



Velocidad inteligente, seguridad garantizada



La revolución tecnológica
en los sistemas biológicos de
control de la esterilización

¿Por qué es fundamental esterilizar?

En medicina, la prioridad es siempre la seguridad y bienestar del paciente. El principal desafío que enfrentan los hospitales y clínicas es la constante presencia de microorganismos. Si los materiales médicos no son esterilizados de forma adecuada, pueden convertirse en vehículos de transmisión de bacterias, virus y hongos, lo que aumenta el riesgo de Infecciones Asociadas a la Atención Sanitaria (IAAS).

En áreas críticas como las salas de urgencias, cada segundo cuenta. La presión del momento puede generar descuidos en los controles de esterilización y comprometer así la seguridad del paciente. Por eso, garantizar una esterilización eficaz no es solo cumplir con un protocolo: es proteger vidas. Mantener los estándares más exigentes en cada etapa del proceso es la clave para ofrecer una atención completa y libre de riesgos.

¿Qué criterios definen que un material sea estéril?

Un material se considera estéril cuando todos los organismos vivos y agentes biológicos han sido completamente eliminados, inactivados o destruidos. Esto aplica tanto a superficies como a líquidos, medicamentos y medios de cultivo biológicos.

A nivel global, se emplean distintos métodos de esterilización, siendo el vapor uno de los más utilizados. Este procedimiento combina altas temperaturas y presión constante durante un tiempo determinado para lograr una transferencia de calor suficiente para desnaturalizar las proteínas microbianas y provocar su muerte.

Para confirmar que el vapor llegó a todos los materiales procesados y que la esterilización fue efectiva, se utilizan diferentes tipos de indicadores:

• **Indicadores químicos:** cuentan con una tinta reactiva que sufre un cambio físico al ser expuesta al agente esterilizante o a parámetros específicos del proceso. Estos indicadores ofrecen una verificación visual inmediata.

• **Indicadores biológicos:** contienen esporas bacterianas altamente resistentes que deben ser inactivadas durante la esterilización. A diferencia de los indicadores químicos, la verificación de los indicadores biológicos lleva más tiempo ya que es necesario evaluar la proliferación de las esporas para confirmar la eficacia del ciclo de esterilización.

En entornos hospitalarios la demanda de insumos

estériles es constante, por lo que el tiempo de liberación de cargas es un factor clave. La liberación de una carga procesada depende de los resultados de los indicadores que monitorean dicho proceso. Por eso, contar con opciones de lectura rápida es esencial para optimizar los tiempos sin poner en riesgo la seguridad del paciente. Si bien las tecnologías de lectura rápida basadas en fluorescencia han reducido significativamente el tiempo necesario para obtener los resultados de los indicadores biológicos, muchas aún no ofrecen la inmediatez que requieren las situaciones de emergencia crítica.

Photon: la mejor opción para tomar decisiones inmediatas y confiables

Para posibilitar la liberación temprana y segura de cargas esterilizadas en autoclave, Terragene desarrolló el sistema más rápido del mercado: Photon. Este disruptivo sistema consiste en la autolectora Bionova® Photon y el indicador biológico Bionova® BT225. Con una lectura automática de tan solo 7 segundos, el sistema Photon constituye una tecnología sin precedentes, capaz de brindar resultados inmediatos y confiables.

El indicador biológico Bionova® BT225 contiene esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y un medio de cultivo específicamente formulado que contiene un sensor de estructuras de proteínas capaz de generar una señal de fluorescencia. Bionova® BT225 ha sido validado para ciclos de esterilización asistidos por vacío y por desplazamiento de gravedad a 132-135 °C, y fue diseñado conforme a los estándares de calidad ISO 11138-1:2017 e ISO 11138-3:2017.

El sistema de lectura por fluorescencia tradicional es muy diferente al de Photon, ya que se basa en una reacción enzimática. Cuando el indicador biológico no pasa por un ciclo de esterilización o este es ineficiente, las enzimas α -glucosidasa activas, presentes de forma natural en distintas regiones de la estructura de la espora viable de *G. stearothermophilus*, catalizan la degradación del sustrato no fluorescente α -MUG y liberan el subproducto 4-MU. Al ser excitado por la luz UV que genera la autolectora (exc = 340-380 nm), este subproducto emite una señal de fluorescencia que es detectada por el propio dispositivo (em = 455-465 nm).

