



Velocidade inteligente, segurança garantida



A revolução tecnológica
nos sistemas biológicos de
controle da esterilização

terragene.com

Por que é fundamental esterilizar?

Na medicina, a prioridade é sempre a segurança e o bem-estar do paciente. O principal desafio enfrentado por hospitais e clínicas é a presença constante de microrganismos. Se os materiais médicos não forem esterilizados adequadamente, podem tornar-se veículos de transmissão de bactérias, vírus e fungos, aumentando o risco de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).

Em áreas críticas como as salas de emergência, cada segundo conta. A pressão do momento pode gerar falhas nos controles de esterilização e comprometer, assim, a segurança do paciente. Por isso, garantir uma esterilização eficaz não é apenas cumprir um protocolo: é proteger vidas. Manter os padrões mais rigorosos em cada etapa do processo é a chave para oferecer um atendimento completo e livre de riscos.

Quais critérios definem que um material seja estéril?

Um material é considerado estéril quando todos os organismos vivos e agentes biológicos foram completamente eliminados, inativados ou destruídos. Isso se aplica tanto a superfícies quanto a líquidos, medicamentos e meios de cultura biológicos.

Em âmbito global, são utilizados diferentes métodos de esterilização, sendo o vapor um dos mais utilizados. Esse procedimento combina altas temperaturas e pressão constante durante um determinado período para alcançar uma transferência de calor suficiente para desnaturar as proteínas microbianas e provocar sua morte.

Para confirmar que o vapor alcançou todos os materiais processados e que a esterilização foi eficaz, são utilizados diferentes tipos de indicadores:

- **Indicadores químicos:** possuem uma tinta reativa que sofre uma alteração física quando exposta ao agente esterilizante ou a parâmetros específicos do processo. Esses indicadores oferecem uma verificação visual imediata.
- **Indicadores biológicos:** contêm esporos bacterianos altamente resistentes que devem ser inativados durante o processo de esterilização. Diferentemente dos indicadores químicos, a verificação dos indicadores biológicos leva mais tempo, pois é necessário avaliar a proliferação dos esporos para confirmar a eficácia do ciclo de esterilização.

Em ambientes hospitalares, a demanda por insumos

estéreis é constante, portanto o tempo de liberação das cargas é um fator fundamental. A liberação de uma carga processada depende dos resultados dos indicadores que monitoram esse processo. Por isso, contar com opções de leitura rápida é essencial para otimizar os tempos sem colocar em risco a segurança do paciente. Embora as tecnologias de leitura rápida baseadas em fluorescência tenham reduzido significativamente o tempo necessário para obter os resultados dos indicadores biológicos, muitas ainda não oferecem a instantaneidade exigida em situações de emergência crítica..

Photon: a melhor opção para tomar decisões imediatas e confiáveis

Para possibilitar a liberação precoce e segura de cargas esterilizadas em autoclave, a Terragene desenvolveu o sistema mais rápido do mercado: Photon. Este sistema inovador consiste na autoleitora Bionova® Photon e no indicador biológico Bionova® BT225. Com uma leitura automática de apenas 7 segundos, o sistema Photon representa uma tecnologia sem precedentes, capaz de fornecer resultados imediatos e confiáveis.

O indicador biológico Bionova® BT225 contém esporos de *Geobacillus stearothermophilus* e um meio de cultura especificamente formulado que inclui um sensor de estruturas proteicas capaz de gerar um sinal de fluorescência. O Bionova® BT225 foi validado para ciclos de esterilização assistidos por vácuo e por deslocamento de ar por gravidade a 132-135 °C, e foi desenvolvido de acordo com os padrões de qualidade ISO 11138-1:2017 e ISO 11138-3:2017.

O sistema tradicional de leitura por fluorescência é muito diferente do Photon, pois se baseia em uma reação enzimática. Quando o indicador biológico não passa por um ciclo de esterilização ou quando este é ineficiente, as enzimas α -glicosidase ativas, presentes naturalmente em diferentes regiões da estrutura do esporo viável de *G. stearothermophilus*, catalisam a degradação do substrato não fluorescente α -MUG e liberam o subproduto 4-MU. Quando excitado pela luz UV gerada pela autoleitora (exc = 340-380 nm), esse subproduto emite um sinal de fluorescência que é detectado pelo próprio dispositivo (em = 455-465 nm).

