

Mitigación de la contaminación en las estufas de incubación de cultivo celular

El control de la contaminación comienza desde el interior. Para reducir al mínimo la tendencia a la contaminación de las superficies y del aire, se han combinado tres factores: el diseño de las estufas de incubación, los materiales empleados y las técnicas de uso prudente.

INTRODUCCIÓN A LAS ESTUFAS DE INCUBACIÓN DE CULTIVO CELULAR

Las estufas de incubación de cultivo celular están diseñadas para reproducir de manera artificial *in vitro* las condiciones inherentes a la fisiología *in vivo* habitual de los modelos humanos y animales. El crecimiento celular fuera de un ambiente natural presenta innumerables retos asociados a la exposición a microorganismos que no están presentes en el estado *in vivo*. En función del tipo de cultivos celulares manipulados, deberán controlarse cuidadosamente varios parámetros de funcionamiento en lo que respecta a la exactitud, la repetibilidad y la flexibilidad en las elecciones de los puntos de control. Algunos de estos parámetros son la temperatura, el control del gas y la humedad relativa.

- Las estufas de incubación de cultivo celular están diseñadas para crear y mantener un ambiente controlado y estable; para ello, regulan la temperatura en un punto de control habitual de 37 °C o a lo largo de un intervalo que va desde la temperatura ambiente hasta puntos por encima de los 37 °C.
- Los gases de la estufa de incubación suelen incluir el CO₂ y el O₂. El CO₂ se estabiliza en un punto de control preciso para mantener el pH deseado en el medio de cultivo celular, ya sea líquido o gel. La concentración del CO₂ de la estufa de incubación funciona como un tampón de pH de importancia clave. Algunos materiales biológicos pueden requerir diferentes niveles de pH. Las concentraciones deseadas de los puntos de control del CO₂ pueden diferir. La mayor parte de los medios contienen un indicador que ayuda a detectar los cambios que se producen en el pH.
- Para lograr ambientes óptimos para los cultivos celulares, hay que incorporar humidificación para prevenir la deshidratación de los medios. A pesar de que algunas estufas de incubación cuentan con sistemas de humidificación internos con depósitos de agua caliente, la mayor parte incluye recipientes humidificadores extraíbles diseñadas para albergar agua destilada estéril que se evapora para aumentar de manera natural la presión de vapor.
- Se debe evitar el uso de agua desionizada en el recipiente humidificador. Debido a su falta de iones, el agua desionizada lixiviará los iones del acero inoxidable, lo que ocasionará corrosión alveolar que puede albergar contaminación. El agua desionizada reaccionará con la alta concentración de CO₂ y formará ácido carbónico, que provocará aún más corrosión.



NOTA DE APLICACIÓN



MCO-170AICUV-PE

- Para asegurar la repetibilidad, las estufas de incubación deben proporcionar un ambiente estéril a través de métodos de control de la contaminación que garanticen la protección contra los microorganismos introducidos durante la apertura de la puerta.

Los sistemas de incubación que crean estas condiciones de funcionamiento, junto con otros aspectos que se deben tener en cuenta, requieren un mantenimiento periódico para reducir al mínimo la contaminación y garantizar que se empleen prácticas recomendadas de laboratorio en la ecuación del cultivo celular.

Tipos de contaminación de los cultivos celulares

La contaminación de un cultivo celular *in vitro* suele deberse a la introducción involuntaria de uno o más microorganismos que pueden dañar o destruir el cultivo celular en curso. Estos microorganismos pueden ser los siguientes:

- Bacterias (incluidas las bacterias termófilas) y micoplasma
- Mohos y levaduras
- Virus

Otros contaminantes pueden ser el polvo, compuestos orgánicos volátiles de los instrumentos o los procesos adyacentes, contaminantes que pueden generar contaminación cruzada de otros cultivos en un ambiente de estufa compartida y partículas que se encuentran en el ambiente natural. Independientemente del contaminante o su causa, el empleo de técnicas de laboratorio prudentes puede ayudar a evitar la reaparición de dicha contaminación.

La burbuja que crea la estufa de incubación

A diferencia de los sistemas cerrados, como los sustratos de fibra hueca, los biorreactores de tanque agitado o de agitación por aire, la estufa de incubación de cultivo celular habitual es una cámara acondicionada con una puerta que se cierra contra una junta blanda. Al cerrarse la puerta, la estufa crea un ambiente ideal para el proceso del cultivo celular basado en los parámetros definidos por el usuario respecto a los puntos de control relativos a la temperatura, el CO₂ y el O₂. La humidificación se produce mediante una evaporación natural del agua del recipiente humidificador y la presión de vapor positiva es suficiente para poner fin a la deshidratación, en especial en microplacas con volúmenes pequeños de medios. Algunas estufas de incubación de cultivo celular utilizan calentadores de inmersión para complementar el proceso de humidificación natural.

