

Análisis de Desempeño para la cámara de congelación controlada de muestras criogénicas

Greivin Fallas, Bernal Cortes

Proyecto Epidemiológico Guanacaste, Fundación INCIENSA, Liberia, Guanacaste, 2006

RESUMEN

Los bancos de muestras o repositorios están diseñados para cumplir la función de almacenaje, supervisión y control de material biológico, bajo condiciones de temperatura ideales, que garanticen la calidad de las muestras. La técnica de preservar muestras a temperaturas criogénicas, conlleva al uso de equipo especializado que cumpla las normas en las buenas prácticas para este tipo de preservación, establecidas por los repositorios. Entre este tipo de equipo tenemos los congeladores MVE 1830HE, cámaras de congelación para diferentes tipos de material biológico, utilizando para este propósito nitrógeno líquido (LN_2), el cual permite alcanzar temperaturas de hasta -190°C , en este sentido, es importante supervisar y controlar las temperaturas dentro del congelador, con el objetivo de evitar que se produzcan desviaciones en las temperaturas, que comprometan la calidad del material preservado. Se diseña este estudio, con el propósito de realizar un análisis en dos partes: en la primera parte, establecer la relación que existe entre el nivel de LN_2 en el congelador y la temperatura, por medio de las lecturas almacenadas en el dispositivo electrónico TEC 2000, en un periodo aproximado de dos meses. La segunda parte, consiste en un experimento para evaluar el comportamiento del congelador cuando se mantiene la tapa abierta, las medidas se agruparon en dos grupos, flujo+ y flujo - de LN_2 , con respecto a la temperatura alta (TA) y baja (TB) del sensor. El análisis estadístico se basa en graficar, en el primer análisis, la relación nivel de LN_2 versus temperatura, mientras que para el segundo, se realiza un análisis de varianza. De esta manera se concluye que el desempeño del congelador, en cuanto a, temperaturas óptimas, esta por encima de las nueve pulgadas; y que el congelador muestra mas estabilidad de temperatura cuando se mantienen la tapa abierta con un mínimo flujo de LN_2 .

Palabras clave: congelador MVE 1830HE, muestras criogénicas, temperatura, nivel LN_2 , análisis de varianza.

INTRODUCCION

Los repositorios o bancos de muestras biológicas son instituciones encargadas de recibir, almacenar, distribuir y procesar muestras biológicas bajo las condiciones que garanticen la buena calidad de las muestras. Los

repositorios modernos realizan operaciones muy complejas y dedican una gran cantidad de su trabajo al almacenamiento, control de calidad y localización de muestras en el inventario.

Un método de preservación y transporte de muestras biológicas consiste en mantener las muestras a temperatura criogénicas donde la actividad física y bioquímica de la matriz es despreciable. Esto asegura que la muestra puede mantener su calidad por periodos de tiempo indefinidos. Para este fin, es común usar congeladores tipo dewar que trabajen con nitrógeno líquido.

Las buenas prácticas para los Repositorios, establecen como parte de sus normas la supervisión y control de los congeladores y refrigeradores usados para el almacenamiento de muchos tipos de muestras biológicas por periodos de tiempo indefinido. Los congeladores MVE 1830, son recipientes tipo dewar que funcionan con LN_2 , están diseñados para inhibir la carga de calor excesiva transitoria introducida en el compartimiento por la conducción, la convección y la radiación. Esto se logra por la transferencia (intercambio) de la energía de la fuente de calor a los componentes fríos del acero inoxidable del compartimiento del congelador, el vapor de N_2 y el depósito de LN_2 en el fondo del congelador (Madden, 2005). Esta transferencia de calor se traduce en un incremento en la tasa de ebullición del líquido en el interior del congelador y mas importante, un incremento momentáneo de la temperatura dentro de la cámara del congelador y de su contenido.

La tasa de transferencia de calor aumenta cuando la puerta del congelador permanece abierta durante la sesión de trabajo con el congelador, la transferencia de calor se da

principalmente cuando se realizan maniobras de abrir y cerrar la tapa de metal, para la introducción o sacado de especímenes ya sea a temperatura ambiente o a temperaturas criogénicas respectivamente.

Como buena practica, la operación o desempeño de los congeladores debe ser registrada mediante métodos manuales y electrónicos. Las variables de control son temperatura y nivel de nitrógeno. Los congeladores 1830 usan un dispositivo de monitoreo y control a tiempo real de estos parámetros llamado TEC 2000 (termal enviroment controler),

EL dispositivo TEC2000, proporciona un monitoreo constante del nivel de LN_2 en el compartimiento, así como, las temperaturas en la parte superior e inferior de éste, esta función se lleva a cabo por medio de un sensor, el controlador permite a su vez almacenar los datos los cuales posteriormente se obtienen mediante un programa computacional (Users Manual XLC TEC 2000).