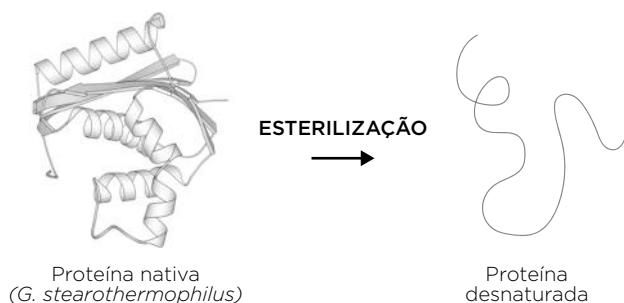
O Bionova® BT225, por outro lado, baseia-se em uma simples ligação instantânea entre um fluoróforo (ANS) e determinadas regiões hidrofóbicas das proteínas do esporo. Quando o material é submetido a um ciclo de esterilização bem-sucedido, essas regiões são destruídas devido ao desdobramento proteico causado pelas altas temperaturas. Essa alteração modifica as propriedades fluorescentes do

ANS e provoca uma diminuição na intensidade de emissão, uma vez que o fluoróforo deixa de se ligar à proteína, gerando uma fluorescência mínima.

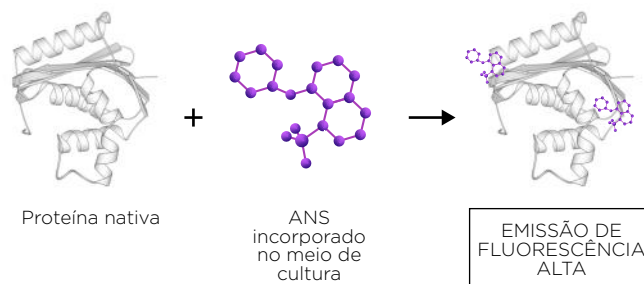
Como funciona o Bionova® Photon BT225?

O componente que diferencia o Bionova® BT225 de outros indicadores biológicos de fluorescência é o ANS (1-anilino naftaleno-8-sulfonato), um sensor fluorescente de estruturas proteicas, o que permite o monitoramento de mudanças conformacionais. Esse composto pode se ligar de forma não covalente a proteínas nativas ou parcialmente desnaturadas, especificamente em seu domínio transmembrana. As propriedades fluorescentes do composto ANS variam de acordo com o ambiente em que se encontra. Quando o sensor se liga à proteína, isso ocorre de maneira específica nos sítios hidrofóbicos de sua estrutura, produzindo uma variação na emissão de luz dentro do espectro azul.

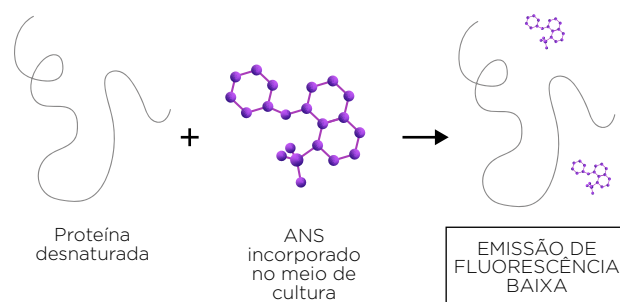
Durante o processo de esterilização, as proteínas externas presentes nos esporos inoculados no indicador se desnaturam e sua estrutura tridimensional se modifica até alcançar um estado desenovelado. Essa conformação final está diretamente relacionada às condições do processo de esterilização, como temperatura, umidade e tempo de exposição. Por isso, essas proteínas podem ser consideradas “proteínas sensoras”, já que sua estrutura é modificada pelas condições do ciclo de esterilização.



Quando o indicador é ativado após a ruptura da ampola contida em seu interior, o meio de cultura impregna o portador e o ANS entra em contato com os esporos e suas proteínas externas. Em indicadores que não foram submetidos ao processo de esterilização ou quando este foi ineficiente, as moléculas de ANS se ligam aos bolsões hidrofóbicos das proteínas externas, que se encontram em seu estado nativo. Essa interação aumenta significativamente seu rendimento quântico e pode ser facilmente detectada por meio de técnicas de fluorescência.