Sin embargo, cuando se abre la puerta de la estufa, se pierde la burbuja de acondicionamiento. Acceder al material de laboratorio de cultivo celular para transportarlo a una cabina de seguridad biológica (CSB) o para realizar otros procesos es una parte normal del flujo de trabajo del laboratorio. Al abrir la puerta, se exponen las paredes internas de la estufa, los estantes, el recipiente de agua humidificador y los recipientes de los cultivos a condiciones ambientales con las que se puede producir contaminación por mohos, levaduras, hongos u otros microorganismos como micoplasmas o virus. En un sentido práctico, a menos que se instale la estufa en una sala blanca, esta exposición no puede evitarse. El empleo de técnicas adecuadas puede reducir esta posibilidad. El primer aspecto que debe tenerse en cuenta para entender los sistemas de incubación básicos es que estos pueden albergar contaminación.

Requisitos previos relativos al diseño de la estufa de incubación

El primer paso a la hora de gestionar el problema de la contaminación de los cultivos celulares es tener en cuenta el diseño de la estufa de incubación y, concretamente, el interior. Todos los componentes del interior expuestos a la atmósfera de humedad alta deben estar hechos de acero inoxidable de gran calidad y deberán poderse retirar fácilmente (preferiblemente sin herramientas) para proceder a su limpieza manual o esterilización en autoclave. Estos componentes son los estantes, los soportes de los estantes, las cámaras impelentes, los suelos, los recipientes humidificadores, las ruedas del ventilador, las carcasas de los sensores, las juntas de la puerta interna y cualquier otro elemento presente en la cámara durante el cultivo celular. Las sondas de control suelen estar protegidas con carcasas de acero inoxidable. Deben limpiarse según las instrucciones de los fabricantes.

Los componentes fabricados con acero inoxidable enriquecido en cobre o complementado con cobre tienen propiedades germicidas inherentes de resistencia a los microorganismos transportados por el aire introducidos en la cámara durante la apertura de la puerta. Dichos materiales se consideran elementos de control de la contaminación

“pasivos”, puesto que los microorganismos son incapaces de mantener el crecimiento en estas superficies.

Instalación, ubicación y espacios

Hay muchos factores que deben tenerse en cuenta a la hora de determinar la ubicación permanente de la estufa de incubación de cultivo celular. Es conveniente ubicar la unidad en un lugar donde pase poca gente y donde la perturbación del aire tenga escasa trascendencia. Esto reduce la volatilidad del aire exterior que entra en la estufa durante la apertura de la puerta.

Evite instalar la estufa cerca de ventanas, aires acondicionados, sistemas de climatización de techo o suelo y tomas de aire de retorno, ya que son fuentes de contaminación del aire.

Es importante tener en cuenta la función de la CSB al planificar la mitigación de la contaminación de la estufa. Si es factible, ubique la estufa lo más cerca posible de la CSB. Esto limitará la exposición cuando se retiren o se vuelvan a colocar los cultivos celulares para proceder a su procesamiento. El uso inadecuado de la CSB, la altura incorrecta del marco, la obstrucción de las ranuras de aire descendente y el uso de instrumentos o equipos en la superficie de trabajo de la CSB pueden crear vías para que los contaminantes se adhieran al material de laboratorio de cultivo celular cuando se trabaja en la campana. Estos contaminantes vuelven luego a la estufa, donde pueden trasladarse a otros cultivos mediante contaminación cruzada o a las superficies internas expuestas a la atmósfera acondicionada ideal para el crecimiento celular.

A pesar de que las CSB cuentan con filtros HEPA diseñados para atrapar partículas de 0,3 micras (0,12 micras en el caso de los filtros ULPA), los virus de menor tamaño pueden pasar con facilidad a través de estas barreras. Aunque el laboratorio de cultivo celular suele estar bajo presión positiva, la presión puede convertirse en presión neutra o incluso negativa cuando se utiliza una CSB, especialmente cuando dicha CSB tiene una transición de escape conectada al filtro de escape o sobre este.

Otros equipos de laboratorio, como las centrifugadoras, los agitadores y los mezcladores o los lectores de placas robóticas, pueden empeorar el aire del ambiente que, de no estar presentes dichos equipos, estaría en calma, ya que se crean aerosoles que se transportan fácilmente por el aire.

Debido a que algunos componentes deben extraerse de la estufa para proceder a una limpieza completa, es importante establecer espacios libres al lado y detrás de esta. Este espacio es necesario para facilitar el acceso a los tubos de suministro de gas, los filtros de los tubos, los puertos de entrada de gas, los puertos de paso y los tapones ciegos y cualquier componente del interior, como motores de ventiladores, ventiladores o sensores que deban retirarse para proceder a su mantenimiento.

