

FILTRACIÓN DE AIRE. AREAS LIMPIAS, ESTÉRILES. FLUJO LAMINAR. CABINAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA.

Desde el punto de vista de la producción, ya sea de fármacos biológicos o químicos, reactivos de diagnóstico, análisis de laboratorio microbiológico, etc debemos pensar en la consideración de uno de los factores que pueden influir considerablemente en la calidad y el éxito de nuestro trabajo, y en la salud de los operadores: la calidad del aire que se maneja.

El aire en sí es una mezcla de diferentes gases pero que contiene o transporta una serie de materiales extraños, originados en procesos naturales, o en las actividades humanas. De un análisis del aire se revela la presencia de hollín y humo, cuarzo, arcilla, trazas de residuos animales y vegetales, material orgánico en la forma de algodón y fibras de plantas, fragmentos metálicos; aunque también puede contener bacterias, virus, hongos, esporos, polen, etc.

Estas partículas dispersas en el aire o en gases son llamadas comúnmente "aerosoles" con tamaños que oscilan entre 30 y 0,1 μ y cuya composición varía dependiendo del lugar, clima y época del año.

Los niveles de contaminación de aerosoles en función de la cantidad, se pueden determinar por recuento, por unidad de volumen. Para ello se utilizan contadores fotométricos digitales, que cuentan y clasifican por medio de celdas fotoeléctricas y amplificadores las partículas suspendidas para un volumen de aire determinado.

Por ej.: Considerando sólo las partículas $>$ a 0,3 micrones no es raro encontrar concentraciones en áreas urbanas de 10 millones de partículas/pie cúbico, en ciudades industriales: 100 millones por pie cúbico; en zonas rurales más de 1 millón por pie cúbico; y en cuanto a humo de cigarrillo: 30 millones por pie cúbico. Este total es tan sólo el 1% de las partículas suspendidas.

Con referencia a las concentraciones de microorganismos en el aire, se puede hablar desde unos pocos hasta varios centenares por pie cúbico, es decir, unos varios miles por m^3 . Se ha comprobado que la mayor concentración de microorganismos se encuentra en partículas que fluctúan entre los 2 y 5 micrones en tamaño.

Si consideramos según su tamaño:

Las que son mayores de 10 micras: CAEN VELOZMENTE

Entre 2 y 10 micras: CAEN CON VELOCIDAD DEPENDIENTE DE LA MASA DE AIRE.

Las que son entre 0,5 micras o menores: NO CAEN

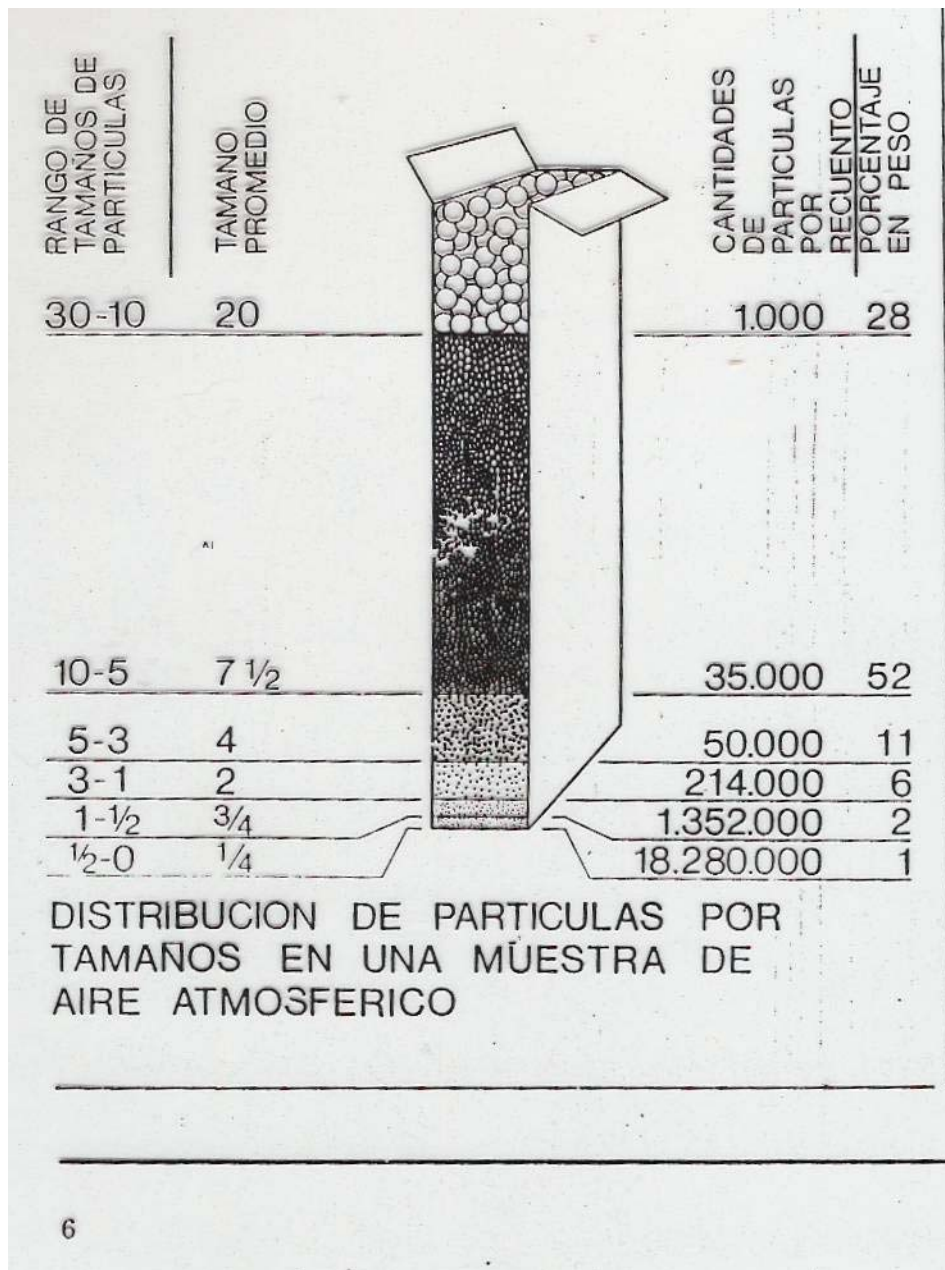
A su vez debemos considerar que **una persona genera por minuto** miles de partículas según su actividad:

Sentado sin moverse: 100.000 ($>$ 0,3 micras)

Sentado moviendo pies y manos: 500.000 ($>$ de 0,3 μ)

Parándose y sentándose: 2.500.000 ($>$ 0,3 μ)

Dijimos que los valores estaban dados para partículas de 0,3 μ ó $>$, si realizamos la distribución de partículas de acuerdo al conteo y peso relativo en una muestra de aire atmosférico, según lo observado en el esquema,



un alto porcentaje del peso total de las partículas corresponde a una cantidad muy baja de las mismas.

De un total aproximado de 20.000.000 sólo 36.000 superaron los 5 micrones de diámetro y sin embargo constituyen el 80% del peso total. Por el contrario se ve que las 18.280.000 partículas inferiores a los 0,5 micrones representan más del 91% por recuento del total de partículas colectadas, teniendo un peso equivalente al 1% del peso total.

Esto se debe tener en cuenta al analizar un filtro y su eficacia, por consiguiente un filtro que tenga una eficacia de retención alta si la medimos en función de la eliminación del contaminante en peso, puede ser totalmente inefectivo en la eliminación de partículas pequeñas(por ej. menores de 5 micrones) con lo que es ineficaz en reducir la carga de microorganismos en el aire ambiente.

* Partículas inertes: objetos sólidos o líquidos cuyo tamaño oscila, generalmente entre 1 nm y 1 mm.

* Partículas viables: partículas inertes que llevan uno o más microorganismos capaces de reproducirse. Los microorganismos no se encuentran flotando libremente en el aire

sino que son transportados de un sitio a otro unidos a partículas de polvo, escamas de piel, gotas de saliva, etc.

La FILTRACION es el método más utilizado para obtener aire de la calidad adecuada. El aire contiene partículas de diferente tamaño, por lo que se usan filtros de diferente eficiencia de filtración, colocados en serie, para hacer más eficiente y económico el proceso. Primero se colocan prefiltros, con el fin de eliminar partículas de mayor tamaño y luego los filtros de alta eficiencia, que eliminan las partículas más pequeñas. En la industria se utilizan filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air) que son capaces de retener partículas \geq de 0.3 micras con una eficiencia mínima de 99.97%. Estos filtros son hechos de un medio filtrante que se pliega en forma de acordeón para proporcionar una mayor área de filtración, ensamblado en una armazón rígida. Los filtros se colocan en el sistema de aire acondicionado (HVAC) de la planta o laboratorio, para proporcionar condiciones adecuadas de temperatura, humedad y cantidad de partículas.

El sistema de aire acondicionado usado en este tipo de plantas o laboratorios difiere del usado en oficinas, en los siguientes puntos:

- * Mayor suministro de aire: se requiere la entrada de mayor cantidad de aire en las zonas de trabajo limpio que en las oficinas, ya que se debe reducir la contaminación durante el proceso.
- * Uso de filtros HEPA: para retener las partículas de menor tamaño.
- * Uso de filtros terminales: para que las partículas desprendidas por los conductos del sistema de aire sean retenidas por el filtro HEPA.
- * Diferencia de presiones entre áreas: para evitar la entrada de aire desde las áreas más sucias hacia las más limpias.
- * Retornos en el extremo opuesto a la entrada del aire filtrado: para que el aire filtrado recorra toda el área y permita la eliminación de partículas.

Para comenzar a hablar de filtros y tipos de filtros, podemos agregar que éstos los usaremos para crear:

AREAS CONTROLADAS: en las que se mantienen, dentro de límites establecidos, parámetros físicos tales como temperatura, humedad y presión.

AREAS LIMPIAS: en las que, además de controlar los parámetros anteriores, se mantiene la concentración de partículas en el aire dentro de ciertos límites, que ya veremos.

Para definir el nivel de limpieza de estas áreas se han desarrollado normativas tales como el Federal Standard 209E(USA) donde se clasifican las áreas basándose en el número de partículas, de determinado tamaño, presentes en el aire de la misma, sin importar si son inertes o viables. En estos casos el propósito principal es reducir la cantidad de organismos viables en el aire. Si se reduce el número de partículas presentes en un área, también estamos disminuyendo la cantidad de partículas viables, por lo que se adoptó el Federal Standard 209E considerando la cantidad de partículas iguales o mayores de 0.5 μ presentes en un metro cúbico de aire. Posteriormente la International Organization for Standardization (ISO) desarrolló un nuevo documento con el fin de uniformar, a nivel mundial, esta clasificación.

