasa (EC 1.6.99.3), glutamato deshidrogenasa y NAD(P) oxidorreductasa (EC 1.4.1.3), y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP 1-oxidorreductasa (EC 1.1.1.49).

Un sistema enzimático puede comprender la forma oxidada o la reducida de una de las coenzimas antes mencionadas, un sustrato cromógeno (sustrato enzimático que se convierte, como resultado de una reacción enzimática, en un producto modificado enzimáticamente coloreado detectable a simple vista) que, una vez alterado por una de las enzimas, se convierte en un producto modificado enzimáticamente detectable a simple vista, cualquier otro sustrato enzimático necesario para mantener el ciclo de oxidación-reducción acoplado enzimáticamente, y un disolvente tamponado.

Cuando, por ejemplo, todo o partes del sistema de sustrato se tienen que incluir en el dispositivo indicador durante la esterilización, las partes incluidas no se rompen espontáneamente ni se convierten en un producto detectable durante la esterilización. La visualización de las reacciones dependientes de NAD(P) se puede llevar a cabo proporcionando un aceptor de hidrógeno como sustrato en el sistema de sustrato que, al mismo tiempo que permite la reoxidación del NAD(P)H, lo convierte en una forma reducida caracterizada por un cambio de color observable. Los sustratos cromógenos preferidos son las sales de tetrazolio que son incoloras o ligeramente coloreadas, y que se convierten en formazanos coloreados intensamente mediante la reducción enzimática. Algunos ejemplos de estos sustratos cromógenos incluyen bromuro de 3-(4',5'-dimetilazol-2-il)-2,4-difeniltetrazolio, violeta de 2-(p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio, cloruro de 2,2',5,5'-tetra-(p-nitrofenil)-3,3,(3-dimetoxi-4-difenileno)-ditetrazolio, y cloruro de 2,2-di-(p-nitrofenil)-5,5'-difenil-3,3-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenileno)ditetrazolio.

La seguridad durante el ciclo coenzimático, tal como el ciclo enzimático dependiente de NAD, es una característica de una realización de la invención. La unión de la detección enzimática a ciclos redox repetitivos permite aumentar la sensibilidad varios grados de magnitud para la enzima superviviente (C. Self, *J. Immunol. Methods* 76: 389-93, 1985). En la presente invención, el ciclo enzimático es una forma particular de amplificación de la señal que reduce en varios grados de magnitud el tiempo necesario para un revelado visual del color. Así, la inclusión del sistema multienzimático interactivo dependiente de NAD comprende un uso nuevo para determinar la esterilidad que mejora significativamente la utilidad y la rapidez en relación con las prácticas del estado actual de la técnica.

La concentración de las enzimas y los sustratos enzimáticos dependen de la identidad del sustrato particular, del sistema enzimático, de la cantidad de producto modificado enzimáticamente que se genera para que se detecte a simple vista y de la cantidad del tiempo que uno está dispuesto a esperar para determinar si las enzimas activas están presentes en la mezcla de reacción. La cantidad de tiempo necesario para generar a simple vista el color detectable es también una función de la proximidad espacial de las enzimas que interaccionan unas a otras. La colocación de las enzimas que catalizan reacciones cíclicas secuenciales en una superficie o microentorno donde está limitado el intercambio controlado por difusión con la mayor parte de la disolución circundante, tal como la canalización de enzimas, mejora la rapidez de las reacciones y reduce el tiempo necesario para la generación del color detectable a simple vista.

Este concepto está ilustrado para un caso general en la figura 1 para el caso de dos enzimas que interaccionan: la enzima en disco 1 y la enzima en disco 2. En este ejemplo, se coinmovilizan las dos enzimas en fibras de celulosa en una estrecha proximidad, mostrándose la canalización enzimática de las reacciones secuenciales que producen el producto 1C y el producto 2C. Dado que se necesita el producto 2C para volver a producir el producto 1C mediante la enzima en disco 1, este ejemplo también es una ilustración del ciclo enzimático. Obsérvese que la enzima en disco 1 también convierte el sustrato 1A en el producto 1B. En el caso de que la enzima en disco 1 requiera el producto 2C para llevar a cabo la conversión enzimática del sustrato 1A en el producto 1B, se puede considerar el producto 2C como si fuera una coenzima. Asimismo, en el caso de que la enzima en disco 2 requiera el producto 1C para llevar a cabo la conversión del sustrato 2A en el producto 2B, se puede considerar el producto 1C como si fuera una coenzima para la enzima en disco 2. Este ejemplo también ilustra el uso de un sustrato cromógeno, el sustrato 2A, que la enzima en disco 2 convierte en el producto 2B coloreado detectable a simple vista.

En la figura 2, se coinmovilizan la alcohol deshidrogenasa y la diaforasa sobre un disco de celulosa blanco durante la exposición esterilizadora. En el ulterior modo posesterilizador, los sustratos enzimáticos etanol e INT (violeta de p-yodonitrotetrazolio; cloruro de 2-[4-4 yodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolio) y la coenzima NAD se añaden al conjunto de la disolución indicadora. El NAD es una coenzima para la conversión del etanol a acetaldehído mediante la alcohol deshidrogenasa. En el procedimiento de la reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa, el NAD se convierte en NADH que, a su vez, es una coenzima para la conversión enzimática, mediante la diaforasa, del INT al producto coloreado detectable a simple vista: el formazán. Un segundo ejemplo (figura 3) representa tres enzimas, la fosfatasa alcalina, la alcohol deshidrogenasa y la diaforasa, coinmovilizadas en un disco de celulosa blanco durante la exposición esterilizadora. En el ulterior modo posesterilizador, los sustratos enzimáticos NADP, etanol e INT se añaden al total de la disolución indicadora. Cualquier fosfatasa alcalina superviviente convertirá el sustrato NADP en un producto NAD que, a su vez, sirve de coenzima para las reacciones cíclicas enzimáticas descritas anteriormente, tornando el vehículo de blanco a rojo.

Las numerosas enzimas interaccionantes u otros componentes pueden estar separados físicamente como se ilustra en la figura 4. En esta ilustración, sólo la fosfatasa alcalina está inmovilizada en un disco de celulosa blanco durante la exposición esterilizadora. En el ulterior modo posesterilizador, muchas enzimas que interaccionan en forma de diaforasa y alcohol deshidrogenasa se añaden junto con los coenzimas y sustratos enzimáticos requeridos en el conjunto de la disolución indicadora. Las conversiones enzimáticas en esta realización son las mismas que aquéllas en las que se coinmovilizan las tres enzimas excepto en que sólo la supervivencia de una enzima, la fosfatasa alcalina, se somete al estrés de supervivencia en forma de exposición esterilizadora. En cada uno de los ejemplos anteriores, se requiere la supervivencia de la actividad de todas las enzimas para generar el producto modificado enzimáticamente coloreado a simple vista: el formazán. Tal y como se muestra en la figura 3, la coinmovilización de las tres enzimas da lugar a un aumento considerable de la rapidez con la que se forma el formazán cuando se compara con la inmovilización de la enzima sola (figura 4). Este resultado se representa gráficamente en la figura 5, en la que se compara la termoestabilidad de la fosfatasa alcalina frente a la termoestabilidad de tres enzimas, coinmovilizadas en un disco. Tal y como se muestra, la actividad esperada del sistema de tres enzimas, que se midió mediante absorbencia, disminuyó rápida y considerablemente. La enzima sola comenzó con muy poca actividad y disminuyó lentamente.

ES 2 288 299 T3

Una realización alternativa de la invención se refiere a un procedimiento tal y como se describió anteriormente, en el que un inhibidor de un sistema enzimático se somete a la inactivación en un procedimiento de esterilización y se añaden los componentes del sistema enzimático posteriormente para analizar el estado del inhibidor. Si el inhibidor sobrevivió o no fue destruido de otro modo por el procedimiento de esterilización, el sistema enzimático no funcionará. Ejemplos de tales inhibidores incluyen el ácido α -amino-oxiacético, que es un inhibidor general de las enzimas dependientes del fosfato de piridoxal (transaminasas y descarboxilasas de aminoácidos), el disulfiram, que inhibe la oxidación del acetaldehído al inhibir la alcohol deshidrogenasa, el ácido flaviánico, que inhibe la glutaminyasa, el ácido yodoacético de sodio y pirazol, que inhiben algunas deshidrogenasas incluidas las alcohol deshidrogenasas, la hidrazina de isopropilo, que inhibe las diamino oxidasas, el parapiruvato, que inhibe muchas reacciones de oxidación, el ácido oxámico, que inhibe la lactato deshidrogenasa, el fluoruro de fenilmetano-sulfonilo y la quimostatina, que son inhibidores específicos de la tripsina y la quimotripsina, el ácido tartárico, que inhibe las fosfatasa, y otros inhibidores tales como la tosil-lisina-clorometilcetona (TLCK) y la tosil-fenilalanina-clorometilcetona (TPCK).