Las cámaras de congelación para muestras biológicas, han sido utilizadas para investigaciones en el campo de manejo y optimización de temperaturas idóneas para la conservación de diferentes tipos de material biológico. El objetivo principal, entonces, es la calidad en los especímenes por periodos de tiempo indefinido, debido a que éstos son muy susceptibles a los cambios de temperatura, razón por la cual se pueden ver afectadas en su estructura y calidad.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en uno de los congeladores disponibles por el Repositorio de Liberia, Guanacaste, modelo MVE 1830HE. el experimento se llevo a cabo en dos partes: (1) análisis de la relación; temperatura vs nivel de nitrógeno líquido en el interior del congelador y (2) evaluación del comportamiento de las temperaturas del congelador, cuando se mantiene la tapa abierta por periodos ante la presencia o ausencia de un flujo de LN₂ bajo en la alimentación.

Para el primer análisis se obtuvieron los datos de temperaturas y nivel de líquido en el congelador, almacenados en el TEC2000 del último mes y medio de operación. El segundo análisis, consistió en un experimento para caracterizar el comportamiento del congelador y establecer la mejor técnica de trabajo cuando se mantiene con la tapa abierta. Se analizó el efecto de la variable flujo de alimentación en la temperatura 30min después de cerrar la tapa. La variable podía tener dos valores, abierto y cerrado. Se mantuvo la tapa abierta por lapsos de tiempo de 30 minutos seguidos por 4 horas en las que se dio oportunidad al sistema de retornar al equilibrio. Después de este ciclo se repitió la operación. Esto se repitió por seis días. Para cada día se tomaron los siguientes valores:

- la temperatura inicial
- Temperatura final al cerrar la tapa tras 30 minutos

Los valores de la temperatura están dados por la temperatura alta (TA) y baja (TB) del sensor. Las medidas se

agruparon en dos grupos, flujo + y flujo

-

El lapso de 30 minutos simula un tiempo extremo de uso de la tapa abierta y donde existen variaciones de la temperatura importantes de verificar. Ambos parámetros evaluados se llevaron a cabo en semanas diferentes y el tiempo de estabilidad para el sistema se determino antes de realizar las pruebas. El flujo de nitrógeno líquido de alimentación al congelador, es mínimo, para prevenir que se detenga antes de concluir la operación debido al límite de llenado programado, para mantener siempre las mismas condiciones y no meter una interacción debido al cambio de nivel (flujo a un nivel constante), usar la mayor actividad térmica del cambio de fase de la alimentación. El nivel de líquido establecido para todas las pruebas fue $9,2 \pm 0,05$ pulgadas, el nivel permitido por el controlador es de 9,6 pulgadas.

Análisis estadístico:

Primera parte. Se realizó un grafico de correlación lineal de tres temperaturas; TB (temperatura en el fondo del congelador) con respecto a la pérdida o ganancia de LN₂ y la TA (temperatura en la parte superior del congelador) y la media de las dos, con respecto a diferentes niveles de LN₂. Otro gráfico que muestra la comparación del nivel con respecto a la temperatura en el transcurso del tiempo de establecido para el análisis en el congelador, de esta manera, se obtienen expresiones mas reales y sencillas de las diferencias de temperatura contra la diferencia de nivel de LN₂.

Para la segunda parte de este experimento se comparo la variabilidad entre los dos grupos de muestras, el sometido al tratamiento el que tenia el tratamiento ausente.

Se estableció la siguiente hipótesis:

H_0 = existe diferencia de temperatura entre los grupos.

H_1 = no hay diferencia de la temperatura medida 30 minutos después entre los grupos.

Para comprobar la hipótesis, se calcularon los valores de diferencia entre temperatura inicial y final (ΔT) y se aplico la técnica ANOVA (análisis de varianza), para un α de 0.05. Se calcularon los residuos y los valores que se tomaron están por debajo de la

media, menos dos valores de la desviación, garantizando la exactitud en los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las figuras 1 y 2 muestran la relación que existe entre el nivel de LN_2 y la temperatura. La figura 1, muestra el gráfico de dispersión, de la temperatura vs. nivel de LN_2 , se puede observar que existe una clara relación entre las variables, con tendencia esperada: la temperatura baja cuando hay aumento en el nivel de LN_2 , y aumenta cuando el nivel de LN_2 baja. Los valores r^2 , reflejan un grado de correlación directa alto, entre la temperatura y LN_2 .