En lo que es industria de producción de materiales orales, tópicos para uso biológico, son ISO Clase8(100.000) y las de llenado de inyectables con ISO Clase5 (100).(ya se verá más adelante)

LOS FILTROS:

Los filtros son usados para la limpieza del aire al ser inyectado en sistemas de aire acondicionado o en ventilación, y también antes de la emisión de aire contaminado al ambiente exterior de, por ej., plantas de energía nuclear, centros de investigación bacteriológica y de virología, etc.

Los filtros están constituidos por medios fibrosos o porosos con diferentes configuraciones. Las características más importantes son la eficiencia de la retención,

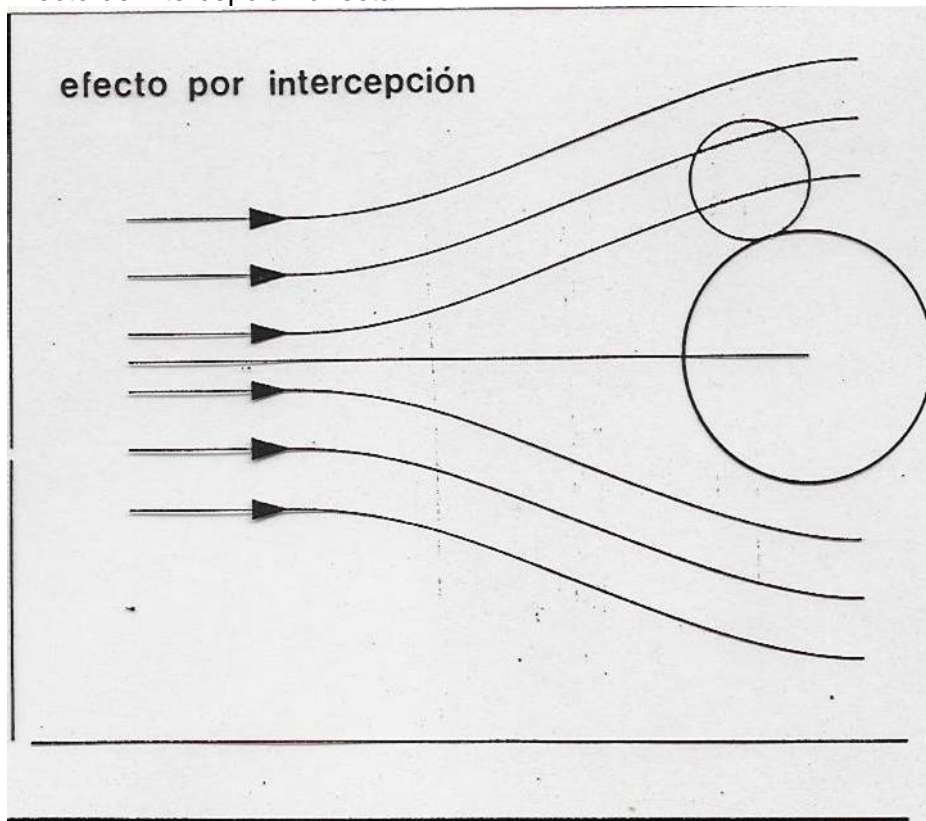
la caída de presión o diferencia de presión estática para un determinado caudal y la capacidad de almacenamiento de polvo, que es la cantidad de polvo retenido en peso, cuando se llega al punto de saturación y recambio del filtro.

Dejando de lado los filtros de carbón activado, que son usados para la separación de gases y olores por adsorción, los filtros pueden dividirse en tres clases: Pre-filtros, filtros finos y filtros HEPA., y se basa en las características de los diferentes medios filtrantes, el mecanismo de captación de partículas, su eficiencia filtrante e indirectamente la aplicación del filtro.

La capacidad de un filtro para retener partículas se debe, entre otros, a varios fenómenos físicos como el efecto tamiz, la intercepción directa, la separación por inercia y el efecto de difusión Browniana. Existen además, efectos de atracción electrostática entre los materiales del filtro y las partículas.

Para explicar los mecanismos de la filtración se supone que las partículas son esféricas y resultan atraídas por fuerzas de Van der Waals al tocar los medios filtrantes, quedando en consecuencia retenidas en ellos.

Efecto de intercepción directa:

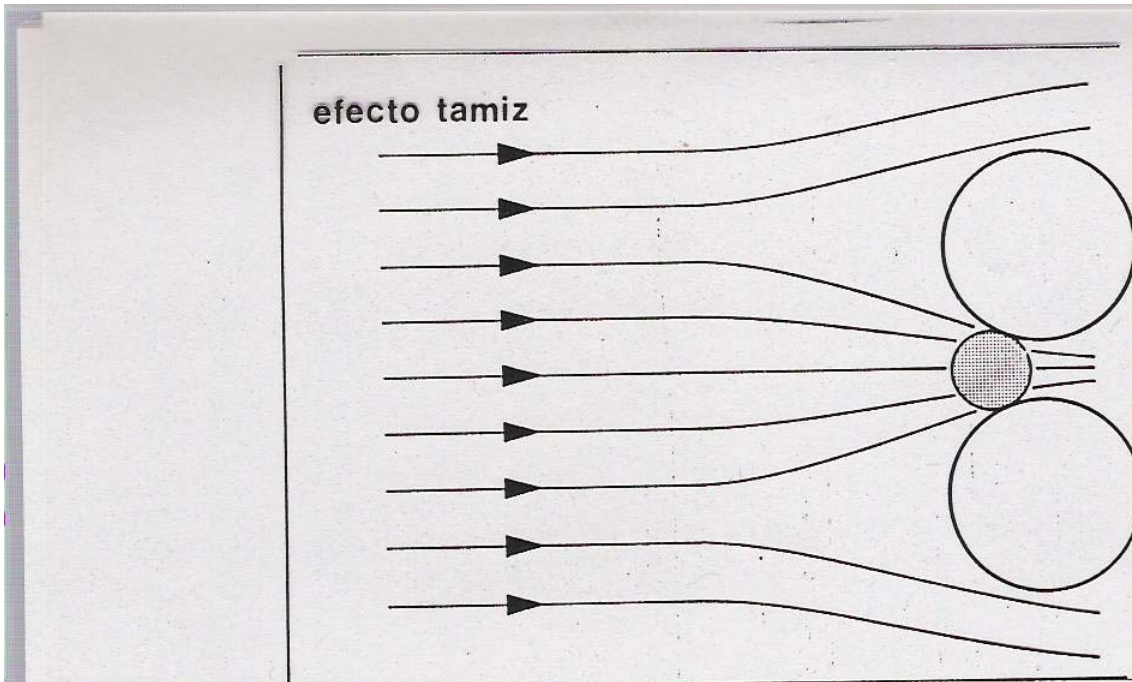


Las pequeñas partículas livianas siguen las líneas de flujo del aire alrededor de la fibra del filtro.

Si el centro de la partícula sigue un recorrido que se acerca a la superficie de la fibra a una distancia menor que el radio de la partícula r/p , la partícula es interceptada y se adhiere a la fibra (ver figura). Este efecto es independiente de la velocidad del aire, a menos que la variación provoque turbulencias alrededor de la fibra.

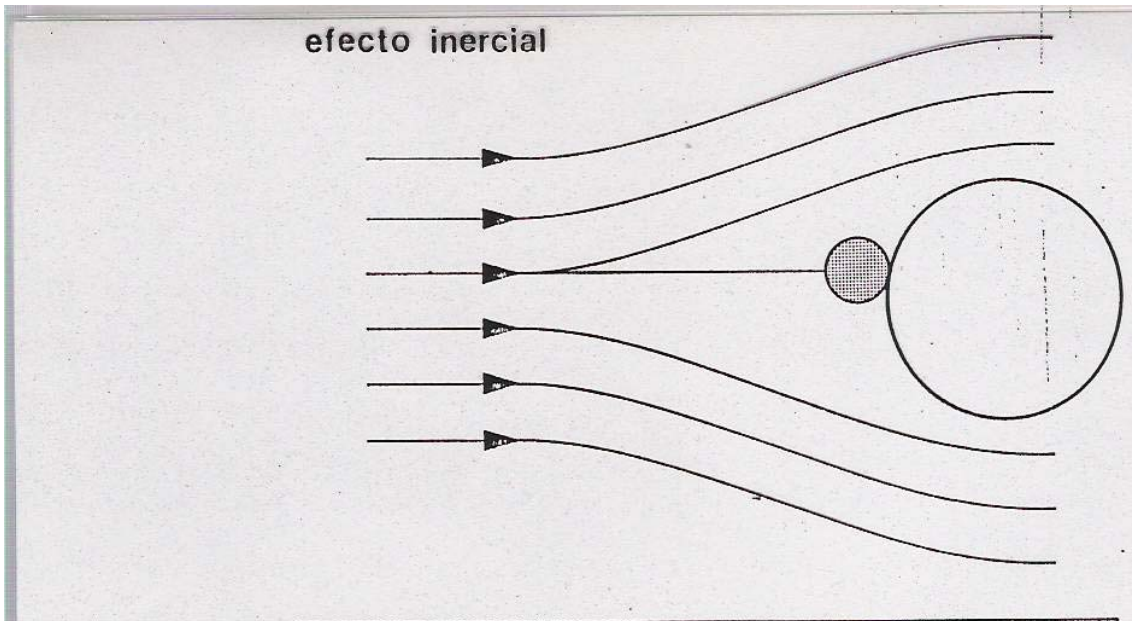
El efecto de intercepción aumenta con partículas de mayor tamaño, y con medios de menor tamaño de fibra (a igualdad de peso específico del medio filtrante), que traen como consecuencia menores distancias entre fibras.