Otra realización de la invención se refiere a un indicador para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización. En su forma más simple, un indicador de esterilidad útil para practicar el método de la invención incluye una fuente de numerosas enzimas interaccionantes en un contenedor que tiene una pared impermeable a los líquidos y sustancialmente no adsorbente de gases, al menos una abertura cubierta con una tapa transmisora de gases, conduciendo dicha abertura a una cámara que contiene uno o más componentes del sistema enzimático interactivo con una barrera impermeable a los líquidos entre los componentes y la abertura. Los componentes interaccionantes están ubicados muy cerca el uno del otro tal como dentro de la matriz de un disco de filtro de celulosa y/o dentro de un medio definido y, por lo tanto, están coimmobilizados. Se pueden incluir uno o más enzimas, sustratos, coenzimas o catalizadores sobre la matriz sólida. Dentro del contenedor se encuentra una cantidad eficaz de un material que forma la barrera que es semipermeable, pero no libre o totalmente permeable a la transmisión de líquidos y gases, y unos medios eficaces para mantener una distancia finita entre la abertura semipermeable y las enzimas. La barrera puede ser permeable o impermeable a los líquidos y puede ser un émbolo o un tapón, pero preferiblemente es una esponja que reduce la probabilidad de deslizamiento que algunas veces se puede producir con los émbolos o los tapones. También se prefiere una barrera que es una membrana que se construye de un polímero tal como uno sintético, un plástico, una goma, Gortex (un polímero transmisor de gases e impermeable a los líquidos) o una combinación de los mismos. Una membrana de Gortex sería impermeable a los líquidos mientras que una barrera de esponja sería semipermeable a los líquidos.

El medio definido puede ser hidrófilo, pero preferiblemente es hidrófobo, por ejemplo, no acuoso, o puede ser semipermeable o transmisor de gases, incluido el vapor esterilizador. El medio puede ser no acuoso como puede ser el entorno cercano que rodea los componentes durante el almacenamiento antes de la exposición a las condiciones esterilizantes. La estabilidad funcional de un componente generalmente depende del mantenimiento de un entorno en medio no acuoso para la enzima. La base teórica de este requisito está bien desarrollada (A. Zaks *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263: 3194-3201, 1987). El grado al que el componente es susceptible al daño por el procedimiento de esterilización se correlaciona directamente con el grado al que se deja interaccionar la humedad en forma de vapor con la fuente de enzimas durante el transcurso del procesamiento por vapor (A. M. Klibanov, *Advances in Applied Microbiology* 29:1-28, 1983). Los componentes pueden estar inmovilizados en un soporte sólido tal como un soporte que comprende celulosa, plásticos, vidrio, cerámicas, membranas, polímeros o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el soporte sólido es un disco de celulosa muy compartimentado suspendido en un medio anhidro.

La invención actual es única, debido a la velocidad con la que se obtiene un resultado y también debido a algunas realizaciones preferidas que se basan en sistemas no acuosos. El indicador preferiblemente utiliza aceite mineral como el medio no acuoso que tiene muchas funciones dentro del sistema. El aceite mineral comprende una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos del petróleo que tienen una densidad relativa entre 0,818 y 0,880, una viscosidad cinemática de no más de 335 centistokes a 40°C, y que cumple las normas de neutralidad, sustancias fácilmente carbonizables, límite de compuestos polinucleares y parafina sólida establecidos por la USP XXII. El aceite se utiliza para cubrir el disco de soporte sólido en el que se coimmobilizan muchas enzimas interaccionantes, lo que proporciona un entorno no acuoso para estabilizar las enzimas. El aceite crea una barrera para el agua y el aire que podría tener efectos perjudiciales sobre las enzimas mientras están almacenadas. El aceite también actúa como una barrera semipermeable para el vapor cuando el indicador enzimático rápido se expone a un ciclo de esterilización por vapor. Variando la cantidad de aceite, o la naturaleza anhidra del entorno cercano, la cantidad de vapor que alcanza los discos con las enzimas se puede controlar con precisión.

Una realización alternativa de la invención se refiere a un indicador biológico de dos fases para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización que comprende un indicador que contiene dos viales. En el primero, es una red de componentes interactivos de un sistema enzimático tal como el descrito anteriormente. En el segundo, el vial es un cultivo de microorganismos. Un indicador de dos fases de la invención proporciona una doble indicación de la eficacia del procedimiento de esterilización. Básicamente, se añade el sustrato a las enzimas e inmediatamente se analizan por el procedimiento descrito en la presente memoria para obtener una indicación de primera fase. Las esporas que quedan del segundo vial se incuban en condiciones de cultivo durante un periodo de tiempo más largo para proporcionar una indicación de esterilización de segunda fase. Microorganismos útiles para el indicador de dos fases incluyen poblaciones de esporas de los géneros *Bacillus*, *Neurospora*, *Candida* y *Clostridium*. El primer periodo de incubación es muy rápido tal y como se describió anteriormente, y puede ser inferior a 60 minutos, preferiblemente inferior a 15 minutos y más preferiblemente inferior a 1 minuto. El segundo periodo de incubación puede ser de entre

ES 2 288 299 T3

unas 24 a 48 horas, preferiblemente de aproximadamente 1 a 24 horas, más preferiblemente de menos de unas 6 horas e incluso más preferiblemente de menos de aproximadamente 1 hora.

Otra realización alternativa de la invención es un indicador independiente para determinar la eficacia de un procedimiento de esterilización que comprende un contenedor externo que tiene paredes impermeables a los líquidos y que, sustancialmente, no absorben gases, y al menos una abertura cubierta por una tapa transmisora de gases, conduciendo dicha abertura a una cámara que contiene un primer y un segundo vial en el que el primer vial tiene al menos una abertura que está cubierta por una tapa transmisora de gases y que contiene los componentes interactivos de un sistema enzimático, y el segundo vial contiene los componentes restantes que, al mezclarse con los componentes del primer vial, produce un producto detectable, estando dichos viales contruidos con un material que se puede abrir y sus contenidos mezclar sin ser retirados del indicador. Un ejemplo de tal construcción es una ampolla que tiene paredes termoestables con cámaras interiores. Las cámaras incluyen un par de cámaras que están separadas por un separador plegable o si no aplastable, los cuales, juntos, contienen todos los componentes de un sistema enzimático interactivo tal y como se describe en la presente memoria. La ampolla también contiene otro par de cámaras, separadas por un separador plegable o aplastable, una de las cuales contiene una muestra de esporas y la otra una muestra de medio para incubar las esporas.

La cantidad de componentes es tal que se detecta cualquier actividad enzimática que se mantenga después de un ciclo de esterilización inadecuado. Los componentes, que incluyen enzimas, coenzimas, cofactores, catalizadores, sustratos y cualquier otro reactivo necesario, se incuban y se determinan después de someterse al ciclo de esterilización. La incubación continúa durante un periodo de tiempo y en unas condiciones suficientes para liberar una cantidad detectable del producto modificado enzimáticamente, suponiendo que alguna de las enzimas permanezca activa. En general, el tiempo de incubación requerido está entre 1 minuto y 60 minutos y la temperatura de incubación está entre unos 20°C y unos 70°C.

Generalmente, los métodos comerciales para detectar el producto modificado enzimáticamente utilizan una instrumentación avanzada tal como fluorímetros y espectrofotómetros. Para el propósito de esta invención, se prefiere un método de detección visual para medir el producto modificado enzimáticamente debido a la simplicidad del método y a la rapidez de los resultados. Por ejemplo, el sustrato enzimático específico puede comprender una sal de tetrazolio que, al interactuar con una enzima oxidoreductasa dependiente de NADH, da lugar a un formazán coloreado que es detectable a simple vista. El procedimiento de la invención permite una determinación muy rápida de la actividad enzimática que se puede utilizar para predecir las condiciones que permiten la supervivencia de microorganismos y, por lo tanto, la eficacia de la esterilización. La prueba enzimática de determinación utilizada emplea sólo un periodo de incubación corto, normalmente de aproximadamente 1 a unos 60 minutos, para proporcionar el producto modificado enzimáticamente para la detección visual.

En la figura 6 se ilustra un rápido indicador de esterilidad con varias enzimas de la invención. El contenedor es un tubo cilíndrico 4 que tiene paredes impermeables a los líquidos con una abertura 7 en un extremo. El tubo 4 contiene un disco de soporte sólido 6 sobre el cual se inmovilizan muchas enzimas interaccionantes. El tubo 4 también contiene un medio no acuoso 5 que cubre el disco de soporte sólido 6. La abertura 7 está cubierta con una tapa 1 que tiene agujeros 2 que permiten el acceso sin impedimentos del esterilizador a través de la abertura 7. El aparato de la figura 6 se monta colocando el disco de soporte sólido 6, sobre el que se coinmovilizan varias enzimas interaccionantes, en el fondo del tubo 4. Se añade el medio no acuoso 5 para cubrir el disco de soporte sólido 6. Un cilindro de material esponjoso termorresistente 3 se comprime en un tubo 4 que proporciona un armazón estructural para la contención del medio no acuoso 5. El material esponjoso 3 también sirve para mantener una distancia fija entre las muchas enzimas interaccionantes coinmovilizadas sobre el disco de soporte sólido 6 y la abertura 7. El tapón 1 se coloca sobre la parte superior del tubo 4 cubriendo la abertura 7.

El dispensador de la disolución indicadora se muestra en la figura 7. La botella contiene la disolución indicadora 9 que produce un cambio de color visible al exponerse a las diversas enzimas interaccionantes activas coinmovilizadas sobre el disco de soporte sólido 16. La botella 8 contiene un gotero 11 con una marca de volumen premedido 10. Llenar el gotero 11 hasta la marca de volumen premedido 10 con la disolución indicadora 9 garantiza que se dispensa el volumen correcto de la disolución indicadora 9 en el tubo 4.

