

VÆRD AT VIDE OM CO₂-INKUBATOR

axeb
LAB SOLUTIONS

lifetime care



Fakta om inkubatorer

En inkubator skal opfylde celledyrkerens behov for præcist at kunne styre temperatur, luftfugtighed og CO₂-koncentration. Er der desuden oprettet en dekontaminationsproces, er de fleste grundlæggende forudsætninger for en vellykket celledyrkning til stede.

Regulering og opretholdelse af temperatur

Normalt er +37 °C den optimale temperatur for cellevækst. For at skabe konstante dyrkningsforhold er det vigtigt at kunne regulere temperaturen og holde den stabil.

Ustabile temperaturer kan medføre, at cellerne vokser dårligere eller i værste fald dræbes, hvis de eksempelvis udsættes for et varmekok. Temperaturen påvirker flygtigheden af ilt og kuldioxid, og derfor kan den samlede effekt af temperaturforandringer blive omfattende, selv ved små afvigelser i grader.

Regulering og opretholdelse af bestemt fugtighed

Det er vigtigt at fastholde en jævn og høj luftfugtighed, idet eventuelle afvigelser indirekte kan påvirke CO₂-reguleringen. Samtidig kan en ujævn fordeling af luftfugtigheden medføre forskellig fordampning fra niveau til niveau i inkubatoren, og dette kan igen påvirke især dyrkning på plader af små mængder. Dette skyldes, at pladernes udtørring varierer efter deres placering i inkubatoren. For lav luftfugtighed kan føre til meget ændrede dyrkningsvilkår, eftersom koncentrationen af forskellige mediekomponenter ændres i forbindelse med fordampning.

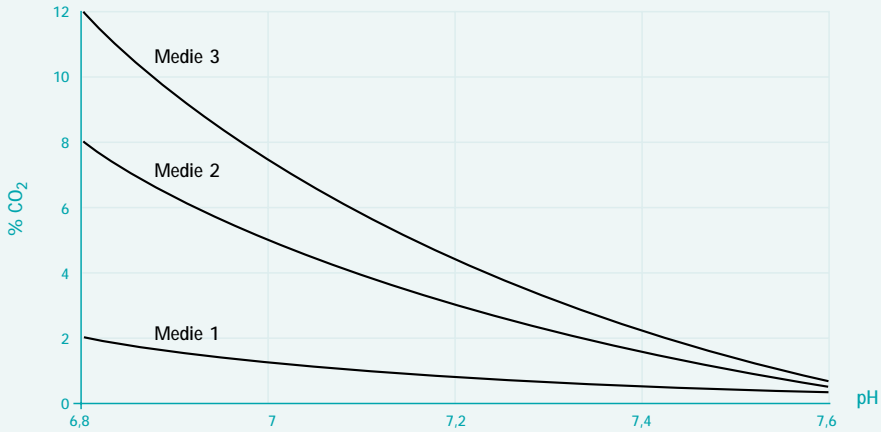
Regulering og fastholdelse af CO₂

Mange celletyper er afhængige af atmosfære indeholdende CO₂ for at kunne vokse optimalt. Der frigøres kuldioxid i dyrkningsmediet, hvilket påvirker pH-værdien i forbindelse med dyrkningen. Et ujævnt niveau kan således påvirke dyrkningsresultatet i forskellig udstrækning, alt efter mediets bufferkapacitet. Indholdet af kuldioxid kan i visse situationer have stor betydning for gendtrykket, og derfor er det vigtigt også at vide noget om de absolutte CO₂-niveauer.