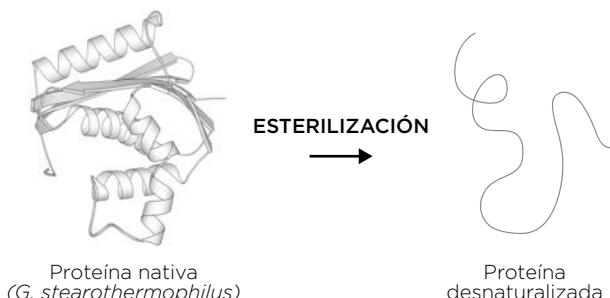
Bionova® BT225, en cambio, se basa en una simple unión instantánea entre un fluoróforo (ANS) y ciertas regiones hidrofóbicas de las proteínas de la espora. Cuando el material es sometido a un ciclo de esterilización exitoso, dichas regiones se destruyen debido al desdoblamiento proteico causado por las altas temperaturas. Esta alteración

modifica las propiedades fluorescentes del ANS y provoca una disminución en la intensidad de emisión, dado que el fluoróforo deja de unirse a la proteína, lo que genera una fluorescencia mínima.

¿Cómo funciona Bionova® Photon BT225?

El componente que diferencia a Bionova® BT225 de otros indicadores biológicos de fluorescencia es el ANS (1-anilino naftaleno-8-sulfonato), un sensor de estructuras de proteínas fluorescente, lo cual permite el monitoreo de cambios conformatacionales. Este compuesto puede unirse de forma no covalente a proteínas nativas o parcialmente desplegadas, específicamente en su dominio transmembrana. Las propiedades fluorescentes del compuesto ANS varían según el entorno en el que se encuentra. Cuando el sensor se une a la proteína, lo hace de manera específica en los sitios hidrofóbicos de su estructura, se produce una variación en la emisión de luz dentro del espectro azul.

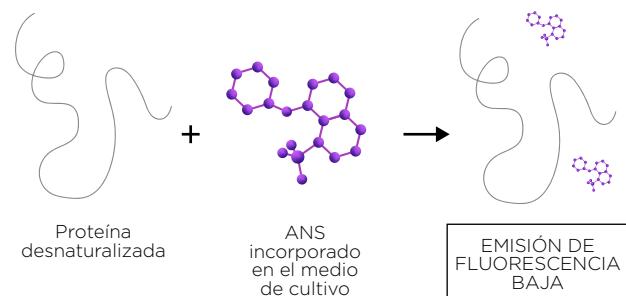
Durante el proceso de esterilización, las proteínas externas presentes en las esporas inoculadas en el indicador se desnaturalizan y su estructura tridimensional se modifica hasta alcanzar un estado desplegado. Esta conformación final está directamente relacionada con las condiciones del proceso de esterilización, como la temperatura, la humedad y el tiempo de exposición. Por eso, estas proteínas pueden considerarse “proteínas sensoras”, ya que su estructura se ve modificada por las condiciones del ciclo de esterilización.



Cuando se activa el indicador tras romper la ampolla contenida en su interior, el medio de cultivo impregna el portador y el ANS entra en contacto con las esporas y sus proteínas externas. En indicadores que no fueron sometidos al proceso de esterilización o este resultó ineficiente, las moléculas de ANS se unen a los bolsillos hidrofóbicas de las proteínas externas, las cuales se encuentran en su estado nativo. Esta interacción aumenta notablemente su rendimiento cuántico y puede detectarse fácilmente mediante técnicas de fluorescencia.



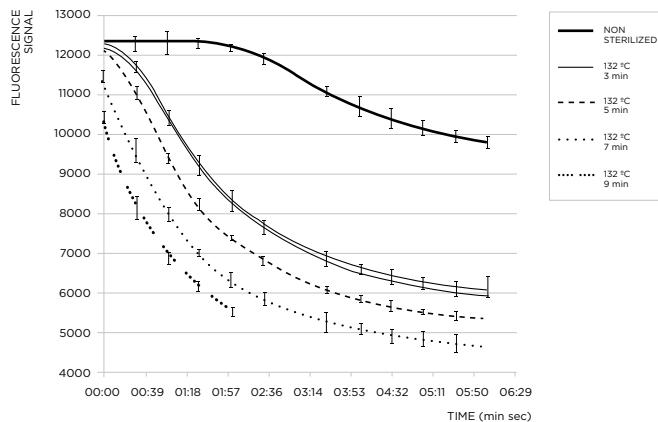
En cambio, cuando el indicador pasa por un ciclo de esterilización exitoso, las proteínas de la espora sufren un cambio conformatacional irreversible. Los sitios hidrofóbicos donde se une el fluoróforo se despliegan y este quedan expuestos al medio acuoso, el cual es un entorno polar. Como resultado, la fluorescencia se reduce drásticamente en comparación con la emitida cuando los sitios hidrofóbicos permanecen intactos:



El ANS responde de forma inmediata, sin necesidad de esperar el tiempo que requieren las reacciones enzimáticas. Como el despliegue de las proteínas de la espora está directamente relacionado con un ciclo de esterilización exitoso y, por lo tanto, con la muerte de las esporas microbianas, la eficacia del proceso puede determinarse al instante.