En la figura 7 se ilustra un método para realizar una prueba de esterilidad. El indicador de esterilidad se coloca en el esterilizador junto con los otros materiales a esterilizar. El indicador de esterilidad se expone al esterilizador durante el transcurso de un ciclo de esterilización. Después de finalizar el ciclo de esterilización, se retira el indicador de esterilidad del esterilizador y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se retiran el tapón 12 y el material esponjoso 13. La disolución indicadora 9 se extrae con el gotero 11 utilizando la marca de volumen premedido 10 para garantizar que se utiliza el volumen correcto. La disolución indicadora 9 se dispensa en el tubo 14. La disolución del incubador se incubaba a temperatura ambiente con las enzimas coinmovilizadas sobre el soporte sólido durante 1 a 60 minutos, preferiblemente durante menos de 10 minutos. El disco de soporte sólido se examina a simple vista al final del periodo de incubación. La ausencia de coloración roja sobre el disco de soporte sólido indica el resultado negativo 18 y significa que el ciclo de esterilización se realizó con éxito. La presencia de coloración roja sobre el disco de soporte sólido indica el resultado positivo 17 y significa que el ciclo de esterilización no fue satisfactorio.

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la invención, pero no se deben ver como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 El sistema de dos enzimas se compone de alcohol deshidrogenasa (445 U/mg P, Worthington Biochemical) y diaforasa (30,8 U/mg DW, Worthington Biochemical). La alcohol deshidrogenasa se utilizó a una concentración preferida de 5,0 mg/ml y dentro de un intervalo de 0,5 mg/ml a 250 mg/ml. La diaforasa se utilizó a una concentración preferida de 25 mg/ml, pero se puede utilizar dentro de un intervalo de unos 2,5 mg/ml a 1,25 g/ml. Las enzimas se disuelven en un tampón acuoso tal como una disolución salina tamponada con fosfato (PBS) o un tampón de Tris a 0,05 M, pH 8,5, y se dializan.

15 El tubo de membrana porosa molecular Spectrapor, valor discriminatorio de masa molecular en 3500 Da, se utilizó para la diálisis de todas las enzimas. Se hirvió el tubo en bicarbonato de sodio al 2% y EDTA a 1 mM durante 10 minutos, se enjuagó en agua corriente durante 1 hora y, finalmente, se enjuagó 10 veces en agua destilada y se guardó a 2-8°C en agua destilada. Se cortó el tubo para ajustar el tamaño, se ajustó en un extremo, se llenó con la disolución de enzimas y se hizo un nudo en el otro extremo. Se realizó la diálisis con 100 veces el volumen de la disolución de enzimas utilizando un tapón de Tris a 0,05 M, pH 8,5, y se dializó dos veces durante 4 horas y una vez más durante 14 a 18 horas a 2-8°C con una agitación suave. Los 20 μ l de la disolución de enzimas se transfirieron sobre discos de soporte sólido de celulosa blancos dispensando 20 μ l sobre cada disco. Los discos, alojados en una placa multipocillo de microtitulación y se congelaron inmediatamente a -71°C. A continuación se liofilizaron los discos colocando los discos congelados, en una placa de microtitulación, en una botella de liofilización y aplicando un vacío de más de 200 micrones de mercurio durante un mínimo de tres horas. Los discos que contenían las enzimas coimmobilizadas se guardaron en un entorno no acuoso dentro de viales transparentes cubiertos con aceite mineral antes de utilizarlos como un indicador de esterilidad. El medio anhidro o el aceite mineral se mantuvo dentro del vial transparente por medio de un material añadido al vial que separa físicamente el medio anhidro del espacio de aire del contenedor del vial. El separador era un material esponjoso termorresistente cortado en un cilindro que se colocó físicamente en el vial hasta que su superficie inferior entró en contacto directo con el medio anhidro que, en este caso, era aceite.

30 La disolución indicadora es una disolución incolora transparente, pero, al añadirse a una serie de enzimas interaccionantes, las enzimas reaccionan con la disolución indicadora para producir un producto de reacción coloreado modificado enzimáticamente. La disolución indicadora contiene violeta de p-yodonitrotetrazolio (cloruro de 2-[4-yodofenil]-3-[4 nitrofenil]-5-feniltetrazolio) dentro de un intervalo de $3,2 \times 10^{-5}$ M a $0,16 \times 10^{-1}$ M, preferiblemente, $3,2 \times 10^{-3}$ M; NAD (B-dinucleótido de nicotinamida y adenina) dentro de un intervalo de $1,1 \times 10^{-6}$ M a $5,5 \times 10^{-3}$ M, preferiblemente $1,1 \times 10^{-4}$ M; etanol dentro de un intervalo del 1% al 100% (por volumen), preferiblemente el 5,5%. El tampón preferido era Tris a 0,5 M, pH 8,5.

Ejemplo 2

40 Este ejemplo ilustra la rapidez y la simplicidad de uso de la presente invención. En este ejemplo, se coimmobilizaron la alcohol deshidrogenasa y la diaforasa sobre discos de celulosa blancos tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 2. Se colocaron los discos en el vial de análisis tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 6. Se esterilizaron en autoclave los viales en replicados de 4 durante intervalos de 5 y 15 minutos. Se retiraron los viales del autoclave y se dejaron enfriar. Se realizó la prueba del indicador de esterilidad tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 7, utilizando una disolución indicadora compuesta de un tampón de Tris, etanol, NAD e INT. Después de una incubación de diez minutos a temperatura ambiente, se llevó a cabo un registro visual de los viales que contienen la disolución indicadora y el disco de celulosa sobre el que se coimmobilizaron las dos enzimas interaccionantes mediante la colocación de los viales sobre una plataforma de vidrio y viendo y/o filmando con una videocámara los discos desde el fondo. Las imágenes de vídeo resultantes se capturaron digitalmente utilizando el programa Adobe Photoshop y se cuantificó la intensidad de color relativa sobre los discos utilizando la función de histograma del programa. Los viales también se valoraron cualitativamente a simple vista como positivos, coloreados en rojo, o negativos, que no tienen ningún rastro visual de color rojo.

55 Los resultados de este ejemplo se exponen en la figura 8. Después de 5 minutos en el autoclave, todos los replicados del indicador enzimático rápido mostraron una producción de color positiva y fuerte después de una breve incubación de diez minutos. Los indicadores de esterilidad enzimáticos rápidos que se esterilizan en autoclave durante 15 minutos no mostraron ningún color ni cuantitativa ni cualitativamente mediante un examen visual. La figura 9 ilustra un gráfico de la determinación cuantitativa de la intensidad de color del indicador de esterilidad enzimático rápido de la presente invención frente al tiempo de la exposición al esterilizador en este ejemplo utilizando un autoclave de vapor a 121°C. Se puede comparar la actividad del sistema enzimático en diferentes configuraciones de aceite, lo que sirve para caracterizar la influencia de un entorno hidrófobo. En el mismo gráfico se encuentran superpuestos los datos que describen el logaritmo del número de microorganismos supervivientes de *Bacillus stearothermophilus* aislados a partir de indicadores biológicos Sportrol frente al tiempo de permanencia en el autoclave de vapor. Sportrol es un indicador biológico que no es independiente. La estrecha correspondencia de los gráficos apoya la reivindicación de la presente invención de que las enzimas útiles en la práctica de la presente invención son enzimas microbianas intra- y extracelulares, cuya actividad interdependiente se correlaciona con la germinación y el crecimiento de los microorganismos normalmente utilizados en los indicadores de esterilidad biológicos en el estado actual de la técnica.

ES 2 288 299 T3

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la correlación entre un indicador de esterilidad biológico convencional que contiene esporas y un indicador enzimático rápido. El indicador de esterilidad biológico convencional utilizado para la comparación fue Sportrol Spore Strip disponible comercialmente de North American Science Associates, Incorporated, en Northwood, Ohio. Se comparó con el indicador enzimático rápido (sistema de dos enzimas) a 121°C en un recipiente BIER (recipiente resistométrico evaluador e indicador biológico utilizado para proporcionar las condiciones esterilizantes controladas con precisión). Se probaron los dos indicadores de esterilidad después de 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 15 minutos de tiempo de exposición en el recipiente BIER.

Se colocó el Sportrol Spore Strip en el medio de nutrientes y se incubó después de haberlo expuesto en el recipiente BIER durante el tiempo que se le asignó. Después de un día, se comprobaron los tubos y se registran como positivos el número de tubos con esporas viables (crecimiento). Se incubaron los tubos hasta 7 días y se registró como positivo la presencia de algún tipo de crecimiento.

El indicador enzimático rápido tiene una disolución indicadora, que contiene INT, etanol y NAD en un tampón, añadida en el vial después de haberla expuesto en el recipiente BIER durante el tiempo que se le asignó. El indicador enzimático rápido contiene dos enzimas, diaforasa y alcohol deshidrogenasa, que normalmente se encuentran en los microorganismos indicadores, coimmobilizadas sobre un disco de celulosa blanco. Después de añadir una disolución indicadora incolora al disco, se incubó el vial a temperatura ambiente entre unos 2 a unos 30 minutos. Después del periodo de incubación, se examinó a simple vista el disco para detectar cualquier signo de color. Si se observaba cualquier color rojo sobre el disco, se registraba el resultado como positivo. Un resultado positivo indica que no se cumplieron las condiciones de esterilización adecuadas. El color aparecía sobre el disco porque las enzimas no estaban completamente inactivadas. Si el disco permanece totalmente blanco, el resultado se registraba como negativo. Un resultado negativo muestra que se cumplieron las condiciones de esterilización adecuadas y que la(s) enzima(s) estaba(n) inactivada(s).