Desinfektionsrutiner

Hvis de vækstfremmende parametre CO₂, temperatur og fugtighed har de rigtige værdier, vil der observeres en god vækst af celler, dvs. både ønskede og ikke-ønskede celler. Den primære årsag til, at også de ikke-ønskede mikroorganismer begynder at vokse, skal findes i inkubatorens konstruktion og det miljø, inkubatoren står placeret i. En grundlæggende metode til at fjerne de ikke-

Forhold mellem CO₂-koncentration og pH-værdi



ønskede mikroorganismer er sterilisation eller desinfektion af inkubatorens indre overflader. Sterilisation har til formål at eliminere alle typer mikrobe antigener, det være sig enten kemisk eller fysisk. Det fremgår af litteraturen, at tørsterilisation foretages ved 180°C under forudsætning af, at atmosfæretrykket er normalt, og at processen fortsætter i mindst en halv time. For at udjævne temperaturforskelle skal der være installeret en ventilator til cirkulation af luften. Desinfektion, derimod, skal reducere antallet af mikroorganismer. Formålet er at sterilisere/dekontaminere alle overflader, herunder også hylde og sensorer. Dekontaminationsprocessen skal være reproducerbar, og derfor kan det bestemt anbefales at oprette automatiske cyklusser, så der ikke er behov for overvågning. På denne måde kan processen køre om natten, hvorved der spares arbejdstid.

Værd at undersøge:

- Hvordan er varmesystemet konstrueret? Er temperaturen jævn? Sker der hurtig genetablering?
- Hvordan er befugtningssystemet opbygget? Er der jævn rH% i kammeret og hurtig genetablering?
- Hvordan fungerer målingen af CO₂/O₂? Hvor høj er gasforbruget? Er koncentrationen jævn?
- Hvordan er genetableringen?

Tekniske løsninger, der skal sikre høj og korrekt fugtighed...

Eksternt vandreservoir

Vandreservoirer placeres uden for kammeret for at eliminere en kilde til kontamination inde i selve inkubatoren. Befugtningsystemet udgør dog en kilde til mikrobevækst, selv om det er placeret uden for dyrkningskammeret. Det er derfor afgørende, at der sker en form for sterilisation af vandet, inden det føres til kammeret. Alle kontaminanter skal elimineres, og herefter kan den sterile vanddamp føres ind i kammeret. Opstår der kondensation i kammeret, skal kondensatet gennem en separat ledning føres tilbage til eksempelvis opvarmingskammeret. Dette spildevand bør steriliseres igen, inden det slippes ud i miljøet. Vandreservoirer skal indeholde tilstrækkelige mængder vand til, at inkubatoren kan fungere ved normal brug i 2-3 uger. Som en praktisk foranstaltning kan det nævnes, at kontrol af vandniveau og vandets status skal kunne foregå udefra. Der bør være etableret en vandniveaualarm.

Den relative fugtighed måles ved hjælp af en fugtighedssensor. Hvis den aktuelle værdi falder under den indstillede værdi, aktiveres systemet til at blæse damp ind i kammeret og hermed genetablere den indstillede værdi.

Internt vandreservoir

Der findes to grundlæggende systemer: Udnyttelse af hele bunden som vandreservoir og separat beholder/kar med vand. Genetableringen af fugtværdien er op til 10 ggr hurtigere i inkubatorer, hvor hele bunden udnyttes, i sammenligning med inkubatorer, der er udstyret med kar i bunden. Hvis inkubatoren ikke har et kar, overføres varmen direkte til vandet. Dermed fjernes risikoen for, at der samles vand under karret, og en kilde til kontamination reduceres.

Fugtigheden reguleres ikke aktivt, men følger inkubatorens temperatur. Luften mættes med fugt. Hvad enten hele bunden udnyttes, eller der er monteret et kar, ses en mulig kontamination let som "striber på vandoverfladen".

I begge tilfælde kræves en decideret kondensudskiller, den fugtige luft kan kondenseres igennem. En sådan indsats er nødvendig for at undgå, at den fugtmættede luft kondenserer på mindre hensigtsmæssige steder. Kondensudskilleren skal være placeret lige oven for vandreservoirer. Som en praktisk foranstaltning kan nævnes, at udskilleren skal være udformet på en sådan måde, at den ikke i sig selv tiltrækker kontamination.

Værd at undersøge om vandreservoirer:

- Hvad er den bedste løsning for afdelingen? – Her er det endelige valg ofte et spørgsmål om smag og holdning. Undersøg, hvor hurtigt der sker genetablering, efter at døren har været åben. Er der også alarm for for lavt vandniveau?