Efecto tamiz:



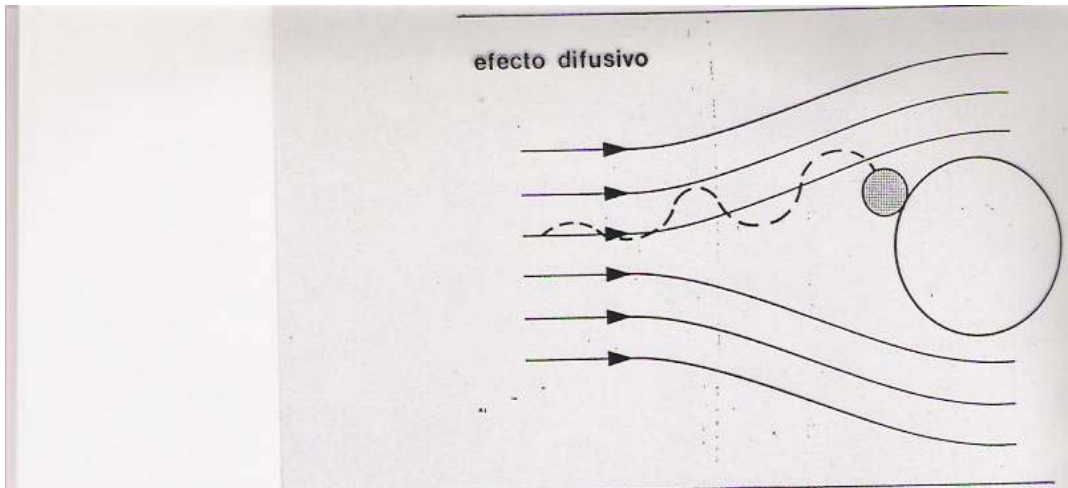
Partículas de tamaños mayores al de la separación entre fibras consecutivas no pueden pasar a través del medio (ver figura)

Efecto de inercia:



Las partículas de mayor tamaño están sujetas a una fuerza de inercia tal que las desvía de la línea de flujo cuando se acercan a la fibra. La partícula continúa en su desviación impactando sobre la superficie de la fibra, quedando adherida a la misma. La fuerza de inercia aumenta con el tamaño de la partícula y con el aumento de la velocidad de aire, incrementando por consiguiente la eficiencia en el poder de retención por este mecanismo. (ver figura)

Efecto de difusión:



Las partículas inferiores a 1 micrón no siguen las líneas de flujo alrededor de la fibra del filtro. Están influenciadas por el movimiento Browniano, típico de las moléculas gaseosas, que junto con otras partículas las chocan provocando movimientos desordenados que las desvían en su trayectoria, vibrando de modo tal que en algún momento, entran en contacto con la superficie de las fibras, donde quedan retenidas por fuerzas de Van der Waals (ver figura).

La probabilidad de que una partícula entre en contacto con otra decrece con la velocidad y con el diámetro de la partícula. (tabla 1)

TABLA I

EFICIENCIA	Velocidad	Tamaño de partícula	Diámetro de la fibra	Densidad de medio
Mecanismo de Difusión	-	-	-	+
Mecanismo de Intercepción	o	+	-	+
Mecanismo de Inercia	+	+	-	+

+ La eficiencia aumenta con la velocidad, tamaño de las partículas, diámetro de la fibra.
 - La eficiencia disminuye con la velocidad, tamaño de las partículas, diámetro de la fibra, etc.
 o La eficiencia es independiente de la velocidad, tamaño de las partículas, etc.

Tanto el efecto de inercia como el de intercepción aumentan con el tamaño de las partículas, mientras que el de difusión decrece.

Esto implicaría, que hay un tamaño de partícula crítico, que es el que corresponde a la más difícil de retener en un filtro, según esta curva de eficiencia tiene un mínimo para partículas entre 0,18 micrones y 0,3 micrones de diámetro. Del análisis de estas

curvas surge que las partículas de 0,3 micrones son consideradas las más difíciles de retener en filtros HEPA o absolutos en condiciones normales de operación.

Métodos de Ensayo:

Los métodos de evaluación se pueden dividir en tres grandes grupos:

- 1.- Gravimétricos (polvo sintético) (por peso)
- 2.- Efecto mancha (aire atmosférico)
- 3.- Recuento de partículas.

	Eficiencia comparativa de filtros Cambridge		
Filtro H.E.P.A.	Peso%	Mancha%	Recuento%
Cambridge	(*)	(*)	99,97
Micretain	(*)	99	95
HI FLO 95	(*)	93-97	80-85
HI FLO 85	99	80-85	50-60
HI FLO 65	97	60-65	20-30
HI CAP	95	30-35	15-20
Lana de Vidrio 2" impregnada	76	8-12	2-5
Metálico impregnado 2"	76	8-12	2-5

(*) Prácticamente 100%. Este ensayo no es práctico para lectura más precisa.

Eficiencia filtrante:

Las concentraciones de partículas pueden medirse en función del recuento de las mismas, de su peso o del efecto de mancha que producen.

En base a estas tres maneras de medir concentraciones de partículas en aire se han generado normas para la determinación de la eficiencia de los filtros, que se hallan normalizados según el ASHRAE St.52-76 para los ensayos por peso y por mancha, y el recuento de partículas por aerosoles de DOP según el Military Std.282 de USA.

Los filtros HEPA (comúnmente llamados absolutos), se usan para condiciones críticas de ambiente, donde la obtención de aire ultra limpio es de máxima importancia.

El método de ensayo D.O.P. fue desarrollado en Estados Unidos durante la 2ª Guerra Mundial, basándose en que la partícula de máxima penetración es la de 0,3 micras. Este método de ensayo DOP con partículas homogéneas de 0,3 micrones generadas en aerosoles monodispersos o polidispersos según la aplicación, es el más reconocido mundialmente como método por excelencia para definir la eficiencia de los filtros HEPA, ya para detectar fugas y sellar pérdidas de filtros HEPA, previamente detectadas por el ensayo monodisperso.

Eurovent 4/4:

Ha adoptado el método Británico de la llama de sodio, con algunas modificaciones, y ha sido propuesto para las normas ISO.

Esta Norma tiene 2 diferentes métodos básicos:

Los filtros se ensayan con una mezcla de polvo sintético y con aire atmosférico ambiental no tratado. En el 1º caso se habla de arretance o retención en peso del filtro, que es un ensayo gravimétrico que sirve para medir la habilidad de separar polvo sintético de partículas relativamente groseras comparadas con el aerosol ambiental.

El otro sirve para determinar eficiencia y se lo define como la habilidad del filtro para evitar el efecto de ensuciamiento o la decoloración provocada por el aire atmosférico.

Comparación de los dos ensayos entre sí:

(tabla II) Vemos en la parte inferior de la tabla QUE FILTROS COMO LOS COMUNES de lana de vidrio o metálicos, con una eficiencia del 76% según peso, con polvo sintético, son capaces de disminuir el efecto de la mancha con aire atmosférico e nun 8 a un 12%.

Si los ensayáramos con aerosoles de DOP veríamos que su eficiencia es de menos del 5%.

En consecuencia, cuando se deba seleccionar un filtro es fundamental especificar o verificar la eficiencia, y el método de ensayo con que se verificó la misma.

Ensayo del Dioctilftalato:D.O.P:

Este ensayo es una Norma para ensayar filtros HEPA con eficiencia del 99,7%, por definición, para aerosoles monodispersos de 0,3 micras.

El DOP es un plastificante cuya caracterísitca es que su presión de vapor, a temperatura ambiente, es suficientemente baja como para dar un aerosol estable cuando condensa. Es además estable a altas temperaturas, incoloro, no tóxico, no corrosivo y barato.

Las mediciones se efectúan antes y después del filtro , por medios fotoeléctricos.

El aire es prefiltrado con un filtro HEPA a la entrada y dividido en 3 corrientes. Una es calentada a 185°C, pasando sobre DOP calentado a 200°C, de manera que el aire se satura con vapor de este último. Este flujo de aire saturado es luego mezclado con la segunda corriente de aire, y el vapor condensa en un aerosol monodisperso formando aerosoles de 0,3 micrones, medida que se regula por la temperatura de la corriente fría. Las partículas deberían tener un diámetro de 0,3 micrones, lo que es verificado por medio de un dispositivo óptico.

Después de la condensación, el aerosol es diluído, a una concentración de 100mg/m³, con la mezcla de la 3^o corriente de aire en la cámara, y el filtro ensayado al caudal de diseño. El caudal en exceso es extraído por la chimenea.

La penetración del aerosol de D.O.P. es medida por un penetrómetro, verificándose el tamaño de la partícula.

Ver esquema adjunto.

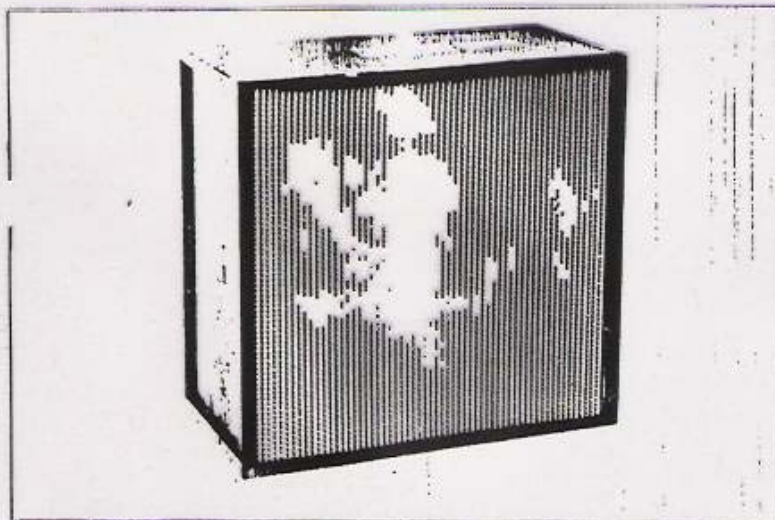
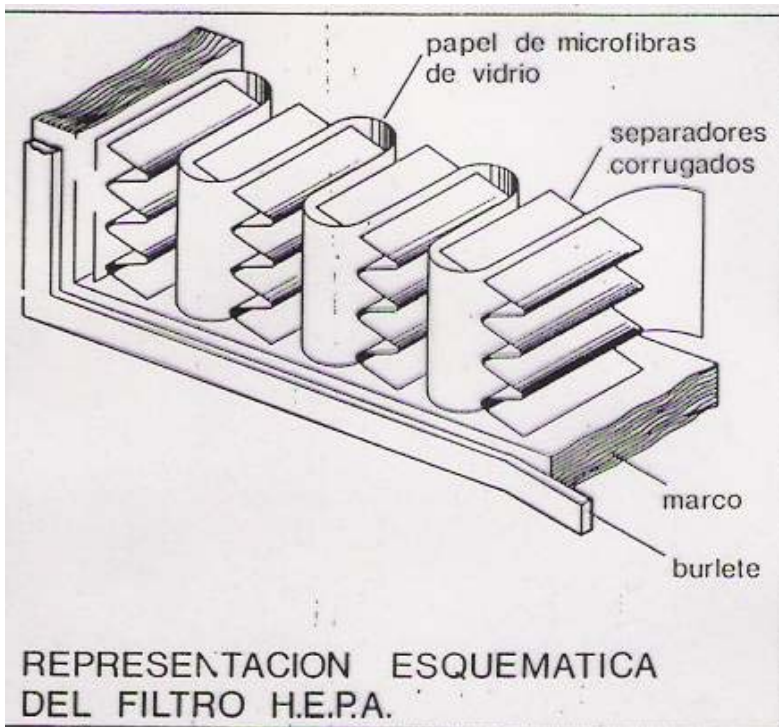
La medición de la penetración de D.O.P. se efectúa con ayuda de una celda fotoeléctrica. Se dispone de un foco, cuya luz es dispersa por las pequeñas partículas transparentes, lo que hace que la celda emita pulsos proporcionales a la concentración del aerosol. Al chequear un filtro, muestras de aire pasan antes y después del mismo, por la cámara óptica donde la luz se dispersa, y dicha dispersión es registrada por la celda f.e., bajo la forma de lectura por una aguja en un cuadrante. Esta lectura se ajusta al 100% de concentración de DOP, antes del filtro. A continuación se toman muestras del aire filtrado. la dispersión de luz provocada por las partículas del aire filtrado, nos da el valor directo de la penetración de partículas de DOP en un filtro. El instrumento es graduado con diferentes escalas permitiéndose, por el cambio de ellas, lecturas directas de valores tan pequeños como el 0,001% del aerosol emitido.