El número de resultados positivos para el indicador biológico Sportrol se determinó después del periodo de incubación de 7 días. El número de positivos para el indicador enzimático rápido se determinó 30 minutos después de añadir la disolución indicadora. El número de positivos en cada momento fue similar para los dos diferentes tipos de indicadores.

El crecimiento y la viabilidad de las esporas en el indicador Sportrol fue similar a la actividad enzimática del indicador enzimático rápido. Por lo tanto, el indicador enzimático puede producir un resultado similar al del indicador biológico Sportrol. Al correlacionar la viabilidad de las esporas después de la esterilización con la actividad enzimática de las enzimas obtenidas de microorganismos, se crea un procedimiento rápido para comprobar la eficacia de los esterilizadores. Ya que el procedimiento para asegurar las condiciones de esterilización adecuadas no se basa en el crecimiento de los microorganismos, los resultados de prueba del indicador estaban disponibles minutos después en vez de horas o días después.

Ejemplo 4

El ejemplo 4 ilustra la aplicabilidad del indicador de esterilidad enzimático rápido de la presente invención para su uso en la esterilización rápida. La esterilización rápida produce un ciclo de esterilización más rápido a una temperatura de 132°C al aumentar la presión de la cámara. Este aumento reduce el tiempo necesario para destruir los microorganismos de prueba viables de 15 minutos en el caso de la esterilización por vapor a 121°C hasta 2 minutos en el caso de la esterilización rápida a 132°C. En este ejemplo, los discos de celulosa que contienen la diaforasa y la alcohol deshidrogenasa coimmobilizadas tal y como se ilustra en la figura 2 se colocaron en el vial indicador tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 6. Los viales se esterilizaron en el autoclave a 132°C durante 2 minutos y, posteriormente, se retiraron del autoclave y se dejaron enfriar. Se realizó la prueba del indicador de esterilidad tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 7, utilizando una disolución indicadora compuesta de un tampón de Tris, etanol, NAD e INT. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, los resultados indicaron que los viales que se habían valorado cualitativamente como negativos no tienen ningún signo visual de color rojo.

Ejemplo 5

El ejemplo 5 ilustra otra realización de la invención que funciona en un entorno no acuoso completamente. Efectuar las reacciones enzimáticas en un medio no acuoso puede mejorar la cinética de las reacciones enzimáticas y mejorar la recuperación de la actividad enzimática (A. Zaks *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263: 3194-3201, 1988). En este ejemplo, se coimmobilizaron la alcohol deshidrogenasa y la diaforasa con la coenzima NAD sobre discos de celulosa blancos. Los discos se colocaron en el vial indicador tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 6. Los viales se esterilizaron en el autoclave durante 15 minutos, se retiraron del autoclave y se dejaron enfriar. Se realizó la prueba del indicador de esterilidad tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 7, con una disolución indicadora compuesta de INT disuelta en etanol al 100%. Después de una incubación de 1 a 20 minutos a temperatura ambiente, se realizó una determinación visual de la producción del color dentro de los viales que contienen la disolución indicadora y el disco de celulosa sobre el que se coimmobilizaron las dos enzimas interaccionantes, para determinar si se había completado la esterilización.

ES 2 288 299 T3

Ejemplo 6

En este ejemplo, se utilizó una construcción de soporte sólido estratificada. La construcción comienza con el soporte sólido 22, luego se inmovilizó la alcohol deshidrogenasa 19 sobre el disco, y se congelaron la enzima y el disco. Después de la congelación, se cubrió la alcohol deshidrogenasa con una capa de una disolución de gelatina 21 que forma una matriz que utiliza moléculas orgánicas cargadas anfotéricamente sobre la alcohol deshidrogenasa. Una vez endurecida la gelatina, se añadió la diaforasa encima de la gelatina. A continuación se liofilizó la construcción y se colocaron los discos en los viales indicadores tal y como se describió previamente en la figura 6. Los viales se esterilizaron en el autoclave durante 15 minutos, se retiraron del autoclave y se dejaron enfriar. Se efectuó la prueba del indicador de esterilidad tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 7. Después de la incubación a temperatura ambiente, se realizó una determinación visual de la producción de color sobre los discos. Esta construcción estratificada aumentó considerablemente la estabilidad de la alcohol deshidrogenasa bajo la capa de gelatina al mismo tiempo que permitió una difusión óptima del sustrato cromógeno del conjunto de la disolución a la capa de diaforasa fuera de la gelatina.

Ejemplo 7

En este ejemplo, se coinmovilizaron dos enzimas sobre un soporte sólido a través de complejos enzimáticos dirigidos de sitio a sitio (N. Siegbahn *et al. Methods Enzymol.* 136: 103-113, 1987). En esta configuración, la interconversión de las coenzimas entre las dos enzimas se lleva a cabo a una velocidad muy superior. Esta mejora produce un indicador de esterilidad enzimático rápido que tiene unas mayores sensibilidad y tasa de revelado del color a simple vista. Utilizando esta estructura de disco, se construyó el indicador de esterilidad enzimático rápido tal y como se ilustró en la figura 6. Después de esterilizar en el autoclave durante un periodo de tiempo especificado, se puso en funcionamiento el indicador de esterilidad enzimático rápido tal y como se describió previamente y se ilustró en la figura 7. Los viales se examinaron a simple vista después de una incubación de 1 a 20 minutos. La presencia o la ausencia del revelado del color indicó el estado parcial o completo del ciclo de esterilización.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento biológico para determinar una eficacia de un procedimiento de esterilización que comprende las etapas secuenciales de:
- a) colocar un indicador que contiene uno o más componentes de una serie de sistemas enzimáticos interactivos en una cámara de esterilización;
 - 10 b) realizar el procedimiento de esterilización dentro de la cámara,
 - c) añadir los componentes restantes de los diversos sistemas enzimáticos interactivos a uno o más componentes en el indicador para formar una mezcla; e
 - 15 d) incubar la mezcla durante un primer periodo de tiempo suficiente para detectar la presencia o la ausencia de un producto para determinar la eficacia del procedimiento de esterilización.
2. Un procedimiento biológico de acuerdo con la reivindicación 1 para determinar una eficacia de un procedimiento de esterilización que comprende las etapas de:
- 20 a) colocar un indicador que contiene uno o más componentes de una serie de sistemas enzimáticos interactivos y una muestra de microorganismos en una cámara de esterilización;
 - b) realizar el procedimiento de esterilización dentro de la cámara;
 - 25 c) retirar el indicador de la cámara;
 - d) añadir los componentes restantes de los diferentes sistemas enzimáticos interactivos a uno o más componentes en el indicador para formar una mezcla, y añadir un medio líquido a la muestra de microorganismos para formar un cultivo;
 - 30 e) incubar la mezcla durante un primer periodo de tiempo suficiente para detectar la presencia o la ausencia de un producto para realizar una primera etapa de determinación de la eficacia del procedimiento de esterilización; e
 - 35 f) incubar el cultivo durante un segundo periodo de tiempo suficiente para detectar la presencia o la ausencia de un producto metabólico de la muestra de microorganismos para realizar una segunda etapa de determinación de la eficacia del procedimiento de esterilización.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la muestra de microorganismos comprende una población de esporas del género *Bacillus*, *Neurospora*, *Candida* o *Clostridium*.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el periodo de la primera incubación es de menos de 1 minuto y el periodo de la segunda incubación es de menos de 1 hora.
- 45 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el procedimiento de esterilización se selecciona entre el grupo que consiste en procedimientos de presión de vapor, procedimientos químicos, procedimientos de calor seco, procedimientos de irradiación y combinaciones de los mismos.
- 50 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la serie de sistemas enzimáticos interactivos comprende componentes que se seleccionan entre el grupo que consiste en enzimas, coenzimas, cofactores, grupos prostéticos, catalizadores y sustratos.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende además una o más de las características siguientes:
- 55 i) las enzimas se seleccionan entre los grupos que consisten en alcohol deshidrogenasas y diaforasas; fosfatasas alcalinas, alcohol deshidrogenasas y diaforasas; alcohol deshidrogenasas y citocromo reductasas; glutamato deshidrogenasas y oxidorreductasas; y glucosa-6-fosfato deshidrogenasas y nicotinamida adenina
 - 60 ii) dinucleótido o dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina oxidorreductasas;
 - iii) la coenzima, cofactor o grupo prostético se selecciona entre el grupo que consiste en dinucleótido de nicotinamida y adenina, dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido, dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina, dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido, acetyl-coenzima A, pirofosfato de tiamina, componentes del sistema del complemento, fosfato de piridoxal, biotina, tetrahidrofolato, cobamida, flavina y hemo;
 - 65 iv) el sustrato se selecciona entre el grupo que consiste en sustancias cromógenas, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, estereoisómeros, sustancias metálicas, isótopos estables e isótopos radiactivos.

ES 2 288 299 T3

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la sustancia cromógena es una sal de tetrazolio que se selecciona entre el grupo que consiste en bromuro de difenil-tetrazolio, violeta de feniltetrazolio y cloruro de ditetrazolio.

5 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que los sistemas enzimáticos interactivos comprenden:

i) un ciclo enzimático seleccionado del grupo que consiste en un ciclo fútil, un ciclo de glucólisis, un ciclo de galactosidasa, un ciclo de fosforilación, un ciclo malato/isocitrato, un ciclo del ácido cítrico, un ciclo de oxidación-reducción acopladas y una combinación de los mismos; o

10

ii) un sistema enzimático de amplificación seleccionado entre el grupo que consiste en una cascada de coagulación/fibrina, una cascada de tripsina/tripsinógeno, una cascada del complemento y una combinación de los mismos.