Hvis uheldet er ude ...

Inkubatorer er udformet sådan, at de skaber optimale vilkår for vækst, og derfor kan der også forekomme vækst af ikke-ønskede celler, som kommer fra det eksterne miljø.

I en undersøgelse gennemført af Mykologisk afdeling ved det svenske Statens bakteriologiska laboratorium redegjorde Holmberg i 1985 for, hvilke temperaturer der er optimale for vækst af bestemte svampe.

Aspergillus fumigatus har optimale vækstbetingelser ved netop +37 °C.

Hvis inkubatoren således bliver kontamineret med denne svampeart, kan det være svært at eliminere den igen, fordi den mest normale temperatur for celledyrkning netop er +37 °C.

Holmberg har endvidere fastslået, at *Aspergillus* spp i bygninger, der er angrebet af skimmelsvamp, har en prævalens på 58%, mens der i bygninger, der ikke er angrebet af skimmelsvamp, er en prævalens på 35%. Dette lader antyde, at forekomsten af kontamination højst sandsynligt vil føre til yderligere kontaminationer, hvis man ikke ændrer vilkårene i det omgivende miljø.

Regelmæssig rutinerengøring forebygger på en enkel måde kontamination:

- Vær grundig med personlig hygiejne.
- Skift jævnligt vand i vandreservoirer.
- Mekanisk rengøring med ren børste og Barrycidal®36.
- Gennemkør regelmæssigt den automatiske desinfektionsproces.
- Benyt kun steril vand.

Barrycidal®36

Et kvartenært ammoniumssalt, som leveres klart til brug. Virkningsmekanismen er formentlig, at kvælstofforbindelsen optages i mikroorganismens membran, og at organismen herefter tilføres lys (sprækker). 1%-opløsningen har en dokumenteret virkning på svamp, bakterier og virus. Opløsningen har samtidig en dokumenteret skånsom virkning på de rustfrie indre kamre i inkubatorer.

Tekniske løsninger, der skal eliminere mikrober...

Her følger i resume en undersøgelse, der er udført af et uafhængigt laboratorium: L+S AG, Bad Bocklet, Tyskland.

Indledning

Formålet med undersøgelsen var at fastslå, om der er forskel i effekten, når mikroorganismer dræbes ved forskellige temperaturer. To inkubatorer af mærket henholdsvis HERACell® og BBD 6220 blev kontamineret. Kontaminationspunkterne var placeret på alle vægge og døre.

Sterilisationsmetode	Tør varme / BBD 6220		Dampvarme / Heracell		
Sterilisationstemperatur	+180 °C	+90 °C	+90 °C		
Effekt efter	3 tim	15 tim	4,5 tim	9 tim	15 tim
<i>Bacillus subtilis</i> , susp.	elimination	reduktion	reduktion	elimination	elimination
<i>Bacillus stearothermophilus</i> , susp.	elimination	reduktion	reduktion	elimination	elimination
<i>Enterococcus faecalis</i>	elimination	reduktion		elimination	elimination
<i>Escherichia coli</i>	elimination	reduktion		elimination	elimination
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	elimination	reduktion		elimination	elimination
<i>Staphylococcus epidermis</i>	elimination	reduktion		elimination	elimination
<i>Corynebacterium xerosis</i>	elimination	elimination		elimination	elimination
<i>Aspergillus niger</i> , susp.	elimination	reduktion		elimination	elimination

Konklusion

Der blev benyttet to forskellige metoder til dekontamination af kontaminerede inkubatorer. Resultatet er følgende: Effekten af +90 °C dampsterilisation i 9 timer er lige så effektiv som ved +180 °C tørvarme i 3 timer. En temperatur på +90 °C uden fugt eliminerer derimod ikke mikroorganismer på trods af 15 timer ved denne temperatur.

Tekniske løsninger til måling af CO₂-indhold...