El complemento de la penetración es la eficiencia D.O.P.. Un filtro con 0,02% de penetración tiene, por lo tanto, una eficiencia del 99,98%, con lo que cumple con la especificación de HEPA.

ELEMENTOS DE LOS FILTROS H.E.P.A.

Los constituyentes de estos filtros son el medio filtrante o papel, los separadores, el marco, los adhesivos y el burlete.

Ver figuras:



Papel de filtro o medio filtrante:

Los primeros intentos se hicieron con fibras de amianto ultrafinas, pero luego se usaron fibras de celulosa y amianto, vidrio, amianto y vidrio; fibras plásticas y cerámicas. Los de microfibras de vidrio, plásticos, cerámica, etc son los que, con los avances de la tecnología, han dado mejores resultados sin desprendimientos de partículas al medio ambiente, y con distintas ventajas y desventajas con respecto a la resistencia a altas temperaturas y corrosión química. Las microfibras cerámicas se utilizan cuando se necesita trabajar con altas temperaturas (1000 °C).

Separadores:

En los filtros H.E.P.A. la velocidad ideal del aire a través del medio es de 2,5 cm/seg o sea 1,5m/min, siendo a esa velocidad, la caída de presión de 25mmH₂O aproximadamente, por ser la penetración mínima de 0,2%. Para velocidades tan bajas es necesario aumentar muchas veces (entre 25 y 70 veces) la superficie efectiva del medio respecto a la sección del filtro.

Para lograr ese aumento de superficie efectiva a 18 m², lo que se hace es plegar el material y para que no se encimen los pliegues es que se usan separadores de distintos materiales como papel Kraft, aluminio (los más usados) y acero inoxidable, o en algunos más modernos se los sostiene con cordones adheridos al medio filtrante que les sirven de soporte.

Marco:

Se utilizaron marcos de madera o cartón pero son altamente deformables por lo que se reemplazaron por metales o plásticos según los usos y el tamaño.

Adhesivos:

Los más usados son los de tipo goma siliconados, aunque también según el tipo de filtro y el uso pueden ser de fibra de vidrio o refractarios.

Burletes:

Goma, neoprene, fibras de vidrio y minerales.

Control de calidad en producción:

Todos los filtros son ensayados individualmente y se le coloca en el marco una etiqueta indicadora de la caída de presión, porcentaje de penetración D.O.P. y caudal.

Hay actualmente métodos de ensayo con rayo laser que son más rápidos y precisos.

AREAS LIMPIAS Y FLUJO LAMINAR:

Los métodos para controlar la contaminación ambiental se han basado tradicionalmente en la tecnología de la filtración del aire y de su distribución dentro de áreas cerradas levemente presurizadas. Estas áreas son normalmente desinfectadas por medios químicos o físicos, tales como lavados con soluciones desinfectantes, formolización y aplicación de lámparas ultravioletas.

La tecnología de la era espacial llevó a generar una tecnología absolutamente novedosa en el diseño y la construcción de "áreas limpias", utilizando elementos y métodos que llevan a reducir considerablemente los contaminantes bajando a un mínimo el riesgo de contaminar los productos elaborados o las operaciones de laboratorio o de manejo de pacientes según el caso.

Hay 3 factores que influyen en la contaminación de un objeto dentro de un ambiente:

- 1) La atmósfera que lo rodea.
- 2) Las superficies que lo circundan.
- 3) La superficie del propio objeto.

Estos 3 factores son fuentes que originan un nivel de contaminación por:

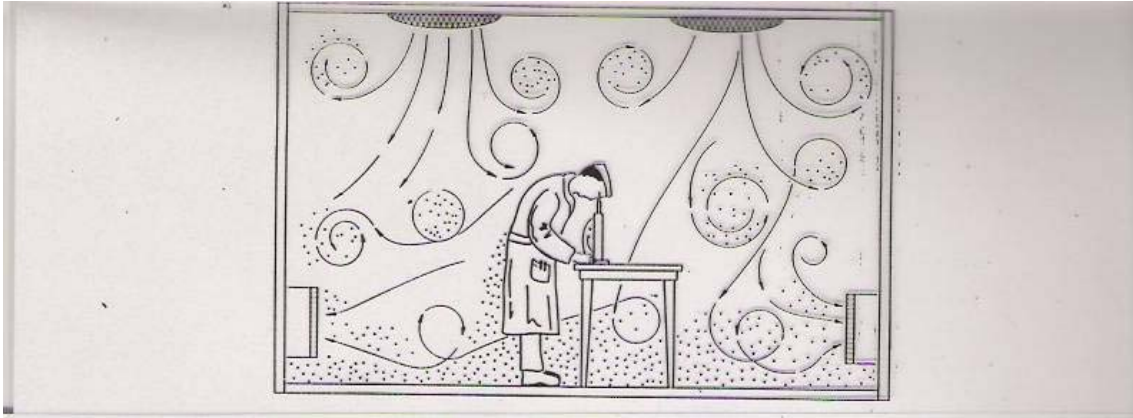
precipitación atmosférica o por decantación de partículas sobre la superficie del objeto, contaminación por contacto superficial y transferencia, y la contaminación auto-generada.

Dentro del área de trabajo, debemos distinguir contaminantes ambientales provenientes de 2 distintos orígenes:

- 1) La contaminación externa introducida al área a través del sistema de aire acondicionado que ventila al ambiente, y al aire resultante de infiltraciones a través de puertas y ventanas.
- 2) La contaminación generada dentro del local por el propio personal o por la actividad que allí se desarrolla, de hecho cuando el personal se retira disminuye el conteo de partículas en el área.

Normalmente el aire pasa a través de filtros absolutos y se mantiene presurizado.

Las "áreas limpias",



como ya lo dijimos están comprendidas dentro de la norma 209E de U.S.A. o según otras normativas:

Comparación de varios códigos

Comparación de diferentes sistemas de clasificación				
BPF OMS	US Customary	US 209E	ISO/TC 209	CEE Anexo I BPF
A	M 3.5	100	ISO 5	A
B	M 3.5	100	ISO 5	B
C	M 5.5	10 000	ISO 7	C
D	M 6.5	100 000	ISO 8	D

CLASIFICACION DEL SISTEMA DE AIRE

<i>Grado</i>	<i>En reposo</i>		<i>En operación</i>	
	<i>Número máximo de partículas permitidas /m³ igual o mayor de</i>			
	0.5 µm	5 µm	0.5 µm	5 µ
A	3 500	0	3 500	0
B	3 500	0	350 000	2 000
C	350 000	2 000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	no definido	no definido

Comparación entre la clasificación de las áreas limpias de acuerdo al Federal Standard 209E y las Normas ISO.

FED STD 209E S.I. (U.S.)	ISO	Número máximo de partículas ≥ 0,5 μm/m ³ de aire	
		FED STD 209E	ISO
	ISO Clase 1	-	-
	ISO Clase 2	-	4
M 1.5 (1)	ISO Clase 3	35,3	35
M 2.5 (10)	ISO Clase 4	353	352
M 3.5 (100)	ISO Clase 5	3.530	3.520
M 4.5 (1.000)	ISO Clase 6	35.300	35.200
M 5.5 (10.000)	ISO Clase 7	353.000	352.000
M 6.5 (100.000)	ISO Clase 8	3.530.000	3.520.000
	ISO Clase 9	-	35.200.000

Requerimientos para mantener un sistema de aire limpio:

1. El aire debe fluir uniformemente
2. todo el aire debe pasar por filtros HEPA
3. Ambientes con paredes lisas
4. Sistema de pre-filtros: retienen el 98% de partículas de 10 micrones
5. Filtros HEPA: retención del 99,97% para partículas > de 0,3 micras
6. Recirculación de aire del 80 %
7. Renovación de aire del 20% %(en áreas limpias: 13-15 renovac. por hora, en áreas de flujo laminar:120 renovac./hora)
8. Temperatura 20-25 °C
9. Humedad: 35-45%

Módulo tipo:

- Ventiladores
- Pre-filtros
- Filtros HEPA
- Cámara de mezcla de aire

Áreas estériles convencionales:

Para lograr las mismas se debe tener aire filtrado a sobrepresión, aire en régimen de turbulencias. Son clase 100.000 a lo sumo.