15

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que uno o más componentes sometidos al procedimiento de esterilización se coinmovilizan sobre un soporte sólido.

11. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el periodo de incubación es:

20

i) menor de 1 hora;

ii) menor de 15 minutos; o

iii) menor de 1 minuto.

25

12. Un procedimiento sin microorganismos para determinar la supervivencia de un microorganismo de un entorno esterilizante que comprende las etapas secuenciales de:

a) exponer uno o más componentes de una serie de sistemas enzimáticos interactivos a un entorno esterilizante;

30

b) añadir los componentes restantes de los diversos sistemas enzimáticos interactivos a uno o más componentes sometidos al entorno esterilizante; y

c) detectar la actividad de los diversos sistemas enzimáticos interactivos para determinar la supervivencia del microorganismo del entorno esterilizante.

35

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que uno o más componentes sometidos al entorno esterilizante:

i) están contenidos en un vehículo anhidro;

40

ii) están fijados a un soporte sólido que es un disco de celulosa con varias capas de moléculas orgánicas cargadas anfotéricamente, conteniendo cada capa al menos un componente; o

iii) comprenden al menos dos enzimas, y las enzimas están contenidas sobre un disco de soporte sólido, en el que cada enzima está colocada físicamente de tal forma que un sitio activo de una enzima se encuentra justo enfrente de un sitio activo de otra enzima.

45

14. Un procedimiento sin microorganismos para determinar la supervivencia de los microorganismos de un entorno esterilizante según la reivindicación 12, que comprende exponer primero un inhibidor de una serie de sistemas enzimáticos interactivos al entorno esterilizante, siendo el inhibidor ácido α -amino-oxiacético, disulfiram, ácido flaviánico, ácido yodoacético de sodio y pirazol, isopropil-hidrazina, parapiruvato, ácido oxámico, fluoruro de fenilmetano-sulfonilo y quimostatina, ácido tartárico, tosil-lisina-clorometilcetona (TLCK) o tosil-fenilalanina-clorometilcetona (TPCK).

50

15. Un indicador para determinar una eficacia de un procedimiento de esterilización que comprende:

55

a) un contenedor exterior que tiene paredes impermeables a los líquidos y que no absorben gases; y

b) al menos una abertura en las paredes del contenedor exterior cubierta con una tapa transmisora de gases, conduciendo dicha, al menos una, abertura a una cámara que contiene una serie de sistemas enzimáticos interactivos libres de microorganismos con una barrera transmisora de gases entre los sistemas enzimáticos y la, al menos una, abertura, estando el indicador opcionalmente adaptado para un procedimiento de esterilización de la reivindicación 5.

60

16. El indicador de la reivindicación 15, en el que se coinmovilizan los distintos componentes del sistema enzimático sobre un soporte sólido.

65

17. El indicador de la reivindicación 16, en el que el soporte sólido es:

ES 2 288 299 T3

i) seleccionado entre el grupo que consiste en celulosas, plásticos, vidrios, cerámicas, membranas, polímeros y combinaciones de los mismos; o

ii) un disco de celulosa muy compartimentado suspendido en un medio anhidro.

5

18. El indicador de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que la barrera se selecciona entre el grupo que consiste en membranas poliméricas transmisoras de gases e impermeables a los líquidos, membranas poliméricas, esponjas, tapones y discos compartimentados.

10

19. Un indicador independiente según la reivindicación 15, en el que la cámara contiene un primer y un segundo vial, en el que el primer vial tiene al menos una abertura que está cubierta de una tapa transmisora de gases que contiene al menos un componente de un sistema enzimático, el segundo vial contiene los componentes restantes del sistema enzimático que, al mezclarse con el, al menos uno, componente del sistema enzimático del primer vial, produce un producto detectable, y dichos viales están contruidos con un material que se puede abrir y sus contenidos se pueden

15

20. Un indicador según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, que comprende componentes que se seleccionan entre el grupo que consiste en enzimas, coenzimas, cofactores, grupos prostéticos, catalizadores y sustratos.

20

21. Un indicador según la reivindicación 20, que comprende además una o más de las características siguientes:

i) las enzimas se seleccionan entre los grupos que consisten en alcohol deshidrogenasas y diaforasas; fosfatasas alcalinas, alcohol deshidrogenasas y diaforasas; alcohol deshidrogenasas y citocromo reductasas; glutamato deshidrogenasas y oxidorreductasas; y glucosa-6-fosfato deshidrogenasas y dinucleótido de nicotinamida y adenina o dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina oxidorreductasas;

25

ii) el coenzima, cofactor o grupo prostético se selecciona entre el grupo que consiste en dinucleótido de nicotinamida y adenina, dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido, dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina, dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido, acetil-coenzima A, pirofosfato de tiamina, componentes del sistema del complemento, fosfato de piridoxal, biotina, tetrahidrofolato, cobamida, flavina y hemo;

30

iii) el sustrato se selecciona entre el grupo que consiste en sustancias cromógenas, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, estereoisómeros, sustancias metálicas, isótopos estables e isótopos radioactivos.

35

22. Un indicador según la reivindicación 21, en el que la sustancia cromógena es una sal de tetrazolio que se selecciona entre el grupo que consiste en bromuro de difenil-tetrazolio, violeta de feniltetrazolio y cloruro de ditetrazolio.

23. Un indicador según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que los sistemas enzimáticos interactivos comprenden:

40

i) un ciclo enzimático seleccionado entre el grupo que consiste en un ciclo fútil, un ciclo de glucólisis, un ciclo de galactosidasa, un ciclo de fosforilación, un ciclo malato/isocitrato, un ciclo del ácido cítrico, un ciclo de oxidación-reducción acopladas y una combinación de los mismos; o

45

ii) un sistema enzimático de amplificación seleccionado entre el grupo que consiste en cascada de coagulación/fibrina, cascada de tripsina/tripsinógeno, una cascada del complemento y una combinación de los mismos.

24. Un indicador según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que uno o más componentes sometidos al procedimiento de esterilización están coinmovilizados sobre un soporte sólido.