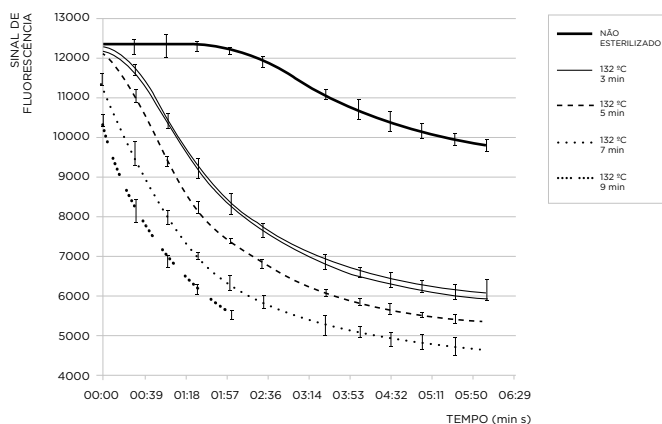
Por outro lado, quando o indicador passa por um ciclo de esterilização bem-sucedido, as proteínas do esporo sofrem uma mudança conformacional irreversível. Os sítios hidrofóbicos onde o fluoróforo se liga se desdobram e ficam expostos ao meio aquoso, que é um ambiente polar. Como resultado, a fluorescência é drasticamente reduzida em comparação com aquela emitida quando os sítios hidrofóbicos permanecem intactos:



O ANS detecta de forma imediata, sem a necessidade de esperar o tempo exigido pelas reações enzimáticas. Como o desdobramento das proteínas do esporo está diretamente relacionado a um ciclo de esterilização bem-sucedido e, portanto, à morte dos esporos microbianos, a eficácia do processo pode ser determinada instantaneamente.

Em apenas 7 segundos, o indicador Bionova® BT225, utilizado em conjunto com a autoleitora Bionova® Photon, gera um sinal de fluorescência detectável. Durante esse processo, a autoleitora expõe o indicador à luz UV entre 340 e 380 nm e, em seguida, captura a emissão associada do fluoróforo (moléculas de ANS ligadas a cavidades hidrofóbicas das proteínas) no intervalo de 455 a 465 nm. Se o sinal de fluorescência gerado for maior que um determinado valor, o sistema indica uma falha no processo de esterilização.

O gráfico a seguir mostra a evolução do sinal de fluorescência em indicadores Bionova® BT225 que não foram expostos a nenhum processo de esterilização, medidos em diferentes tempos de incubação e leitura. Também é apresentado o sinal emitido por indicadores submetidos a ciclos de esterilização a 132 °C durante diferentes intervalos (3, 5, 7 e 9 minutos).



A comparação dos sinais emitidos demonstra que, quanto mais letal é o ciclo de esterilização, menor é o sinal de fluorescência registrado. A diferença entre os indicadores não expostos e aqueles submetidos a diferentes ciclos de esterilização é evidente, o que permite uma interpretação precisa dos resultados.

Além disso, o indicador Bionova® BT225 oferece uma segunda via de detecção: uma mudança de cor como confirmação visual. A atividade bioquímica dos esporos viáveis de *G. stearothermophilus* gera subprodutos ácidos que provocam uma alteração do pH no meio de cultura, o que se visualiza por meio de uma mudança de cor de violeta para amarelo, indicando também uma falha no processo de esterilização. Essa confirmação opcional pode ser realizada após uma incubação prolongada de 48 h a 60 °C.

De acordo com o guia da FDA “Biological Indicator (BI) Premarket Notification [510(k)] Submissions” e com a norma ISO 11138-8:2021 “Sterilization of health care products – Biological indicators – Method for validation of a reduced incubation time for a biological indicator”, a leitura rápida de 7 segundos foi correlacionada com o resultado visual da mudança de cor do pH após 7 dias. Portanto, o Bionova® BT225 obtém um resultado confiável em apenas 7 segundos, com correlação direta em relação à leitura visual de 7 dias (168 horas) e sensibilidade ≥ 97 %.

Sensibilidade da leitura instantânea no Bionova® BT225

Qualquer indicador biológico de leitura rápida permite prever e antecipar o crescimento de esporos que normalmente seria observado em um cultivo convencional de 7 dias. A sensibilidade e a precisão do Bionova® BT225 foram validadas seguindo as diretrizes estabelecidas pela norma ISO 11138-8:2021 e pelo Guia de Indicadores Biológicos da FDA (Attachment II do “Biological Indicator (BI) Premarket Notification [510(k)] Submissions”).