La mayor parte de los cilindros de CO₂, por ejemplo, contienen un suministro de CO₂ de calidad industrial en forma líquida en los que el gas de CO₂ se evapora y se mueve a través del regulador de presión de dos etapas como un gas. Sale del regulador a una presión de unos 20 PSIG, suficiente para impedir la introducción de contaminantes en el sistema de gas. No obstante, el CO₂ por sí mismo suele contener partículas microscópicas que pueden proporcionar superficies para los contaminantes. Por tanto, se recomienda que los tubos de suministro

de CO₂ definitivos cuenten con un filtro de 0,3 micras antes de que este pase a las válvulas de control solenoides de la estufa. Un tramo de tubo relativamente grande de calidad para laboratorio (p. ej., Tygon®) que va desde el regulador hasta la entrada de la estufa proporciona un método fácil y no invasivo para retirar el tubo de la parte de atrás de esta a fin de observar el cartucho del filtro de 0,3 micras y sustituirlo si ha cambiado de color.

Métodos de limpieza y descontaminación

La mayoría de los fabricantes de estufas de incubación recomiendan usar una solución de etanol al 70 % y realizar una limpieza manual antes de la puesta en marcha inicial y después periódicamente. La solución de etanol al 70 % se diluye intencionalmente para que el etanol tenga tiempo de eliminar el contaminante antes de que se evapore dicho etanol.

¿Por qué es mejor el etanol al 70 % que el etanol al 100 % para la inhibición bacteriana? El etanol al 100 % coagula y deshidrata las proteínas tan rápido que se forma una capa de proteínas desnaturalizadas relativamente impermeables en las partes externas de las células bacterianas (dentro y debajo de la pared celular), y esto impide una mayor difusión del alcohol en las células. Así se protege el núcleo de las células frente a la desnaturalización. Con el etanol al 70 %, el proceso es más lento y el alcohol logra difundirse a través de las proteínas desnaturalizadas de las células.

Además de la limpieza manual convencional con etanol al 70 %, la estufa de incubación puede disponer de un ciclo de esterilización, como un sistema de temperatura elevada (180 °C) o un sistema de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) vaporizado. El ciclo debe efectuarse antes del primer uso.

Si deben cumplirse criterios de puesta en servicio y prácticas recomendadas de fabricación, todos los esfuerzos de control de la contaminación deben cumplir con las prácticas óptimas y el protocolo de las instalaciones previamente aprobados.

Superficie de los instrumentos y los equipos

Ciertos aparatos de cultivo celular, como los agitadores orbitales o recíprocos, los balancines, los rodillos de frascos para células, los agitadores magnéticos y otros dispositivos, se utilizan frecuentemente en las estufas de incubación de cultivo celular. Estos aparatos no deben tener ningún contaminante antes de colocarlos en la estufa. Si es posible efectuarlo, un proceso de descontaminación de H₂O₂ proporciona una descontaminación completa de las superficies expuestas. En algunos casos, los instrumentos pueden colocarse en la cámara de la estufa durante el proceso de H₂O₂ antes de que esta entre en servicio y se introduzcan los cultivos celulares.

Los recipientes de cultivo celular suelen ser frascos con tapas de ventilación o sin ella, placas de Petri, frascos rotativos y placas con varios pocillos. Por lo general, se envasan previamente y se esterilizan por radiación gamma antes de proceder a su envío. Solo deben abrirse en una CSB para preservar la integridad de la esterilización.

Los artículos de laboratorio que vuelven de una sala central de esterilización deben considerarse una fuente de contaminación si se exponen al aire ambiente durante el traslado del carro y el almacenamiento en los estantes.

Resumen de las fuentes de contaminación

Los puntos de contaminación que se mencionan a continuación deben incluirse en un programa periódico de limpieza *in situ* o bien de retirada y limpieza manual o mediante autoclave.

Interior de la estufa de incubación

- Paredes
- Techo
- Suelo
- Esquinas de la cámara
- Conductos y cámaras impelentes
- Recipiente humidificador
- Carcasa de la lámpara UV (si está equipada)
- Sonda de control de temperatura y carcasa de la sonda
- Cable de la sonda hasta el panel de control

Cabina de la estufa de incubación

- Superficies de las lengüetas y las juntas de la puerta interna
- Cierre de la puerta interna
- Vidrio de la puerta interna
- Bisagras y cierres de la puerta interna
- Puntos fríos donde puede acumularse la condensación debido a un aislamiento insuficiente de la cabina

Sistema de gas

- Sensor de CO₂ u O₂
- Carcasa del sensor y conectores
- Tubos de inyección que van desde las válvulas de control solenoides
- Bomba de aire
- Filtros y carcasas
- Rueda del ventilador, eje y sello

Depósito de humedad

- Recipiente humidificador

Prácticas óptimas y técnica de laboratorio recomendada

El método más obvio para lograr un funcionamiento sin contaminación de la estufa es mantenerla limpia. Mediante una combinación de procesos de limpieza manual y descontaminación automática (si se dispone de ella) gestionados en un programa periódico se contribuye a proteger los cultivos *in situ* y a reducir al mínimo la pérdida de trabajo debido a la contaminación y el tiempo de inactividad.