50

55

60

65

FIG. 1

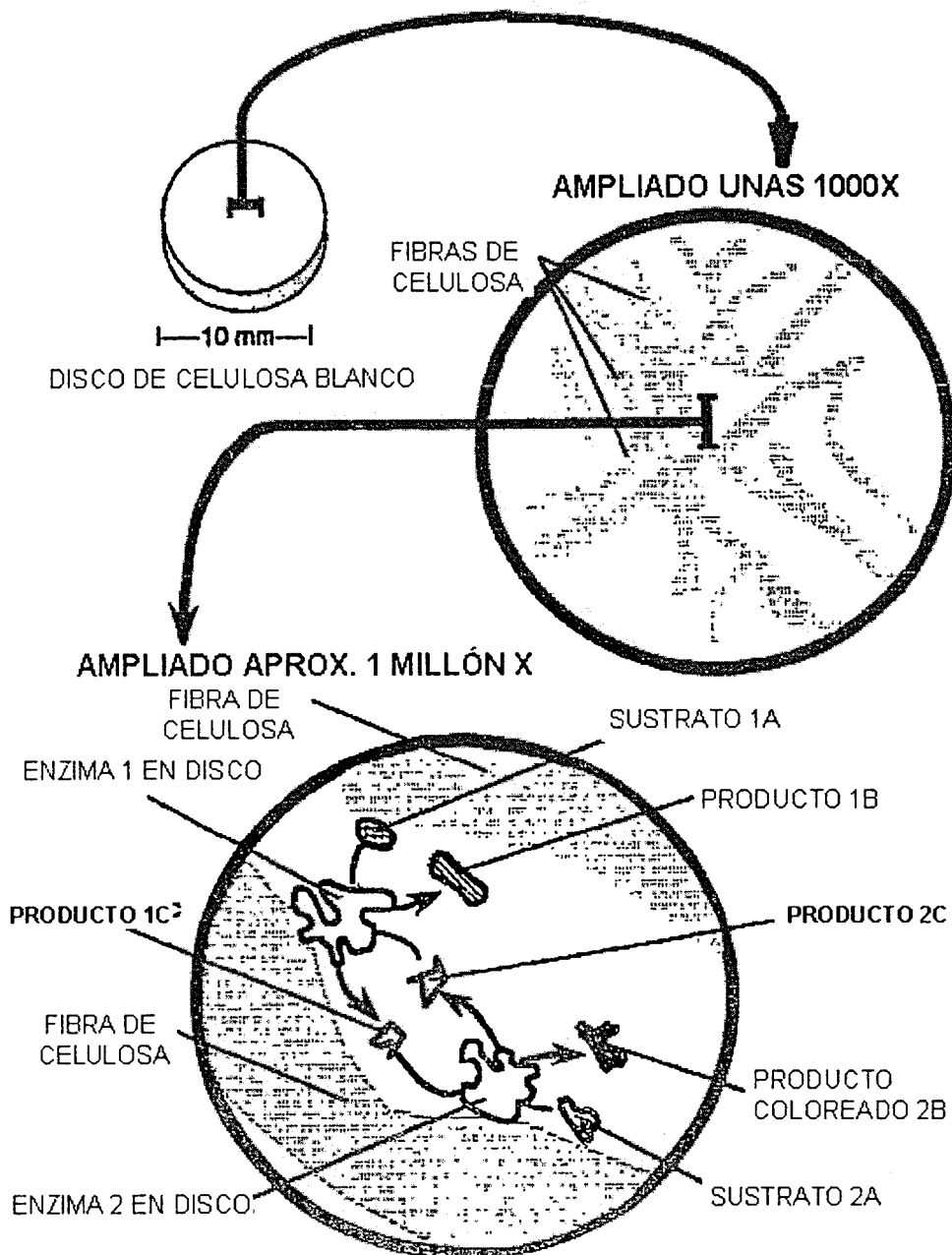


FIG. 2

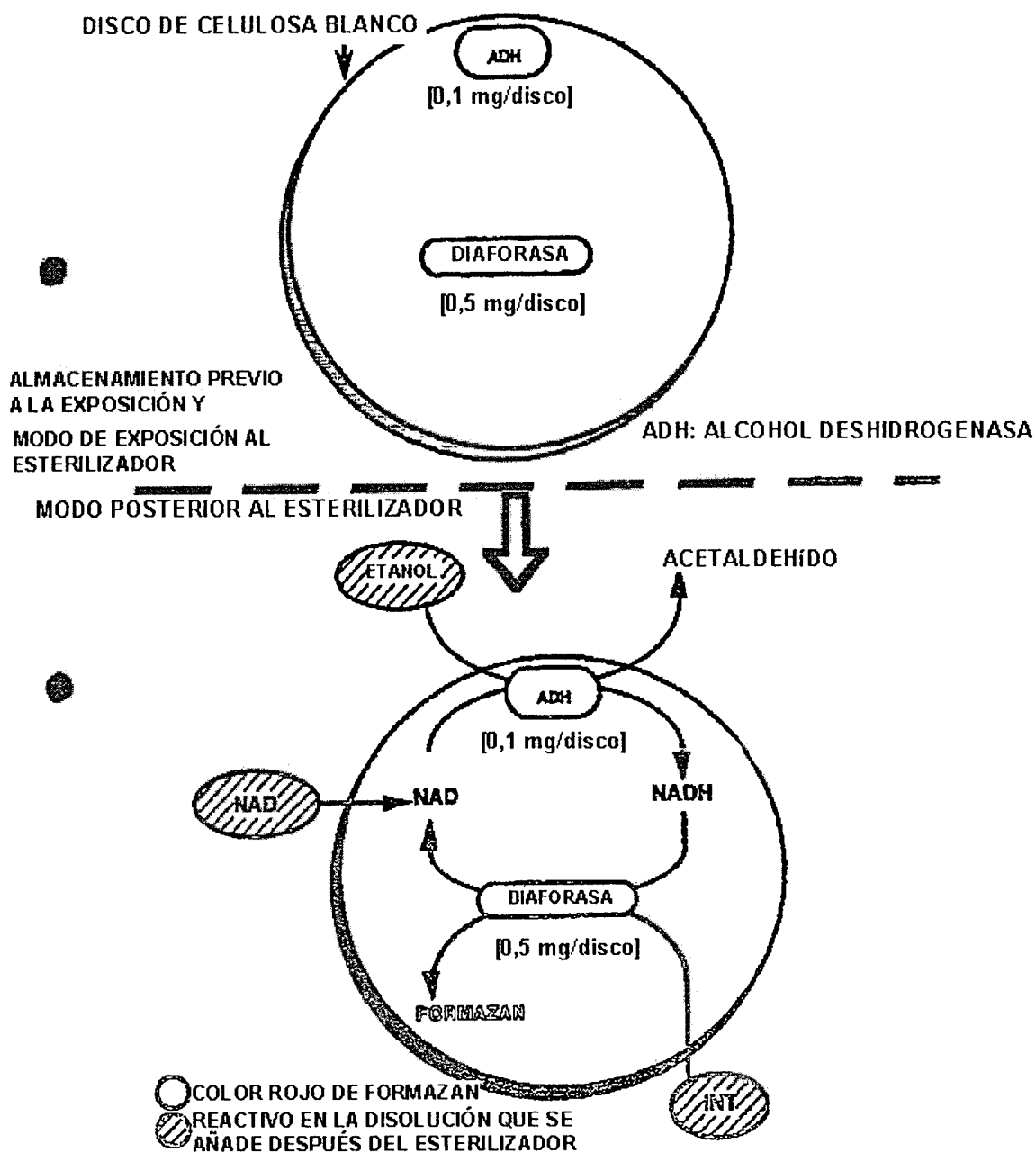


FIG. 3

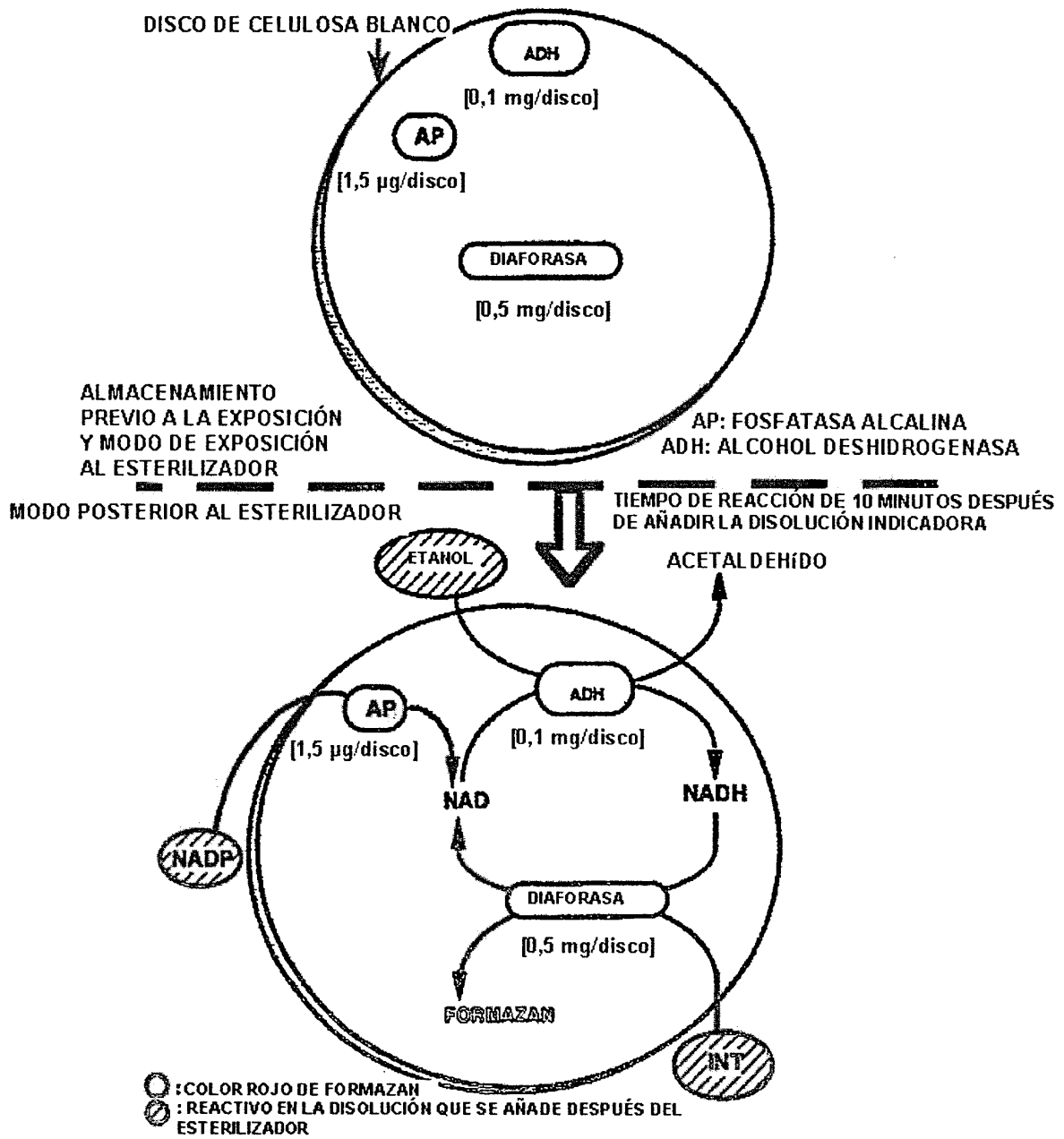


FIG. 4

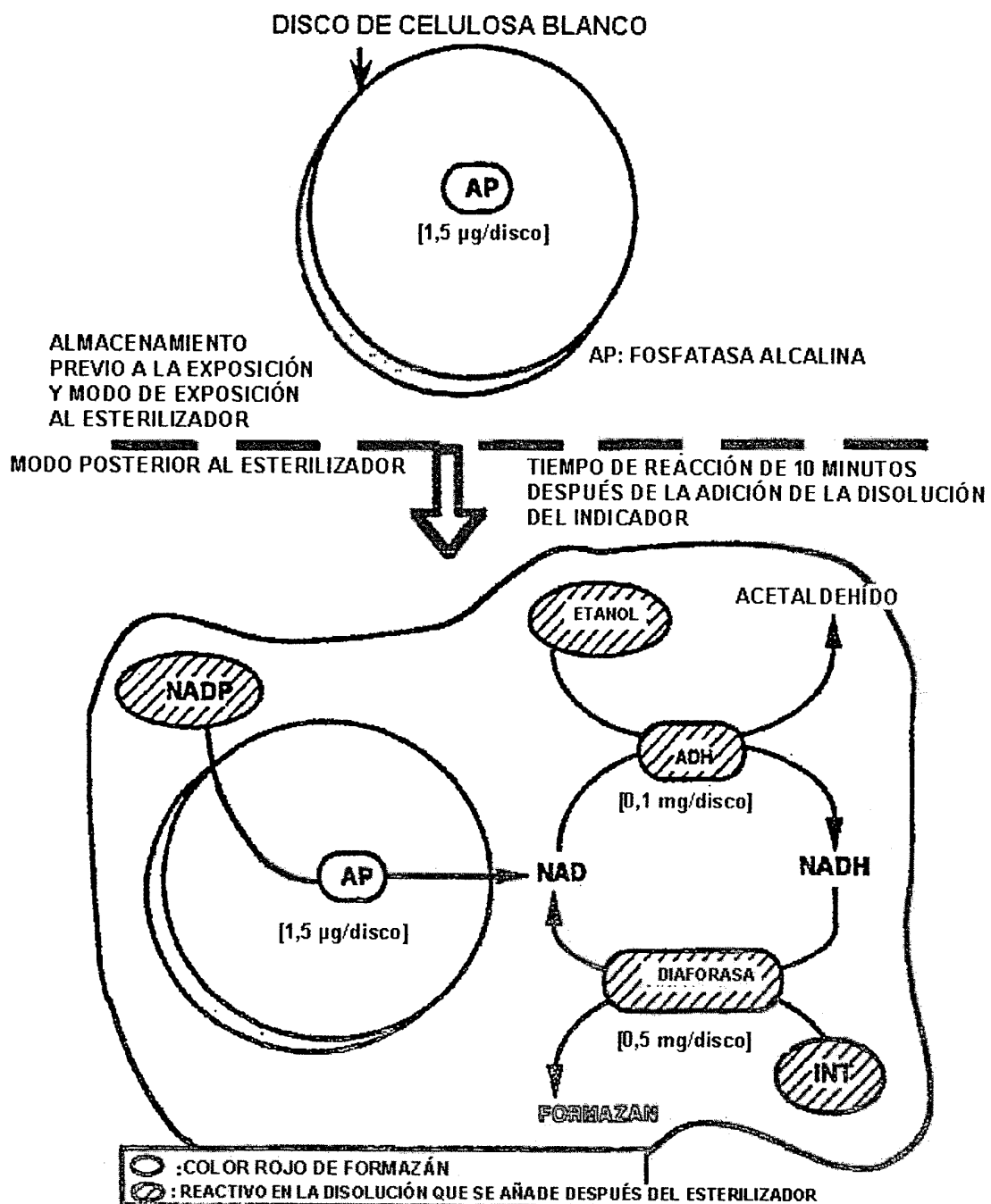


FIG. 5

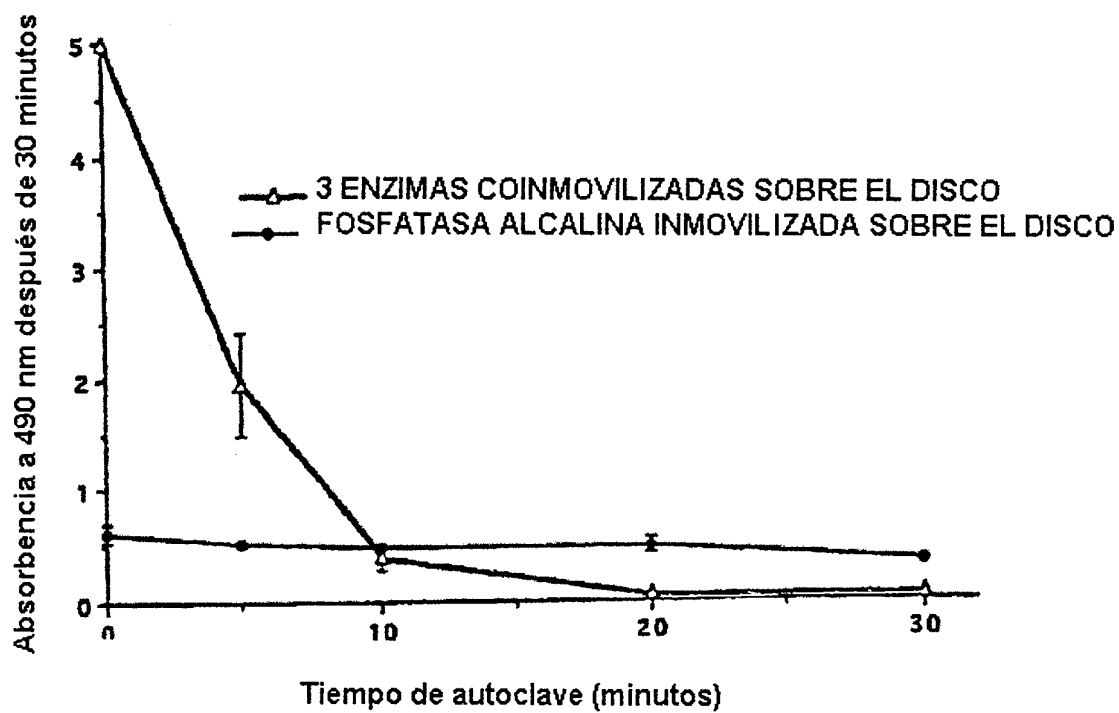


FIG. 6

DIAGRAMA DE LA CONSTRUCCIÓN DEL VIAL INDICADOR