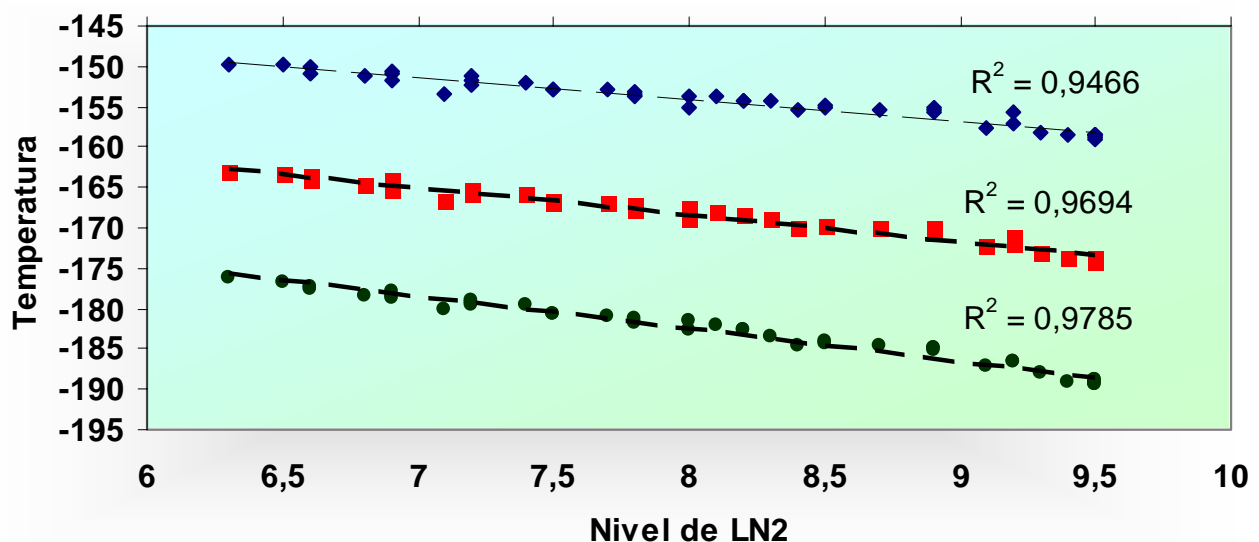


Figura 1: diagrama de dispersión para la temperatura baja, media y alta con respecto a la pérdida o ganancia de LN_2 , valores tomados del controlador TEC2000 entre el 18/04/06 al 01/06/06.

En la figura 2 se hace una comparación entre los valores de temperatura y los diferentes niveles de LN_2 en el transcurso del tiempo. Por ejemplo, se

nota que cuando el congelador deja de alimentarse con LN_2 hay un aumento en la temperatura, pero cuando hay un pequeño aumento del nivel la

temperatura tiende a bajar, vemos que de 9,5 pulgadas bajó a 6,5 pulgadas, la temperatura sube de $-158,5$ a $-149,7$, 8,8 grados de aumento de temperatura. Cuando se aumenta el nivel en 2,4 pulgadas (8,9), la temperatura baja en $-5,7$ grados ($-155,4$). Un reflejo del

comportamiento de las temperaturas en el congelador cuando trabaja con niveles altos y bajos de LN_2 . Se puede apreciar, también, que el nivel óptimo para el congelador es 9+ pulgadas de LN_2 .