En solo 7 segundos, el indicador Bionova® BT225, utilizado junto con la auto-lectora Bionova® Photon, genera una señal de fluorescencia detectable. Durante este proceso, la autolectora expone el indicador a luz UV entre 340 y 380 nm, para luego capturar la emisión asociada del fluoróforo (moléculas de ANS unidas a cavidades hidrofóbicas de proteínas) en el rango de 455 a 465 nm. Si la señal de fluorescencia generada es mayor a un determinado valor, el sistema indica una falla en el proceso de esterilización.

El gráfico siguiente muestra la evolución de la señal de fluorescencia en indicadores Bionova® BT225 que no fueron expuestos a proceso de esterilización alguno, medidos en distintos tiempos de incubación y lectura. También se presenta la señal emitida por indicadores sometidos a ciclos de esterilización a 132 °C durante diferentes intervalos (3, 5, 7 y 9 minutos).



La comparación de las señales emitidas demuestra que, cuanto más letal es el ciclo de esterilización, menor es la señal de fluorescencia registrada. La diferencia entre los indicadores no expuestos y aquellos sometidos a distintos ciclos de esterilización es evidente, lo que permite una interpretación precisa de los resultados.

Además, el indicador Bionova® BT225 ofrece una segunda vía de detección: un cambio de color como confirmación visual. La actividad bioquímica de las esporas viables de *G. stearothermophilus* genera subproductos ácidos que genera un cambio de pH en el medio de cultivo, lo cual se visualiza con un cambio de color de violeta a amarillo lo que también indica una falla en el proceso de esterilización. Esta confirmación opcional puede llevarse a cabo luego de la incubación extendida por 48 h a 60 °C.

De acuerdo con la guía de la FDA “Biological Indicator (BI) Premarket Notification [510(k)] Submissions” y la norma ISO 11138-8:2021 “Sterilization of health care products - Biological indicators - Method for validation of a reduced incubation time for a biological indicator”, la lectura rápida de 7 segundos ha sido correlacionada con el resultado visual del cambio de color del pH a los 7 días. Por lo tanto, Bionova® BT225 logra un resultado confiable en solo 7 segundos, con una correlación directa respecto a la lectura visual de 7 días (168 horas) y una sensibilidad $\geq 97\%$.

Sensibilidad de la lectura instantánea en Bionova® BT225

Cualquier indicador biológico de lectura rápida permite predecir y anticipar el crecimiento de esporas que típicamente se observaría en un cultivo convencional de 7 días. La sensibilidad y precisión de Bionova® BT225 han sido validadas siguiendo los lineamientos establecidos por la norma ISO 11138-8:2021 y la Guía de Indicadores Biológicos de la FDA (Attachment II of the “Biological Indicator (BI) Premarket Notification

[510(k)] Submissions”).

Durante el estudio de Tiempo de Incubación Reducido (RIT), los indicadores Bionova® BT225 se expusieron a condiciones subletales, siguiendo las directrices de las normas mencionadas. Estas condiciones se seleccionaron cuidadosamente para garantizar que un porcentaje entre el 30 % y el 80 % de los indicadores sobrevivieran al proceso. La siguiente tabla presenta las condiciones utilizadas para la validación del RIT:

Ciclo	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Tipo
1	132	135	Pre-vacío
2	135	90	Pre-vacío
3	132	75	Desplazamiento de aire por gravedad

Se ensayaron tres lotes de indicadores (100 por cada lote) bajo cada una de las condiciones subletales. Se realizó una lectura rápida de 7 segundos con la autolectora Bionova® Photon mientras que el crecimiento de esporas se siguió durante un total de 7 días de incubación, registrando el comportamiento observado cada 48 horas. La sensibilidad del sistema se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Número de positivos por crecimiento luego de 7 días} - \text{número de falsos negativos}}{\text{Número de positivos por crecimiento luego de 7 días}} \times 100$$

Un resultado falso negativo es aquel que inicialmente muestra una lectura instantánea de fluorescencia negativa, pero que luego muestra crecimiento durante la incubación extendida de 7 días.

Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos durante los estudios de Tiempo de Incubación Reducido (RIT) del Bionova® BT225:

Ver Fig.1, Fig.2 y Fig.3.

Según la norma ISO 11138-8 y la guía de indicadores biológicos de la FDA, una lectura rápida se considera segura cuando los estudios de Tiempo de Incubación Reducido (RIT) muestran sensibilidades superiores al 97 %. Los estudios realizados con Bionova® BT225 demuestran que su lectura de 7 segundos es lo suficientemente sensible para garantizar la liberación segura de la carga.

El sistema Photon combina velocidad y precisión innovadoras, ofreciendo una solución eficiente para optimizar los procesos de esterilización sin comprometer la seguridad del paciente. Su alta sensibilidad y resultados instantáneos lo convierten en una herramienta poderosa para tomar decisiones inmediatas y confiables en situaciones críticas.

Fig.1 Cálculo de la sensibilidad - Ciclos de exposición: 132 °C, 135 segundos (pre-vacío)

Lote	Número de IB positivos luego de 7 días de incubación	Número de IB positivos luego de 7 segundos de incubación	Falsos negativos luego de 7 segundos de incubación	Sensibilidad a los 7 segundos (%)	Número de IB positivos luego de 48 horas de incubación	Falsos negativos luego de 48 horas de incubación	Sensibilidad a las 48 horas (%)
A	56	68	0	100	56	0	100
B	42	49	0	100	42	0	100
C	51	60	0	100	51	0	100

Fig.2 Cálculo de la sensibilidad - Ciclos de exposición: 135°C, 90 segundos (pre-vacío)

Lote	Número de IB positivos luego de 7 días de incubación	Número de IB positivos luego de 7 segundos de incubación	Falsos negativos luego de 7 segundos de incubación	Sensibilidad a los 7 segundos (%)	Número de IB positivos luego de 48 horas de incubación	Falsos negativos luego de 48 horas de incubación	Sensibilidad a las 48 horas (%)
A	62	71	0	100	62	0	100
B	49	57	0	100	49	0	100
C	58	65	0	100	58	0	100

Fig.3 Cálculo de la sensibilidad - Ciclos de exposición: 132°C, 75 segundos (desplazamiento de aire por gravedad)

Lote	Número de IB positivos luego de 7 días de incubación	Número de IB positivos luego de 7 segundos de incubación	Falsos negativos luego de 7 segundos de incubación	Sensibilidad a los 7 segundos (%)	Número de IB positivos luego de 48 horas de incubación	Falsos negativos luego de 48 horas de incubación	Sensibilidad a las 48 horas (%)
A	62	70	0	100	62	0	100
B	49	56	0	100	49	0	100
C	58	67	0	100	58	0	100

Bibliografía

- ISO 11138-1:2017. Esterilización de productos para la salud. Indicadores biológicos. Requisitos generales.
- ISO 11138-3:2017. Esterilización de productos para la salud. Indicadores biológicos. Indicadores biológicos para procesos de esterilización por calor húmedo.
- ISO 11138-8:2021. Esterilización de productos para la salud. Método para la validación de un tiempo de incubación reducido para un indicador biológico.
- FDA. (2007, 4 de octubre). Biological Indicator (BI) Premarket Notification [510(k)] Submissions (Attachment II).
- Daniel, E., & Weber, G. (1966). Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations. *Biochemistry*, 5, 1893-1900.
- Matulis, D., Baumann, C. G., Bloomfield, V. A., & Lovrien, R. E. (1999). 1-anilino-8-naphthalenesulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers*, 49, 451-458.
- Kirk, W., & Klimtchuk, E. (2007). Photophysics of ANS. III: Circular dichroism of ANS and anilinonaphthalene in I-FABP. *Biophysical Chemistry*, 125, 24-31.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., & Gilmanshin, R. I. (1991). Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, 31, 119-128.
- Cattoni, D. I., González Flecha, F. L., & Arguello, J. M. (2008). Thermal stability of CopA, a polytopic membrane protein from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471, 198-206.
- Huesca-Espitia, L. C., Suvira, M., Rosenbeck, K., Korza, G., Setlow, B., Li, W., Wang, S., Li, Y.-q., & Setlow, P. (2016). Effects of steam autoclave treatment on *Geobacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 1300-1311.