Los inconvenientes que presentan son:

1. En el régimen turbulento se depositan las partículas mayores y las menores según la circunstancia.
2. No se elimina la contaminación generada en el local.
3. Deben extremarse las medidas sobre limpieza del personal y elementos introducidos a ellos. Por ej:

Personal

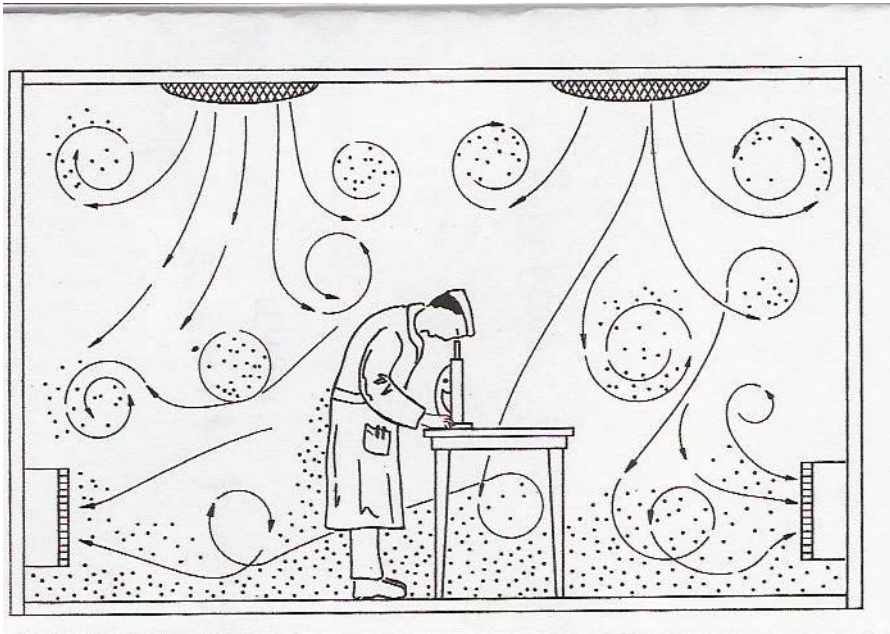
- Ropa

- Apropiada al grado del aire
 - *Grado D*
 - *cabello, barba y zapatos*
 - *Grado C*
 - *cabello y barba*
 - *bata que cubra hasta las muñecas y el cuello*
 - *no fibras*
 - *Grado B*
 - *máscaras, guantes*
- Lavandería y cambios

Precauciones:

- Limpieza de zapatos, lustrado, con aspiración previo al ingreso.
- Cambio y aspiración de ropa y muy recomendable la ducha de aire.
- Debido a que es difícil llegar a la clase 100.000, se implementa el uso de rayos U.V. o agentes químicos

Area limpia convencional:



Áreas flujo laminar:

Para ellas el planteo básico de contaminación es el mismo, o sea,

- por el aire externo
- por contaminación generada en el área.

El primer punto es solucionable por el empleo de filtros absolutos, mientras que el segundo puede hacerse por mecanismos autolimpiantes en el área.

Entre 1960 y 1961 un equipo encabezado por el Dr Whitfield comenzó a ensayar el trabajo con distintas velocidades de desplazamiento de aire, con lo que se llegó a tener un ambiente clase 100, es decir no más de 100 partículas por pie cúbico o 3,5 por

litro de aire. A ese mecanismo lo llamó Flujo Laminar por su semejanza con el movimiento de ese tipo que se da en mecánica de fluidos.

Las velocidades de aire son menores que las habituales a la salida de los filtros, tal como se usan en las áreas convencionales, y las líneas de desplazamiento se mantienen paralelas en todos sus puntos y uniformes en el espacio y en el tiempo. Evidentemente se había logrado el mecanismo de la autolimpieza de las áreas limpias y se implementó al norma 209. De la que se desprende que:

Se llama Flujo Laminar a una corriente de aire previamente filtrado por filtros HEPA cuya masa toda, se desplaza a una velocidad uniforme de 90 pies/min(27 m/min) +/-.

En rigor el flujo laminar actúa como un pistón de aire limpio que se desplaza dentro de un cilindro barriendo fuera de las áreas las partículas en ellas generadas.

Los niveles de limpieza de estas áreas puede demostrarse por el hecho de que no se encuentra rayo de luz visible dentro de estas áreas.

Para evitar la generación de partículas, las paredes y pisos deben ser lavables y resistentes a la abrasión. Se recomienda la pintura epoxi como revestimiento. Deben ser evitados bordes, hendidias y recovecos. Los zócalos deben ser redondeados, y la ropa del personal debe ser cuidadosamente lavada, esterilizada y confeccionada con fibras sintéticas que no desprendan fibras. Así como se recomienda el uso de barbijos de los mismos materiales.

Lo ideal es la cobertura de la cabeza del operador con cofias que cubran lo más posible el cabello y la piel, ya que ésta es una fuente de generación de partículas.

En las grandes áreas de flujo laminar horizontal, las personas dispuestas cercanas al banco de filtros HEPA se encuentran en niveles relativos de limpieza altos (Clase 100); sin embargo, siendo todos los individuos factores de contaminación, al llegar el aire al final del área tendrá una mayor contaminación relativa, considerándose a estas áreas Clase 100.000.

La ventaja de las áreas de flujo laminar vertical consiste en que nunca el aire en contacto con un individuo o proceso pasa luego a otro individuo lo que permite mantener un nivel clase 100 en toda la sala. La desventaja del flujo laminar vertical es su mayor costo de instalación y operativo.

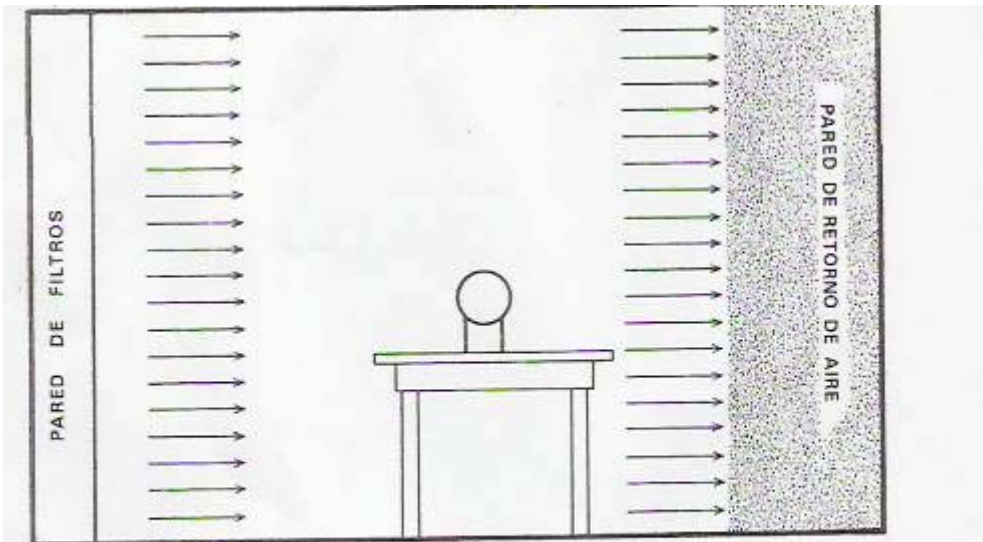


Fig. 2 Area de flujo laminar horizontal.

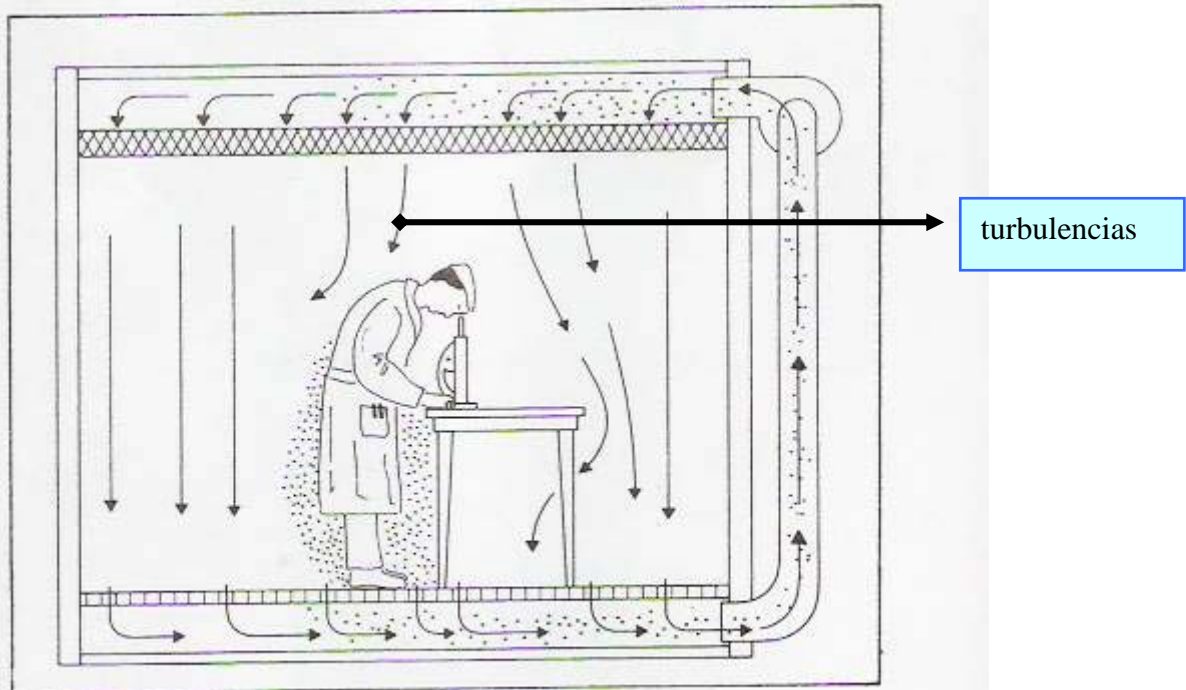
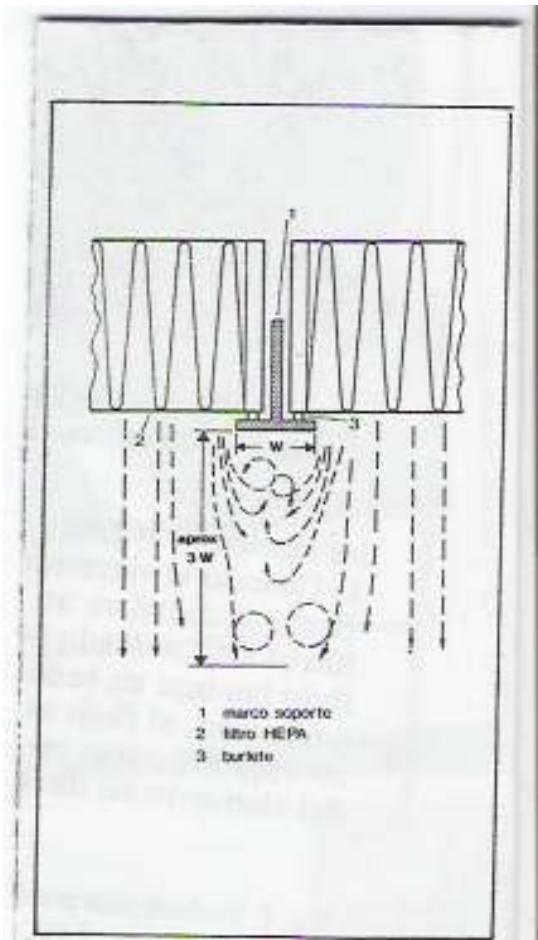


Fig. 3 Area estéril de flujo laminar vertical.

