



# Re-incubación de Indicadores Biológicos de lectura por Fluorescencia: un error muy común

Rev. 1 | Enero 2022

Durante la última década, la industria de los indicadores biológicos ha enfrentado nuevos desafíos, tales como la necesidad de una mayor velocidad de reprocessamiento de materiales reutilizables; el desarrollo de nuevos dispositivos e instrumentos médicos, la aparición de nuevas tecnologías para su reprocessamiento y la necesidad de indicadores adecuados para su control.

Frente a estos nuevos desafíos, los fabricantes de controles de esterilización han invertido esfuerzos en el desarrollo de indicadores biológicos de lectura rápida, que se basan en la fluorescencia como método de detección temprana, reduciendo sustancialmente los tiempos necesarios para disponer nuevamente de instrumentos estériles.

La fluorescencia es un fenómeno luminoso de muy corta duración, indetectable por el ojo humano, mediante el cual las sustancias con capacidad de fluorescer absorben energía, se “excitan” y posteriormente emiten luz, es decir, fluorescen (ver Figura 1). Cada molécula fluorescente es capaz de absorber y emitir energía con determinadas características, las cuales permiten estimular y detectar su presencia mediante filtros y sensores especiales (por ejemplo en la posición de lectura de una incubadora auto-lectora).

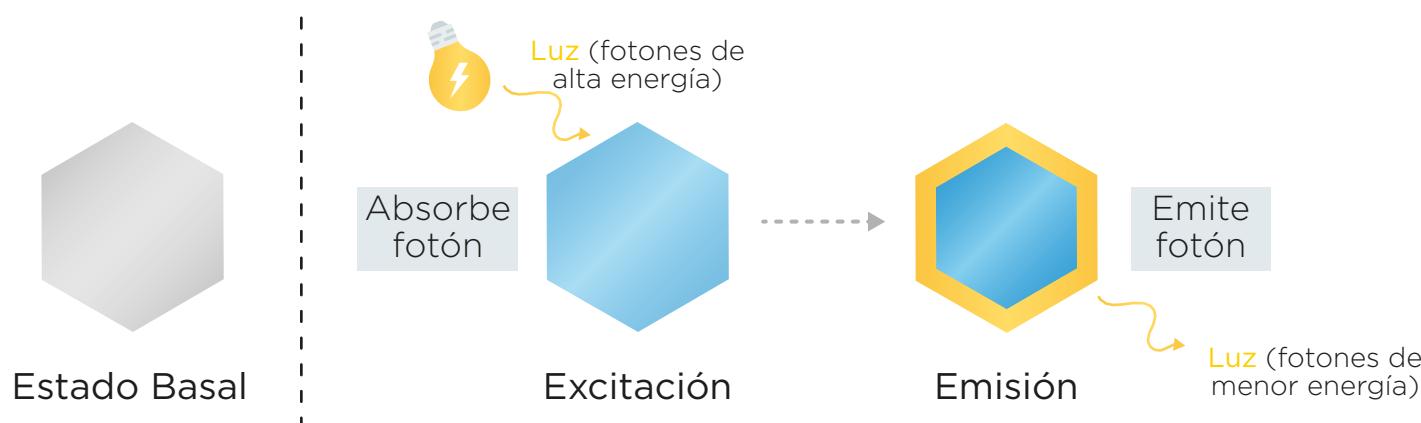


Figura 1. Representación gráfica de lo que sucede con una molécula capaz de fluorescer al ser estimulada con energía adecuada.

Terragene®, pionera en innovación tecnológica en control de infecciones, desarrolló indicadores biológicos basados en el sistema de fluorescencia cuando las esporas inoculadas en los mismos

permanecen viables luego del proceso de esterilización, reduciendo significativamente los tiempos de incubación.

El sistema de detección temprana por fluorescencia está basado en la actividad enzimática. Ésta proviene de una enzima (proteína con actividad intrínseca) que se encuentra en las esporas. Estas enzimas quedarán disponibles en el momento que las esporas tomen contacto con el medio de cultivo, se hidraten y germinen. En ese momento las enzimas comenzarán a actuar sobre el sustrato fluorescente que está disponible en el medio de cultivo.

Lo que ocurre a partir de la unión entre el sustrato y la enzima va a determinar cómo se comporta el IB y esto está descripto por la cinética de la reacción. En otras palabras, la aparición, permanencia y desaparición de la fluorescencia dependen de la actividad enzimática.