El mantenimiento predictivo es análogo al mantenimiento preventivo, en el que los procesos de limpieza pueden documentarse para proceder a su estandarización y cumplimiento, programarse con antelación y asignarse al personal de laboratorio según las necesidades.

No existe nada que pueda sustituir al empleo de una técnica aséptica cuando se manipulan los cultivos celulares. Tanto la higiene personal como la del laboratorio son esenciales para un programa holístico de gestión de la contaminación.

DESCONTAMINACIÓN ACTIVA FRENTE A PASIVA

El usuario debe encargarse de poner en marcha la descontaminación activa, ya sea mediante limpieza manual, esterilización a temperatura elevada, H₂O₂ vaporizado u otro método. Los atributos de diseño inherentes a una estufa de incubación de cultivo celular adecuadamente diseñada ofrecen una capa adicional de protección, pues trabajan en segundo plano para inhibir y destruir los contaminantes a medida que se producen.

Descontaminación activa

- Temperatura elevada. En un proceso de descontaminación a temperatura elevada se tienen en cuenta el tiempo y la temperatura; para seguir un método demostrado de descontaminación, se mantiene la temperatura normalmente entre los 160 °C y los 170 °C durante un periodo de dos horas. La marca PHCbi, un sistema de descontaminación térmica nuevo, utiliza una temperatura aún más alta. Es el método de descontaminación activa más rápido y efectivo en una estufa de incubación de cultivo celular que alcanza los 180 °C durante dos horas antes de volver a la temperatura ambiente. Para reducir al mínimo el tiempo de inactividad, el tiempo total del ciclo es inferior a 12 horas. Este proceso de eficiencia energética no requiere extraer el sensor de CO₂ ni la luz UV de la estufa de incubación de la marca PHCbi.
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) vaporizado. Las estufas de incubación de la marca PHCbi permiten emplear descontaminación mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂) vaporizado con total seguridad y sin impacto en el ambiente circundante. El peróxido de hidrógeno tiene una forma acuosa inicialmente y se convierte en vapor mediante un nebulizador; dicho nebulizador expone todas las superficies interiores al H₂O₂ vaporizado, que finalmente vuelve a convertirse en agua benigna a menos de 1 ppm cuando se cataliza mediante una lámpara UV.

Descontaminación pasiva

- El acero inoxidable enriquecido en cobre (comercializado como inCu-saFe® bajo la marca PHCbi) es una aleación de acero inoxidable y de cobre que constituye una barrera germicida para impedir el crecimiento de microorganismos en las superficies. Todas las superficies internas, los estantes y los soportes constan de este compuesto inCu-saFe. Este material es un híbrido del acero inoxidable de tipo 304. Es 100 % resistente a la corrosión y no se corroe ni cambia de color como las superficies de cobre C100 convencionales.
- La luz ultravioleta (comercializada como UV SafeCell™ bajo la marca PHCbi) consiste en una lámpara UV oculta que crea una exposición en serie de 257,3 nm de longitud de onda suficiente para destruir el ADN de cualquier microorganismo que pase a través del sistema de flujo de aire, así como los contaminantes del agua superficial del recipiente humidificador extraíble. La lámpara UV se enciende automáticamente tras un acontecimiento de apertura/cierre de la puerta. UV SafeCell inhibe el crecimiento de micoplasma, bacterias, mohos, esporas, virus, levaduras y hongos sin costosos purificadores de aire con filtros HEPA que acumulen contaminantes en el medio filtrante.
- Además, la lámpara UV puede programarse para efectuar un ciclo temporizado de encendido durante el 100 % del tiempo a fin de realizar un proceso de descontaminación complementario de la cámara cuando se extraen todos los componentes del interior.

CONCLUSIÓN

La gestión de la contaminación en la estufa de incubación de cultivo celular empieza con un buen diseño de la estufa. Los materiales, los métodos de control de temperatura y gas, la orientación de los componentes del interior y el empleo de una buena técnica de laboratorio son esenciales para reducir al mínimo el riesgo de contaminación y contaminación cruzada en el entorno del cultivo celular. La programación periódica de la limpieza y el mantenimiento contribuye a reducir los tiempos de inactividad y la pérdida de trabajo *in situ*.

PHCbi

PHC Europe B.V.
Nijverheidsweg 120 | 4879 AZ Etten-Leur | Países Bajos
Tel.: +31 (0) 76 543 3839 | Fax: +31 (0) 76 541 3732
biomedical.nl@eu.phchd.com
www.phchd.com/eu/biomedical