Turbulencias:



Turbulencia
provocada
por el perfil
del soporte

Turbulencias:

Todo objeto situado dentro del flujo laminar origina turbulencias después del mismo. Las turbulencias se recomponen a flujo laminar después del objeto, siguiendo las siguientes reglas:

1) Cuando el elemento o la discontinuidad en un banco de filtros está rodeado por el flujo laminar en todo el perímetro, el flujo se reconpone a 3 veces el ancho del elemento en dirección del flujo, según se ve en la figura.

2) Cuando el flujo de aire se desplaza a un solo lado de la discontinuidad u obstrucción, el flujo se reconpone después de 6 veces el ancho de la misma en dirección del flujo.

Es importante que las operaciones críticas no se realicen en las zonas de las turbulencias, así como tener en cuenta las turbulencias generadas por movimientos de brazos y manos y la disposición de objetos dentro del área de trabajo. Esto vale para las áreas de flujo laminar como para las cabinas de trabajo o bancos de flujo laminar.

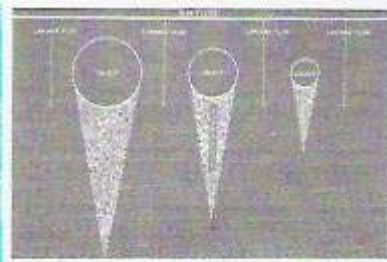


Fig. 10 Esquema de turbulencias originadas por distintos objetos.

Fig. 11 Altura de cono de turbulencias producido por un objeto en una mesada de flujo laminar.

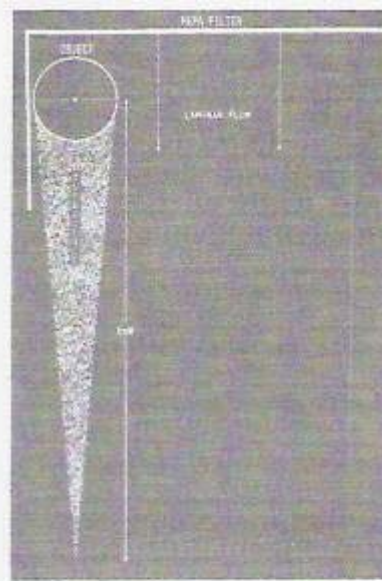
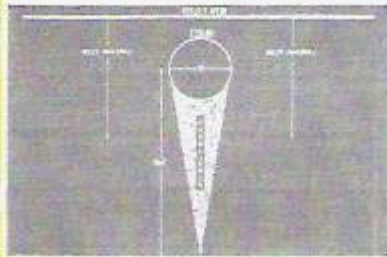


Fig. 12 Turbulencia generada por elemento bañado de un solo lado por el flujo laminar.

De la observación de estas figuras se desprende que se deben colocar los objetos en la zona de trabajo considerando que el vértice del cono de turbulencia no supere la línea de 15 cm dispuesta paralela al borde exterior de la mesa de trabajo.

Con estos dispositivos se protege el producto, pero no hay protección para el personal ni el medio ambiente.

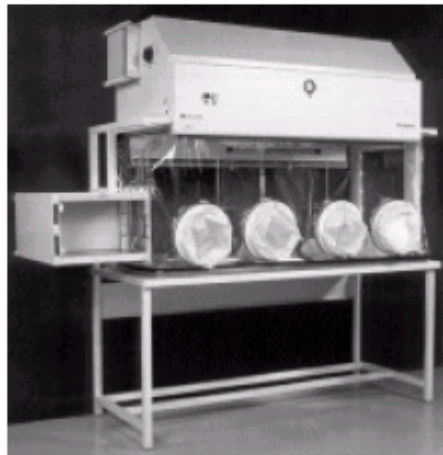
Cuando se trabaja con materiales peligrosos, por ejemplo microorganismos patógenos, sustancias con propiedades alergénicas o irritantes, no se pueden utilizar estos dispositivos porque no protegen al personal y contaminan el medio ambiente, en estos casos se utilizan **GABINETES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA** donde se logra protección para el producto, el personal y el medio ambiente. Básicamente estos gabinetes son similares a las campanas de flujo laminar vertical, pero se diferencian en que tienen colocado en la salida de aire de las mismas filtros HEPA para filtrar el aire que sale al medio ambiente. En algunos casos, cuando se manipulan sustancias químicas, se colocan además otros dispositivos para retenerlas.



Campana de flujo laminar vertical

Gabinete de seguridad biológica

Existen otros dispositivos denominados **AISLADORES**, que son gabinetes de seguridad biológica que están totalmente aislados del ambiente. Son microambientes donde se pueden realizar manipulaciones asépticas sin que el personal entre en contacto con el producto, ya que proporcionan una separación total entre un ambiente y otro. Los aisladores no intercambian directamente aire con el ambiente que los rodea y el aire que entra, lo hace a través de filtros HEPA.



Las campanas de flujo laminar y los gabinetes de seguridad biológica deben ser colocados en ambientes controlados, sin corrientes de aire (Por ejemplo, las producidas al abrir puertas, caminar rápidamente frente a la campana) que puedan perturbar el flujo unidireccional.

Deben ser áreas de acceso restringido.

Las áreas limpias deben ser diseñadas y construidas de manera de disminuir al mínimo la cantidad de partículas desprendidas, para ello se deben utilizar materiales adecuados.

Debe haber la menor cantidad de muebles, repisas, etc. y no deben haber sitios de difícil acceso, que permitan la acumulación de sucio.

Las superficies de los techos, paredes, pisos, luces, estantes, mesones, gabinetes, etc. deben ser lisas, libres de grietas o hendiduras, no deben liberar partículas y ser resistentes a los procesos de limpieza y desinfección. Las uniones de las paredes con el techo y el piso deben ser redondeadas para facilitar su limpieza e impedir la acumulación de sucio.

Las lámparas no deben sobresalir de los paneles y estar selladas al soporte. Los pisos deben ser de materiales resistentes y sin hendiduras.

USO Y APLICACIÓN DE LOS EQUIPOS PARA PROTECCION DEL OPERADOR Y DEL AMBIENTE

En los laboratorios de investigación bacteriológica y de virología, se efectúan trabajos con materiales peligrosos para la salud, como cultivos de patógenos, virus, productos biológicos desconocidos en cultivo de tejidos, materiales cancerígenos, etc. En producción farmacéutica se trabaja con productos oncológicos, hipnóticos, etc. que demandan la protección del operador y del ambiente.

Para lo anterior se utilizan diferentes equipos de seguridad biológica definidos según sean para la protección del operador y del ambiente de laboratorio solamente, o también para preservar al producto o cultivo del contaminante ambiental, manteniéndose entonces un doble compromiso. Hay que considerar el hecho de que en un 30% de los casos las causas de las infecciones adquiridas son desconocidas en cuanto al medio de transmisión.

Las infecciones por causas conocidas son en su mayoría originadas por accidentes que son consecuencia de alguna forma de contacto directo, como inoculación o ingestión. Más difíciles de reconocer son las causas originadas por aerosoles patógenos generados por pipeteo, transvasado, centrifugación y manipulación de cultivos.

El reconocimiento del peligro de las enfermedades e infecciones adquiridas en el laboratorio ha llevado a la necesidad de desarrollar métodos, procedimientos y equipos para llevar a un mínimo la exposición del operador o agentes infecciosos conocidos o potencialmente peligrosos.

Con el desarrollo de la ingeniería genética y los laboratorios de bioingeniería y ADN recombinantes, la necesidad de equipos confiables de bioseguridad se ha incrementado al máximo en especial en laboratorios donde se trabaja con agentes exóticos. La necesidad de aislación de los mismos con el ambiente exterior ha llevado al equipamiento de bioseguridad a cumplir con condiciones extremas.

Sin ir más lejos, en nuestro país la erradicación de la fiebre aftosa hace que los laboratorios donde se trabaja con dicho virus sean sometidos a exigencias máximas. En casos de precauciones extremas se instalan dos filtros HEPA en serie evitándose el riesgo potencial de pérdidas por accidente en uno de ellos.

Actualmente se fabrican filtros ULPA (Ultra Low Penetration) definidos con eficiencias del 99.999% y 99.9999% en 0,12 micrones. Se ha verificado que el aerosol de mayor penetración no es como se creía de 0,3 sino de 0,12 micrón, pero las diferencias de penetración no son substanciales, razón por la cual sigue utilizándose la vieja definición de filtro HEPA. La selección de equipos por sus clases I, II y III se hace en función de su riesgo, basándose en la monografía del NIH (National Institute of Health) y del C.D.C. (Center for Disease Control) en EEUU, con agentes de riesgos de Niveles 1,2,3 y 4 siendo el nivel 1 de mínimo riesgo y el 4 de máximo riesgo.

§ Nivel de riesgo 1: Agentes biológicos de los que no se conoce como causantes de enfermedades en adultos sanos. No se requiere generalmente equipos de seguridad biológica.

§ Nivel de riesgo 2: Agentes asociados con enfermedades humanas. Peligrosas por : Autoinoculación, ingestión, mucosas. Prácticas: Uso de equipos de seguridad biológica clase I o clase II.

§ Nivel de riesgo 3 :Agentes biológicos locales o exóticos con posibilidad de contaminar por transmisión por aerosoles enfermedades que puede tener consecuencias graves.

§ Nivel de riesgo 4: Agentes extremadamente peligrosos y/o exóticos, que pueden transmitirse por aerosoles.

En la práctica se utilizan únicamente equipos de seguridad Clase III (cajas de guantes) con cuidados extremos con el personal, incluyendo a veces ropas con escafandras con presión positiva. Se requiere esterilización de todos los residuos por autoclave o incineración y cambios de ropas esterilizadas.

EL AMBIENTE DE LABORATORIO DE BIOSEGURIDAD

A diferencia de las áreas limpias utilizadas para llenado aséptico en la industria farmacéutica, que se encuentran en zonas con inyección de aire por filtro HEPA y presión positiva para evitar la posibilidad de entrada de contaminantes a la zona limpia, donde se trabaje con patógenos deberá estar con presión negativa. La idea fundamental es que en toda operación, sea de manipuleo, transvasado, agitación, centrifugación o pipeteo, habrá una generación de aerosoles. Cuando se trate de patógenos, deberá evitarse la posibilidad de su salida al exterior por el riesgo que ello implica. Para ello el gabinete de seguridad biológica, que llamaremos de primera barrera, deberá ser instalado en ambientes de laboratorio que llamaremos de barrera secundaria. Dichos ambientes como habíamos mencionado previamente, amén de presentar superficies lisas en paredes y pisos (con zócalos redondeados) que faciliten su limpieza y desinfección, deberán tener una extracción de aire a través de filtros HEPA, tal que provoque un ambiente de presión negativa. Se evitará el escape al exterior de aerosoles en caso de algunas aperturas, accidentes o pérdidas.