Durante o estudo de Tempo de Incubação Reduzido (RIT), os indicadores Bionova® BT225 foram expostos a condições subletais, seguindo as diretrizes das normas mencionadas. Essas condições foram cuidadosamente selecionadas para garantir que uma porcentagem entre 30 % e 80 % dos indicadores sobrevivesse ao processo. A tabela a seguir apresenta as condições utilizadas para a validação do RIT:

Ciclo	Temp (°C)	Tempo (seg)	Tipo
1	132	135	Pré-vácuo
2	135	90	Pré-vácuo
3	132	75	Deslocamento de ar por gravidade

Foram testados três lotes de indicadores (100 por cada lote) sob cada uma das condições subletais. Foi realizada uma leitura rápida de 7 segundos com a autoleitora Bionova® Photon, enquanto o crescimento dos esporos foi acompanhado durante um total de 7 dias de incubação, registrando o comportamento observado a cada 48 horas. A sensibilidade do sistema é calculada por meio da seguinte expressão:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Número de positivos por crescimento após 7 dias} - \text{número de falsos negativos}}{\text{Número de positivos por crescimento após 7 dias}} \times 100$$

Um resultado falso negativo é aquele que inicialmente apresenta uma leitura instantânea de fluorescência negativa, mas que posteriormente mostra crescimento durante a incubação prolongada de 7 dias.

As tabelas a seguir apresentam os resultados obtidos durante os estudos de Tempo de Incubação Reduzido (RIT) do Bionova® BT225:

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

De acordo com a norma ISO 11138-8 e o guia de indicadores biológicos da FDA, uma leitura rápida é considerada segura quando os estudos de Tempo de Incubação Reduzido (RIT) demonstram sensibilidades superiores a 97 %. Os estudos realizados com o Bionova® BT225 demonstram que sua leitura de 7 segundos é suficientemente sensível para garantir a liberação segura da carga.

O sistema Photon combina velocidade e precisão inovadoras, oferecendo uma solução eficiente para otimizar os processos de esterilização sem comprometer a segurança do paciente. Sua alta sensibilidade e resultados instantâneos o tornam uma ferramenta poderosa para tomar decisões imediatas e confiáveis em situações críticas.

Fig.1 Cálculo da sensibilidade - Ciclos de exposição: 132 °C, 135 segundos (pré-vácuo)

Lote	Número de IB positivos após 7 dias de incubação	Número de IB positivos após 7 segundos de incubação	Falsos negativos após 7 segundos de incubação	Sensibilidade aos 7 segundos (%)	Número de IB positivos após 48 horas de incubação	Falsos negativos após 48 horas de incubação	Sensibilidade às 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 da sensibilidade - Ciclos de exposição: 135 °C, 90 segundos (pré-vácuo)

Lote	Número de IB positivos após 7 dias de incubação	Número de IB positivos após 7 segundos de incubação	Falsos negativos após 7 segundos de incubação	Sensibilidade aos 7 segundos (%)	Número de IB positivos após 48 horas de incubação	Falsos negativos após 48 horas de incubação	Sensibilidade às 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 da sensibilidade - Ciclos de exposição: 132 °C, 75 segundos (deslocamento de ar por gravidade)

Lote	Número de IB positivos após 7 dias de incubação	Número de IB positivos após 7 segundos de incubação	Falsos negativos após 7 segundos de incubação	Sensibilidade aos 7 segundos (%)	Número de IB positivos após 48 horas de incubação	Falsos negativos após 48 horas de incubação	Sensibilidade às 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

Bibliografia

- ISO 11138-1:2017. Esterilização de produtos para a saúde. Indicadores biológicos. Requisitos gerais.
- ISO 11138-3:2017. Esterilização de produtos para a saúde. Indicadores biológicos. Indicadores biológicos para processos de esterilização por calor úmido.
- ISO 11138-8:2021. Esterilização de produtos para a saúde. Método para validação de um tempo de incubação reduzido para um indicador biológico.
- FDA. (2007, 4 de outubro). 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 anilino-naphthalene 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.