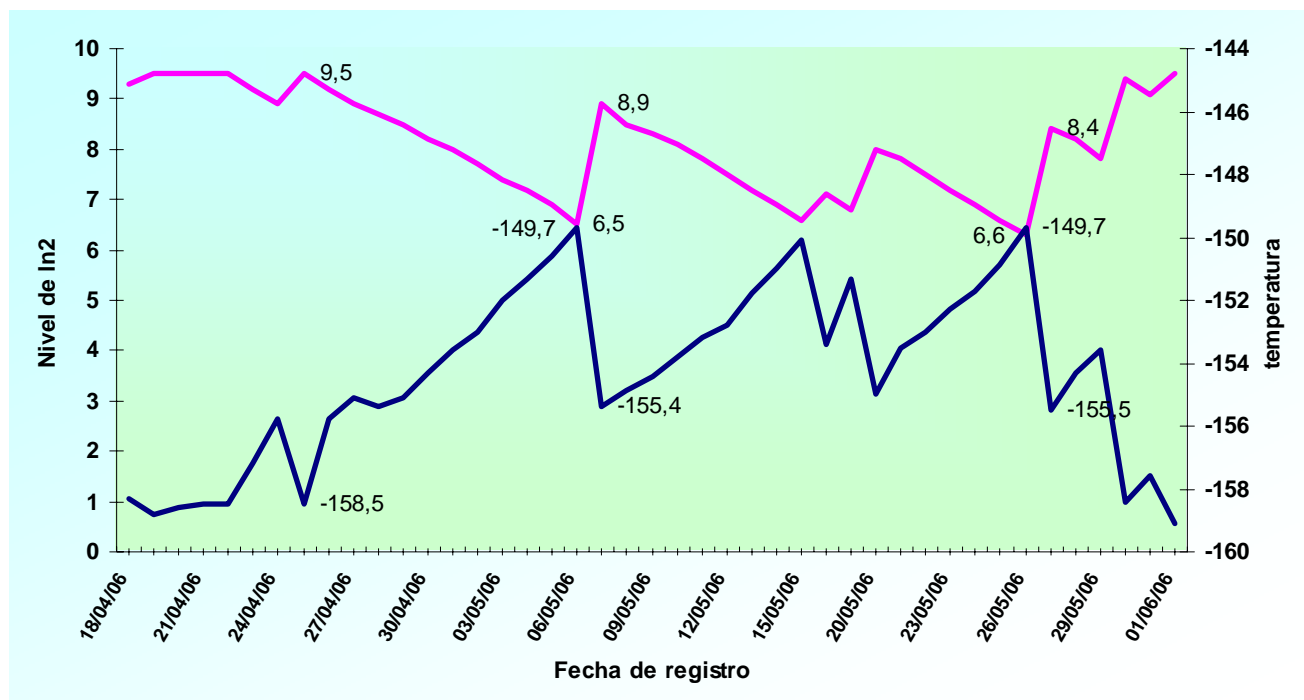


Figura 2: Valores de temperatura alta con respecto a diferentes niveles de LN_2 , valores tomados del controlador TEC2000 comprendidos entre el 18/04/06 al 01/06/06.

Cuando el congelador se deja por varios días sin alimentación de LN_2 puede notarse un aumento en la temperatura, sin embargo la temperatura aun no es critica, pero es un buen estimador de cómo se recarga de calor el sistema cuando va perdiendo nivel de LN_2 .

La figura 3, muestra valores como resultado de las temperaturas finales del experimento para comprobar la

hipótesis de diferencia entre los grupos, los valores están dados por la diferencia entre la temperatura inicial y final en cada subgrupo, los valores positivos representan aumento de temperatura y los negativos disminución de temperatura. La dispersión de los valores, denota los valores extremos a los que el sistema alcanza cuando la tapa esta abierta con y sin flujo de LN_2 .

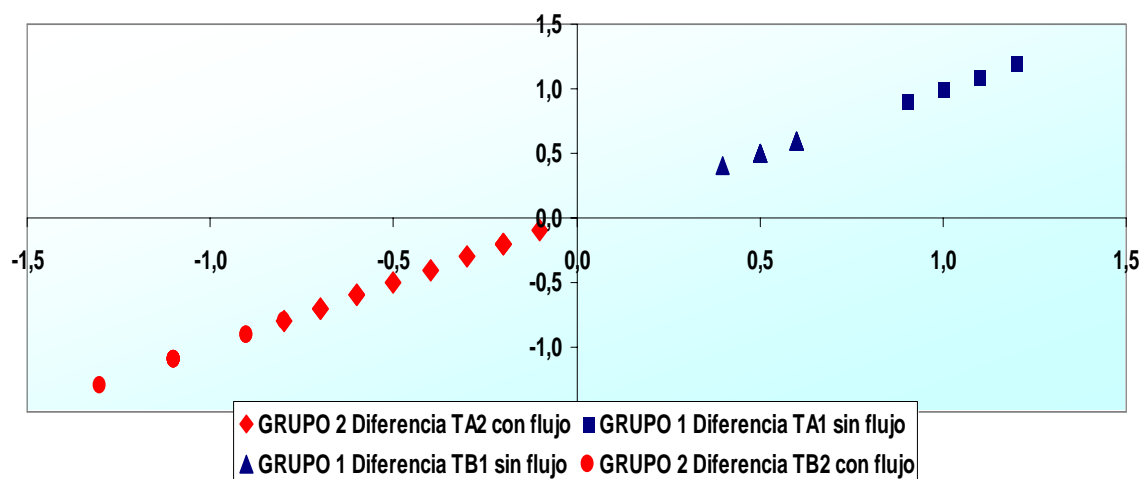


Figura 4: diagrama de dispersión de los valores de diferencia entre temperatura inicial y final de los subgrupos flujo + y flujo -.