La mayoría de los gabinetes de seguridad biológica fueron utilizados para aislar al experimento del investigador. Los equipos de aislación de áreas limitadas construidos fueron llamados Clase I, II y III por los laboratorios biológicos del ejército de los EEUU establecidos en Fort Detrick, los que hicieron la mayor parte del trabajo de desarrollo de los mismos.

EQUIPOS CLASE I

Los gabinetes de seguridad Clase I son básicamente campanas de extracción de acero inoxidable que usan un caudal de aire que se dirige del ambiente hacia la mesa de trabajo y de allí a un extractor con filtros HEPA, de manera de evitar la salida de aerosoles al ambiente del laboratorio.

La mayor desventaja del gabinete Clase I, es que los materiales en experimentación son expuestos a los contaminantes ambientales que entran al gabinete con el aire

ambiente. Más aún, el hecho de que el régimen de desplazamiento del aire sea turbulento, hace posible la contaminación cruzada dentro del gabinete.

Los gabinetes Clase I son de seguridad parcial para trabajos con agentes de riesgos bajos o moderados, donde hay una necesidad de aislación para el ambiente y el operador pero no para el producto.

Permítasenos subrayar una vez más que el gabinete no aísla a los cultivos y materiales en experimentación de los contaminantes del aire ambiente del laboratorio. La mayor diferencia entre los equipamientos Clase I y las campanas de extracción de humos se debe al filtro HEPA, que es el elemento fundamental para evitar el escape de aerosoles al ambiente. La protección del personal se hace posible por el movimiento constante de aire del operador hacia el gabinete. El flujo controlado de aire en el área de trabajo evita la salida de los contaminantes por la abertura frontal dando protección al personal. Siendo el flujo de aire inducido por un motoventilador centrífugo que extrae el aire del gabinete, se genera una presión negativa dentro del mismo, evitando la salida del aire contaminado hacia el ambiente exterior. La cabina Clase I que a continuación del filtro HEPA tiene en la extracción un filtro de carbón activado para la eliminación de gases contaminantes que no son eliminados por el primero.

EQUIPOS CLASE II

Es de extrema importancia considerar dentro de los equipos de seguridad biológica los Clase II. En éstos se combinan dos necesidades o características: Se protege al producto del operador y del ambiente; y se protege al operador y al ambiente del producto.

El equipo Clase II es de flujo laminar vertical pero el porcentaje del aire se recircula dentro del gabinete extrayéndose el resto por un filtro HEPA. La cantidad de aire extraído es equivalente al caudal de aire de entrada en forma de cortina que aísla el ambiente del gabinete del ambiente exterior. Una de las diferencias fundamentales del equipo de seguridad biológica Clase II vs. los equipos comunes de flujo laminar, es que éstos (sean de flujo horizontal o vertical) no aíslan de ningún modo al ambiente de laboratorio de los aerosoles generados por el producto que los impulsa por la corriente de aire estéril. Si bien todos los equipos de seguridad biológica Clase II son de flujo laminar vertical, la inversa no es necesariamente cierta. Hay equipos de flujo laminar vertical para protección del producto que no protegen ni al operador ni al ambiente.

GABINETES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

TIPOS DE GABINETES

Desde el desarrollo de los primeros gabinetes Clase II, las modificaciones en los diseños ha llevado a la designación de varios tipos de los mismos. Esta clasificación ha originado una cierta confusión entre los usuarios, que trataremos de disipar en forma simple a continuación.

Es importante que el usuario que debe seleccionar un gabinete, y en la mayoría de los casos hacer la especificación que corresponde para su compra o licitación, sepa elegir el equipo más adecuado para su trabajo. De allí la importancia del conocimiento de las distintas alternativas.

Como ejemplo de la confusión, siendo los equipos de seguridad biológica Clase II de flujo vertical, en varias oportunidades se han hecho especificaciones en donde lo único que se menciona es "gabinetes de flujo laminar vertical", sin dar las características y especificaciones de los equipos Clase II que tienen normas reconocidas internacionalmente como las NIH 03/112 y la NSF 49.

Errores groseros, como el mencionado anteriormente, han resultado en la aplicación de gabinetes de flujo laminar común sin ninguna protección para el operador ni para el ambiente. En ese caso el flujo de aire se transforma en el vehículo de los aerosoles patógenos hacia el exterior del mismo.

Todos los equipos Clase II tienen en común la succión por una reja perforada que induce una cortina de aire, impidiendo la entrada o salida de aerosoles por la abertura frontal del equipo. La abertura frontal es de aproximadamente 20 cm. a lo largo de la mesa de trabajo .

Las grandes diferencias entre estos equipos consisten en el porcentaje de aire recirculado y el aire de extracción.

En casos de generación de gases y vapores que no son retenidos por el filtro HEPA será necesario que la recirculación del aire sea mínima o nula, porque de contrario aumentará la concentración gaseosa en la zona de trabajo. Por otro lado también es importante definir la salida del aire de extracción.

Cuando se generan vapores o gases es necesario que el filtro de extracción esté conectado al exterior del edificio por conductos, para no contaminar el ambiente del laboratorio.

Los equipos tipo A pueden estar conectados al exterior del edificio o tener la extracción al ambiente del laboratorio. En cambio, todos los equipos tipo B tienen extracción al exterior del edificio.

EXTRACCION vs. RECIRCULACION

Las mayores diferencias entre el tipo A, el tipo B y los gabinetes 100% extracción se deben al porcentaje de aire que es extraído o recirculado, y la manera en la cual el aire de extracción sale de la zona de trabajo.

El gabinete tipo A tiene un 70% de aire en recirculación constantes, mientras un 30% es extraído del gabinete por medio de un pleno común. En el tipo B1 30% del aire es recirculado y 70% es extraído directamente fuera de la zona de trabajo a través del ducto, al exterior. Finalmente en los gabinetes B2 100% extracción no hay recirculación. Todo el aire es extraído directamente del área de trabajo fuera del gabinete.

GABINETES CLASE II - TIPO A

En los gabinetes Clase II Tipo A, tales como Sterilgard , 30% del aire se extrae del filtro HEPA de extracción mientras el restante 70% se recircula a través del filtro HEPA de inyección al área de trabajo. La cortina de aire inducida, que impulsada luego por el ventilador se bifurca en aire en flujo laminar sobre la mesa de trabajo, mientras que el resto es extraído por el filtro HEPA.

La salida de patógenos es evitada en la parte del frente del equipo por la cortina de aire, la que al mismo tiempo evita la entrada de aire contaminado a la zona de trabajo. En ambos equipos el volumen total de aire es impulsado por el motoventilador al pleno. En el mismo, el aire se bifurca evacuándose un 30% a través del filtro HEPA de salida, entrando nuevamente al aire ambiente libre de partículas, o expulsado al exterior del edificio por medio de conductos. El restante 70% del aire es impulsado a través del filtro HEPA de inyección y entra al área de trabajo estérilmente en régimen laminar.

Los equipos Tipo A pueden tener la extracción del aire a través del filtro HEPA de salida al interior del laboratorio o al exterior. Esto se indica en la Figura 10 donde se ven ambos casos. El esquema de la izquierda muestra un equipo con salida al interior del laboratorio mientras que el de la derecha muestra el mismo equipo con el filtro de salida conectado a una transición que lo une al conducto hacia el exterior.

EQUIPO CLASE II - TIPO B1

Como se ha visto anteriormente, el gabinete Tipo B1 clásico, extrae el 70% del aire, recirculando solamente el 30% del mismo.

Además este gabinete incluye en su diseño tres elementos particulares, a saber:

§ 1. Todo el aire de extracción es tomado directamente de la zona de trabajo y llevado por medio de un conducto al sistema de extracción central del edificio al exterior, mediante un ventilador centrífugo situado en el techo.

§ 2. El 30% del aire recirculado es filtrado a través de un filtro HEPA inmediatamente debajo de la superficie de trabajo antes de ser recirculado.

§ 3. Todo el aire no filtrado fluye al gabinete bajo presión negativa. Todas las áreas de presión positiva están libres de partículas debido a la ubicación del filtro de inyección.

EQUIPO CLASE II - TIPO B2

El segundo tipo de los gabinetes Clase II tipo B es de 100% de extracción total. Este tipo de gabinete es ampliamente utilizado en toxicología y en aplicaciones similares, en las cuales efluentes con productos químicos en fase gaseosa se encuentran presentes, pero el aire debe mantenerse en condiciones extremas de limpieza en cuanto a partículas.

Como su nombre lo indica el 100% del caudal de aire que pasa a través del gabinete va al exterior o donde el aire no origine riesgos. No hay recirculación del aire dentro del gabinete.

El aire entra a través de un motoventilador en el gabinete y pasa a través de un filtro HEPA al área de trabajo en régimen laminar vertical. El aire desciende hasta la mesa de trabajo de donde sale a un sistema separado de extracción para el tratamiento apropiado. Simultáneamente el aire que entra al gabinete por la reja perforada del frente es inmediatamente llevando al sistema de extracción.

GABINETES CLASE II - TIPO B3

Son gabinetes que tienen un 70% de aire en recirculación y 30% de extracción, razón por la cual no son aptos para trabajos con generación de vapores o gases. Su

construcción es prácticamente igual a los equipos Clase II Tipo A. su única diferencia con ellos es que mientras los equipos tipo A pueden ser con extracción al interior del laboratorio, los Clase II Tipo B3 son únicamente aplicados para tener la salida al exterior del edificio.

USO DE LOS GABINETES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA CLASE II

Recordamos que los gabinetes de seguridad biológica Clase II se diseñaron para evitar el escape de patógenos de la zona de trabajo al ambiente del operador, así como para mantener el material y los cultivos libres de la contaminación ambiental. Estos equipos son un elemento importantísimo en la mayoría de los experimentos con material biológico.

La salida de patógenos al exterior de la mesa de trabajo es evitada por la cortina de aire que circula por la abertura frontal hacia la reja perforada perimetral de la mesada y por la acción del filtro HEPA de extracción.

La cantidad de aire que entra por la reja de entrada es igual a la cantidad de aire extraída a través del filtro HEPA de salida.

La contaminación del área de trabajo, por otro lado, es evitada por la acción del flujo laminar originado en el filtro de inyección.