COMPONENTES

SISTEMA TERMINADO

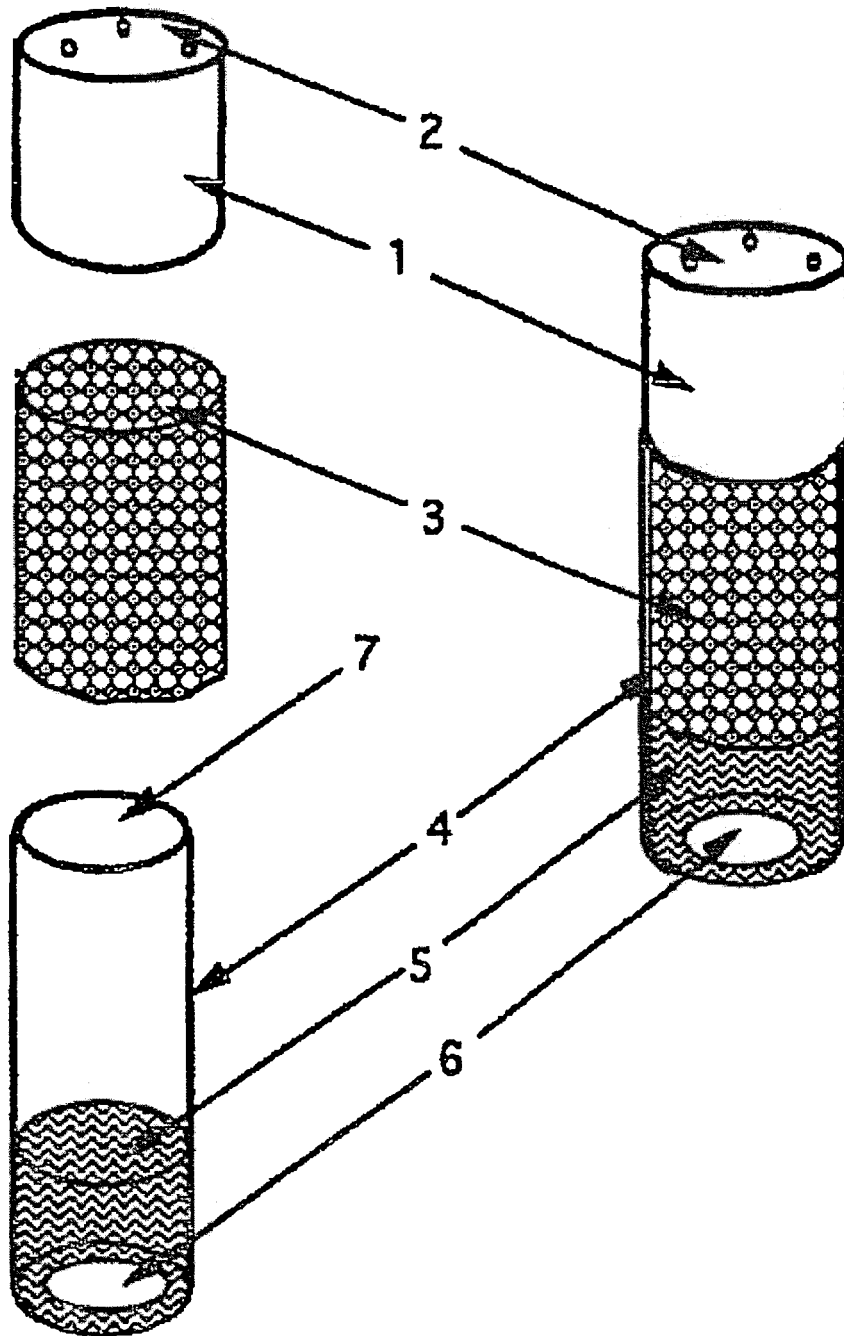


FIGURA 7

FUNCIONAMIENTO DEL INDICADOR

1. Retírese el tapón con esponja
2. Añádase la disolución indicadora con el gotero
3. Incúbese durante el tiempo especificado
4. Se evalúan los discos como un resultado positivo o negativo