Los cuadros 1 y 2 muestran los resultados del análisis de varianza correspondiente, para comparar las diferencias entre los grupos y así

comprobar la hipótesis, el análisis corresponde a los valores de la figura 3 y están dados para la temperatura alta y baja respectivamente.

Cuadro 1: resumen para análisis de varianza entre temperaturas altas

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Diferencia TA1 sin flujo	12	12,7	1,06	0,0099
Diferencia TA2 con flujo	12	-5,3	-0,44	0,0572

ANOVA

Origen de las variaciones	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre Grupos	13,5	1	13,5	402,3	1,256E-15	4,30
Dentro de los grupos	0,74	22	0,034			
Total	14,238	23				

Cuadro 2: resumen para análisis de varianza entre temperaturas bajas

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Diferencia TB1 sin flujo	11	5,8	0,53	0,00418
Diferencia TB2 con flujo	11	-11,6	-1,05	0,01873

ANOVA

Origen de las variaciones	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre grupos	13,8	1	13,8	1201,4	2,46E-19	4,35
Dentro de los grupos	0,23	20	0,011			
Total	14,0	21				

Los valores de F muestran una gran diferencia con respecto al F crítico, con lo que se acepta la hipótesis de que si existen diferencias entre los grupos, determinando que la mejor operación ocurre cuando se tiene la tapa abierta con un flujo mínimo de LN₂. Además la posibilidad de que haya una igualdad de condiciones es muy remota.

CONCLUSIONES

Los resultados de la investigación permiten tomar decisiones, en cuanto a, practicas de trabajo más eficientes y mejorar el desempeño de los congeladores MVE 1830HE. La investigación permite obtener información más precisa del comportamiento de los congeladores en condiciones reales. Además es posible aplicar el resultado para mejorar el tratamiento que se le da a las muestras las cuales son fundamentales en las investigaciones que lleva a cabo El Proyecto Epidemiológico Guanacaste.

Los datos se han presentado de una manera lógica para su entendimiento y para dejar en claro que para un mejor desempeño del congelador MVE 1830HE, se debe tomar en cuenta lo siguiente:

1. Procurar niveles de liquido por encima de 9 pulgadas.
2. Mantener la alimentación durante los periodos en los cuales la tapa del congelador se mantiene abierta, ayuda a prevenir incrementos en la temperatura de la cámara y contribuye a la calidad de las muestras.

3. El cambio de temperatura en el congelador por mantener la tapa abierta persiste tiempo después de cerrar la tapa por lo que la temperatura real durante el lapso en que se tiene la tapa abierta no es un valor confiable. Mantener el congelador con la tapa abierta sin flujo, si bien no representa una alarma inmediata de temperatura, se debe considerar al menos no tenerla abierta por periodos que no sobrepasen los 30 minutos y solo en casos en que no se cuente con alimentación de LN₂
4. Es preciso realizar más estudios en condiciones de estado inestable, al meter o sacar grandes cantidades de materia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Brockbank, Kelvin G. M. Covault, James; and Taylor Michael J. Taylor. Cryopreservation Manual. Thermo Electron Corporation, 2005.

Gómez, M. 2005. Elementos de Estadística Descriptiva. 13^a reimpresión de la 3^a edición. EUNED. San José, Costa Rica. 564 pp.

Gutiérrez, E. 1996. Métodos estadísticos para las ciencias biológicas. EUNA. 178 pp.

Human Biological Materials for Research. CELL PRESERVATION TECHNOLOGY. Volume 3, Number 1, 2005, Mary Ann Liebert, Inc.

ISBER. Best Practices for Repositories
I: Collection, Storage, and Retrieval of
Madden PR. Analysis of LN₂ Freezer
Warming and Recovery a Case Study.
PRINCETON CryoTech, INC.,
Whitehouse, NJ USA. 2004.

J. Bachman, J.Brooks, CHART/MVE
Division 2003, 'Users Manual XLC TEC
2000 (Total environmental Control
System Monitor), 10753946 Rev C
2003.

Steel, R; Torrie, J. 1996. Bioestadística:
Principios y procedimientos. Trad.
Martínez, R.B. Edit. McGraw-Hill,
México. 622 pp.