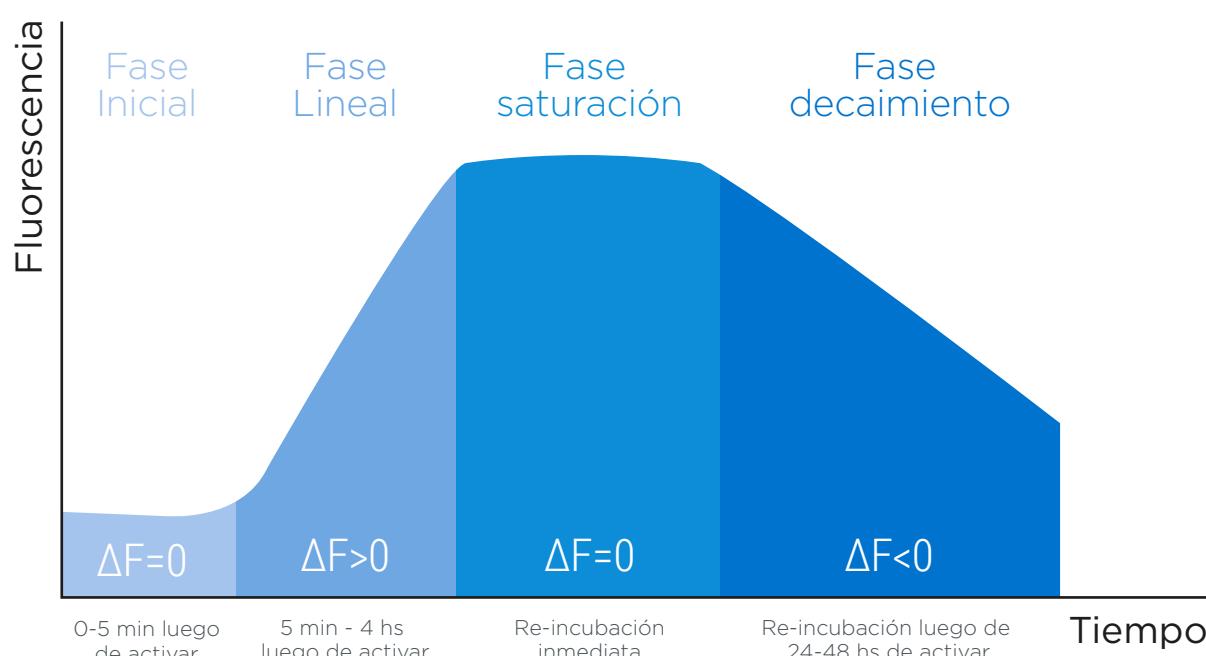


Figura 2. Curva de cinética enzimática del sistema de lectura por fluorescencia.  $\Delta F$  corresponde a la diferencia entre el valor medido en un dado momento de la incubación respecto del valor tomado como referencia durante la fase inicial.

La reacción enzimática es un proceso dinámico y debido a ello no es posible saber a priori el momento exacto en el cual aparecerá la fluorescencia. El momento y la intensidad de fluorescencia dependerán de la cantidad de enzimas disponibles que conserven actividad luego de la esterilización, del estado del medio de cultivo luego de la exposición, de la temperatura de incubación, entre otros. Por lo tanto, para detectar la fluorescencia en el tiempo más corto posible y determinar si el resultado es positivo o negativo, se debe medir la fluorescencia a lo largo de todo el período de incubación relativizando cada medida a un valor de referencia; es decir, las medidas corresponden a diferencias entre el valor medido y un valor de referencia (que para cada IB es diferente). Cuando esa diferencia supera un valor pre-establecido para el IB en cuestión, el resultado será positivo y esto podrá ocurrir en cualquier momento durante el tiempo de incubación. Cuando la diferencia caiga por debajo del valor de referencia, el resultado de esa incubación será negativo al llegar al final del tiempo del programa.

La curva de cinética enzimática de un IB de fluorescencia consta de cuatro fases bien definidas

que coinciden con la emisión de fluorescencia, en el caso de tener esporas viables luego del proceso de esterilización. Si ninguna espora sobrevive al ciclo de esterilización, no habrá germinación ni crecimiento, no habrá fluorescencia, ni actividad enzimática. En este caso, el resultado será inevitablemente negativo.

La fase **inicial** o de latencia, es el tiempo necesario para que las esporas entren en contacto con el medio de cultivo, perciban las condiciones favorables que les otorga el mismo, se alcance la temperatura mínima de germinación y se produzca el proceso de germinación propiamente dicho. En esta fase no se observa fluorescencia debido a que no hay aún enzimas disponibles para reaccionar con el sustrato y generar fluorescencia ( $\Delta F=0$ ), por lo que **la incubadora autolectora no emitirá ningún resultado**. Este es uno de los principales motivos por los cuales los indicadores biológicos precisan de un mínimo tiempo de incubación. En esta fase, se toma el valor de fluorescencia de referencia para realizar las subsiguientes medidas comparativas.

En la fase lineal, la velocidad de reacción es máxima, debido a que las enzimas entran en contacto con los sustratos disponibles en el medio, dando lugar a incrementos notables en la fluorescencia ( $\Delta F>0$ ). En este momento la autolectora realiza lecturas de fluorescencia durante el tiempo correspondiente al programa del IB o hasta detectar una diferencia entre las mismas, **arrojando un resultado positivo**.

Durante la fase de **saturación** o estacionaria no hay actividad enzimática neta debido a que todas las enzimas están ocupadas con sustrato, por lo que no hay un aumento neto de la fluorescencia ( $\Delta F=0$ ). Si se incuba e intenta leer un IB en esta etapa de actividad enzimática del sistema, por ejemplo reincubando el IB, **el resultado arrojado por la autolectora será negativo**, debido a que el valor de referencia inicial de fluorescencia se encuentra en su valor máximo, por lo que la incubadora no va detectar diferencias de fluorescencia a lo largo de toda la incubación. El resultado será negativo aún cuando el indicador haya arrojado un resultado positivo durante su primera incubación (cuando el valor de referencia era el correspondiente a la fase inicial de la actividad enzimática).

En la fase de **decaimiento** o inhibición ( $\Delta F<0$ ), la pendiente es lineal negativa debido a que comienza a agotarse el sustrato y/o ocurre el fenómeno de inhibición dada por un exceso de producto. Si se reincuba un indicador que se encuentre en este punto, como puede suceder al día siguiente de la incubación inicial, **el resultado arrojado por la autolectora será negativo** (la enzima está inhibida o ya no queda más sustrato para procesar).

Por esto, **bajo ningún concepto es correcto reincubar los indicadores biológicos de Fluorescencia**. Un IB basado en lectura por fluorescencia **debe ser incubado inmediatamente luego de ser activado**.