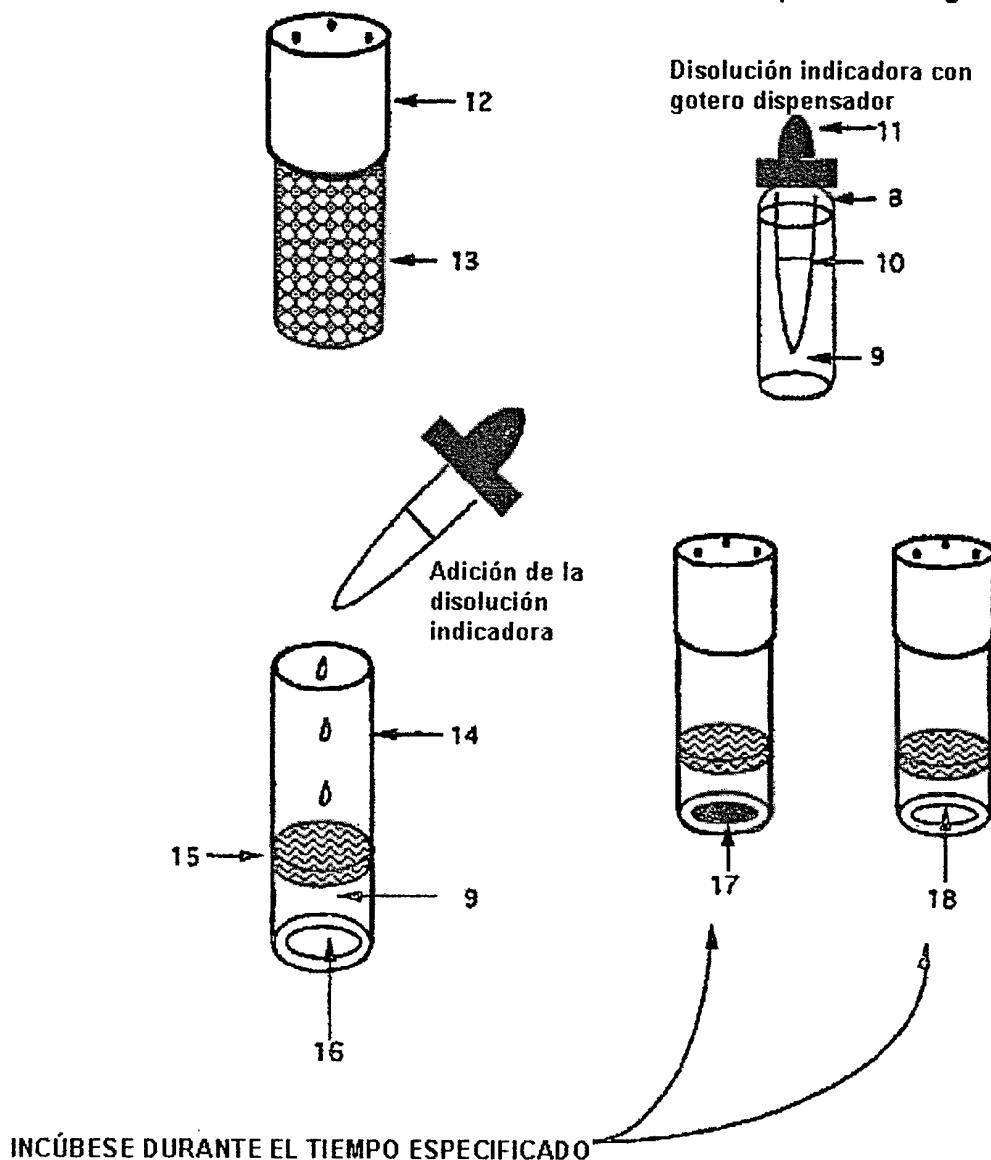


FIG. 8

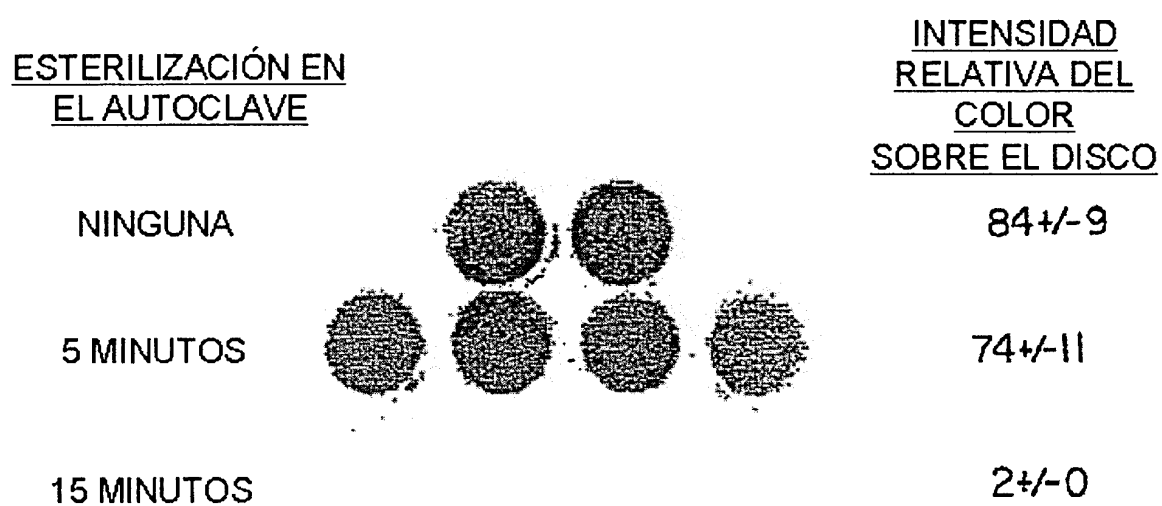


FIG. 9

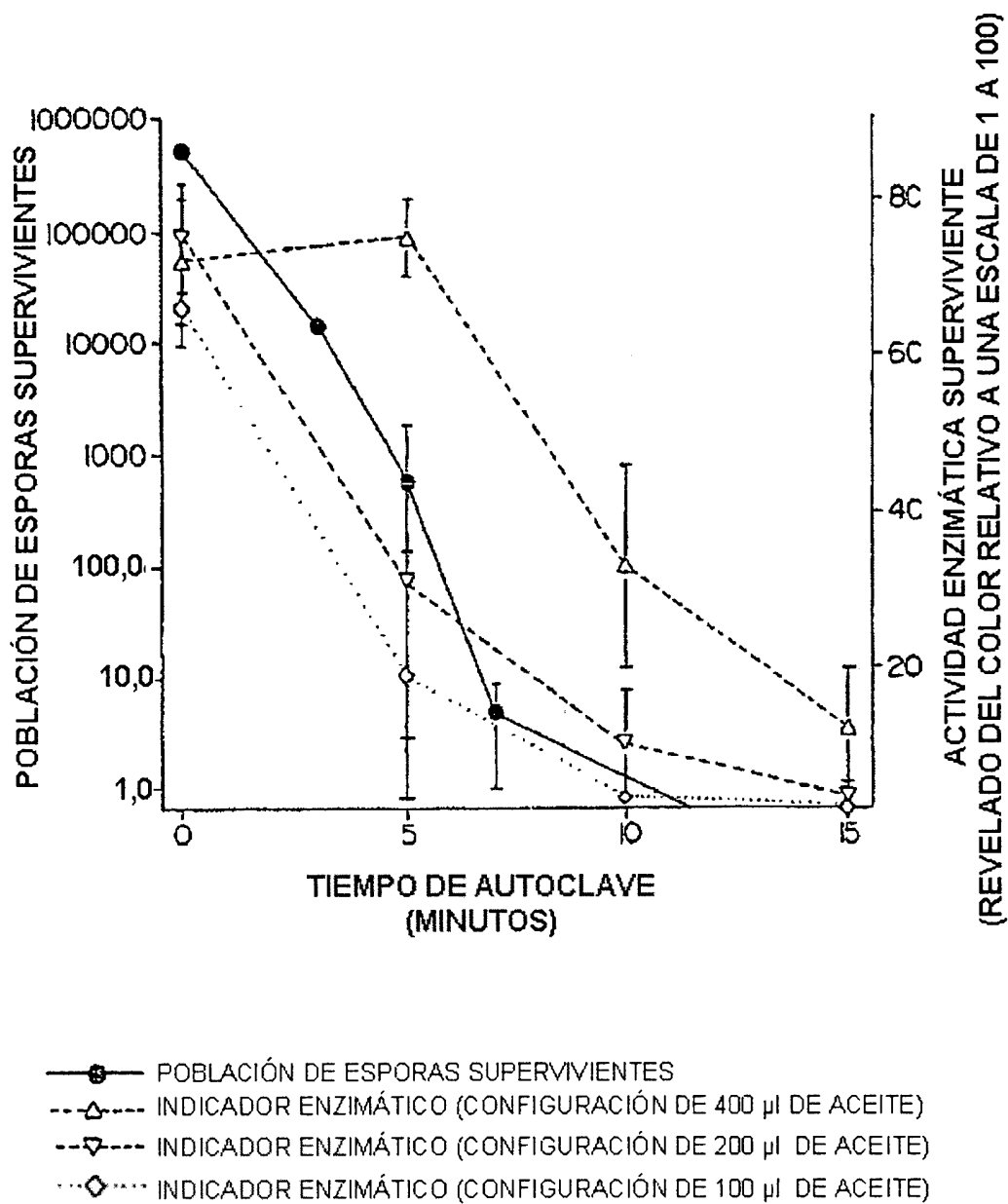


FIG. 10

Construcción de soporte sólido estratificado