Målesensoren TC (Thermal Conductivity) benytter den omgivende luft som referencegas. Autozero-systemet er en automatisk kontrol, som kompenserer for drift med CO₂. Med dette system sikres det, at CO₂-niveauerne er langtidsstabile, og samtidig stabiliseres mediets pH-værdi. Resultatet er optimale dyrkningsvilkår. TC-systemet er installeret i mere end 10.000 inkubatorer. Systemet er baseret på måling af to opvarmede termoresistorer. Den ene måleenhed er placeret eksternt, mens den anden er monteret i dyrkningskammeret. Hermed opstår en potentialeforskel, som benyttes til at beregne en displayværdi. Processen igangsættes, så snart der er opnået en stabil værdi. Herefter foretager Autozero CO₂-målecellen kalibrering hver 6. time eller alternativt 6 timer efter, at døren er blevet lukket. Autozero står på i 7-10 minutter. Der er forskel på Autozero-funktionen hos forskellige inkubatorer. Et relativt nyt design kan således foretage elimination for eventuel påvirkning fra luftfugtigheden i omgivelserne. TC reagerer på termisk varmeledningsevne. Det betyder, at systemet reagerer forskelligt alt efter ledningsevnen hos de enkelte gasser. Herefter eliminerer en indbygget software effekten af denne forskel.

CO₂-niveauer kan også måles ved hjælp af IR-sensorer. IR-sensorer er selektive, og gasser, hvis molekyler består af to eller flere atomer, absorberer infrarød stråling på en helt specifik måde, som kan detekteres ved hjælp af IR-teknik. Teknikken er baseret på en lyskilde og en detektor. Intensiteten af to specifikke bølgelængder måles, idet den ene ligger inden for og den anden uden for absorptionsbølgelængde. Hvis der findes en gas mellem lyskilde og detektor, vil det lysniveau, der når frem til detektor, blive reduceret. Koncentrationen er resultatet af den relative forskel mellem de to bølgelængder.

Sammenligning mellem TC- og IR-målesensorer til CO

Konventionel TC-sensor	Konventionel IR-sensor
Robust, ingen bevægelige dele	Bevægelige dele
Kan dekontamineres	Tåler kun sjældent høje temperaturer
Kan udskiftes ved feltservice	Følsom over for temperatursvingninger
Påvirkes af barometertryk	Påvirkes af høj fugtighed

Bemærk:

Det er uden betydning for cellerne, hvilket princip der anvendes

Sammenfatning, teori og praksis:

- Hvis der er oprettet et desinfektionsprogram, skal alle detaljer om udstyr være tilgængelige under dekontaminationsprocessen. Tiderne skal tage højde for både våd- og tørsterilisation.
- Er der kun få dele, reducerer det den overflade, der kan kontamineres. Det er vigtigt, at interiøret er minimalistisk. (Eventuel forskel i overfladen hos inkubatorer, som ellers har samme volumen, kan være lige så stor som et badelagen, hvis man fordeler det ud over en jævn overflade.)
- Det er vigtigt at sondre mellem en koldvalset plade og en elektrolyseret rustfri ståloverflade. Den elektrolyserede rustfrie ståloverflade har ingen fordybninger, hvor kontaminanter kan sætte sig. Porerne er mindre end 0,2µm. Hylderne skal kunne demonteres uden værktøj og uden, at hele udstyret kollapser.
- Opsamling af vand fra kondensationssteder foregå helt separat og må ikke indebære en risiko for, at der opstår yderligere kontaminationspunkter. Et evt. løstsiddende kar i bunden af kammeret kan udgøre en kilde til kontamination, og desuden sker genetableringen af rH langsommere her, fordi vandoverfladen er mindre.
- Opdelte inderdøre skal være tilpas store til, at prøver let kan tages ind og ud. Det skal være enkelt at holde dørene rene, og de skal indgå i dekontaminationscyklussen. Det skal være muligt at nå de øverste hyldeniveauer, og de skal være indrettet på en sådan måde, at de ikke kan tippe.
- De stativer, der benyttes til inkubatorerne, skal være udformet på en sådan måde, at en søjle med to inkubatorer ikke bliver for høj.

AXEB LAB SOLUTIONS A/S

Filmbyen 24
2650 Hvidovre

T: 4362 4647

WWW.AXEB.DK

INFO@AXEB.DK