El aire fluye en régimen laminar hacia la mesa de trabajo y, amén de producir un área limpia, barre los contaminantes generados por la actividad dentro del gabinete.

El aire continúa su recirculación por el ventilador hacia el pleno. Los aerosoles se eliminan por los filtros HEPA a medida que el aire retorna hacia la zona de trabajo.

Para utilizar adecuadamente este equipamiento es fundamental el manejo óptimo de los materiales, y minimizar la actividad por una estudiada secuencia de operaciones, procurando eliminar todo movimiento innecesario, para bajar a un mínimo las turbulencias y generación de aerosoles.

CERTIFICACION

El primer paso al instalarse un equipo de Seguridad Biológica Clase II, consiste en certificarlo, ya sea en cuanto a la integridad del gabinete y su estanqueidad, así como en el ensayo de integridad y la eventual reparación en caso de que hubiera pérdidas de los filtros HEPA. Además debe medirse la uniformidad de flujo de aire .

PREPARACION DE PROCEDIMIENTOS

Idealmente deberá hacerse una lista de procedimientos a seguir con una adecuada hoja de ruta, anticipándose los movimientos de materiales, equipos y procesos hasta cumplir con la tarea asignada.

Una vez completada la lista de trabajos se comienza la operación prendiéndose las luces, poniendo en marcha el ventilador, chequeando que las rejillas perforadas estén sin obstrucciones y permitiendo el funcionamiento del equipo por unos 15 minutos. Algunos gabinetes están equipados con lámparas ultravioletas que deben apagarse cuando el personal del laboratorio está ocupando el mismo. La acción bactericida de las lámparas ultravioletas se efectúa cuando el gabinete está fuera de operación, aunque se considera de la mayor importancia la desinfección de las superficies interiores del mismo por lavado de éstas con una solución de alcohol al 70%.

Los operadores deberán lavarse cuidadosamente manos y brazos, antes y después del trabajo en el gabinete.

Se recomienda además que los operadores utilicen guantes de goma con los puños del delantal de magas largas, ceñido a las muñecas. No se aconseja el uso de delantales de algodón, sino los de fibra sintética. Lo antedicho baja a un mínimo el peligro de que la flora de la piel contamine el área de trabajo y protege manos y brazos de la contaminación de agentes peligrosos.

Resumiendo los procedimientos de preparación de los gabinetes de seguridad biológica, tendremos que considerar:

Certificación de integridad de los filtros HEPA, balance de la cortina de aire, verificación de la velocidad de desplazamiento del aire y certificación de estanqueidad del gabinete.

§ 2. La preparación de los procedimientos y la hoja de ruta para minimizar los movimientos son fundamentales para una buena disposición de los materiales y productos a ser usados en la experiencia.

§ 3. El procedimiento de puesta en marcha consiste en prender las luces, verificar que las rejillas de aire de entrada y extracción no estén obstruidas y la puesta en marcha del ventilador. Deberá permitirse operar al ventilador por un mínimo de 5 minutos antes de dar comienzo a las operaciones dentro del gabinete.

§ 4. Una vez colocados materiales y productos dentro del gabinete sin que ninguno de estos obstruya el paso de aire generando turbulencias sobre los elementos críticos, y disponiéndolos de manera tal que las operaciones planeadas previamente se puedan hacer con comodidad, se dejará el gabinete en funcionamiento por alrededor de 5 minutos para permitir la eliminación de aerosoles que pudieran encontrarse dentro del mismo.

§ 5. Es importante que se disminuyan a un mínimo los movimientos del personal y equipos en la cercanía del gabinete, así como la posibilidad de corrientes de aire provocadas por las puertas y ventanas abiertas. Es recomendable que tanto los equipos Clase II como los equipos de Flujo Laminar común estén dispuestos en zonas del laboratorio lo más alejadas posibles de las puertas de acceso y del movimiento del personal.

§ 6. Todo movimiento es nocivo tanto dentro del gabinete como para la cortina de aire del mismo, por lo que tanto se insiste en el planeamiento adecuado para evitar movimientos innecesarios.

Cada vez que brazos o manos se introducen con material al gabinete existe peligro de escape o entrada de aerosoles, lo que se evita con movimientos muy lentos y pausados del operador.

La norma de la National Sanitation Foundation N.S.F. 49 especifica velocidades de la cortina de aire de 0.38 m/seg. (75 pies min.) para los equipos B1, B2, B3. Asimismo se recomienda una altura de la apertura por donde se introducen las manos de no más de 20 cm (8").

§ 7. La eficiencia de la cortina de aire de un equipo Clase II. Para ello un tubo de acero introducido en el gabinete simula la acción de un brazo del operador, mientras dos

tomadores de muestras biológicas ubicados en el exterior, verifican que no haya salida de aerosoles generados en el interior del gabinete. Al mismo tiempo, placas de Petri ubicadas en el interior, verifican la falta de penetración de aerosoles portadores de microorganismos provenientes del exterior.

GABINETES DE ALTA SEGURIDAD CLASE III

Los gabinetes Clase III, originariamente llamados "cajas de guantes" por sus características constructivas, son gabinetes herméticos en los que el trabajo se efectúa por medio de guantes. Tienen filtros HEPA de inyección y de extracción en régimen turbulento.

El ambiente interior del gabinete se encuentra con una presión negativa con respecto al ambiente exterior de 12.5 mm de columna de agua, para prevenir el escape de aerosoles en caso de que hubiera una fisura accidental.

Se utilizan típicamente para trabajos con cultivos de agentes patógenos de alto riesgo o con virus exóticos, entre ellos: Fiebres Hemorrágicas, Lasa, Ebola y Agentes Infecciosos clasificados como clase 4 por el CDC (Center for Disease Control, Office of Biosafety).

Los gabinetes Clase III proveen una barrera física total entre ambientes y operador. Se utilizan actualmente no sólo en la prevención de la contaminación del operador y del ambiente, sino también como aisladores para llenado aséptico de productos farmacéuticos. En este último caso, tratándose de llenado estéril de productos farmacéuticos la presión interior es negativa o positiva dependiendo de si debe mantenerse al ambiente de producción libre de polvo que se procesa o si se aísla una llenadora de líquidos inyectables.

La manipulación de los elementos en el interior del gabinete se hace por medio de guantes, lo que hace imposible la contaminación por contacto. Los sistemas Clase III son imprescindibles en el control de contaminantes de alto riesgo y los generados por manipuleo, pesaje y dilución de carcinógenos químicos. También es necesaria su aplicación cuando se trabaja con altas concentraciones de agentes de riesgo moderado o riesgo desconocido.

Los sistemas Clase III cumplen con la máxima seguridad, el doble compromiso de salvaguardar el producto del contaminante exterior, y al exterior del producto, evitándose la contaminación del ambiente de laboratorio y del personal. Un sistema de Clase III puede ser construido para aislar incubadoras, congeladoras centrífugas y otros materiales de investigación.

Autoclaves de doble puerta se conectan a los sistemas para la esterilización de productos, tanto al introducirse o al extraerse del sistema.

Debe ponerse especial cuidado en el control periódico de la integridad de los filtros HEPA y su eventual sellado, así como el control de la hermeticidad de los gabinetes. Es práctica común la utilización en la extracción de dos filtros HEPA en serie, uno en el gabinete y otro en el conducto de extracción.

Como se mencionó anteriormente, los equipos Clase III se están usando en la industria farmacéutica para la aislación de procesos de fraccionamiento o envasado estéril. En otras palabras, se los utiliza con el nombre de "Isolators" (aisladores) en procesos de producción aséptica.

En una línea de llenado aséptico de líquidos inyectables estériles, aunque el trabajo por medio de guantes es relativamente incómodo, la mayor ventaja de estos equipos es que se hace prácticamente imposible la contaminación por contacto.

Por otro lado, no habiendo introducción de posibles contaminantes, la circulación del aire por filtros HEPA en régimen no laminar es suficiente, manteniéndose la presión positiva en este caso.

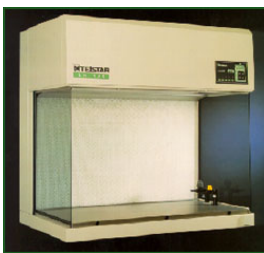
En este caso, la presión es negativa dentro del gabinete para proteger al personal y al medio ambiente del producto. Tiene agregado un túnel de entrada de viales bajo radiación UV y valida por abertura de los viales ya llenados y cerrados.

Otro aporte:

Los diferentes tipos de cabinas de flujo laminar se diseñan con diferentes propósitos:

- a. **Protección personal:** protección del personal de los posibles agentes dañinos del interior de la cabina.
- b. **Protección del producto,** experimento o cultivo que se encuentra en el interior de la cabina de los contaminantes exteriores o de la contaminación cruzada con otros productos o cultivos situados en la misma cabina.
- c. **Protección medioambiental :** evitar la salida al medio ambiente de productos o agentes contaminantes.

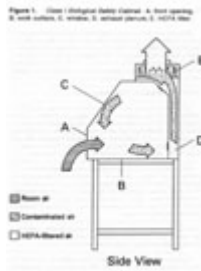
Las cabinas de flujo laminar horizontal son muy adecuadas para una buena protección del producto, pero no son adecuadas para el trabajo con materiales peligrosos o con algún tipo de riesgo pues el operador queda completamente expuesto. En las cabinas de flujo vertical, más sofisticadas, se asegura una buena protección del producto, y, dependiendo de su diseño se puede asegurar una protección total del operador. Son por ello más adecuadas para el trabajo con agentes peligrosos.



Dependiendo de la importancia que se le conceda a cada uno de estos factores en el diseño de la cabina se trata de cabinas de clase I, II o III.

1. Cabina de clase I.

Se trata de una unidad de contención parcial adecuada para la manipulación de agentes de bajo riesgo, donde existe una necesidad de protección del operario y del medio pero no del producto. Este es el tipo de cabinas normalmente denominadas "de gases", y no son de uso común en el laboratorio de cultivo de tejidos. Figura de "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edit, CDC (Center for Disease Control) / NIH (National Institutes of Health), p. 142.



2. Cabina de clase II.

Este tipo de cabinas protegen el producto, al personal y al medio ambiente. En general las cabinas de clase II se describen como un equipo de protección con un panel frontal de acceso y que mantienen un flujo laminar estable en el interior, con una filtración HEPA para el aire recircularizado en cada ciclo y una filtración HEPA del aire exhausto (de salida al medio). Los sucesivos diseños que se han realizado para cubrir necesidades diferentes permiten clasificar asimismo las cabinas de tipo II en tres subclases :

a. **Tipo A.** En este tipo (figura 2.3.B) el 30 % del aire es eliminado en cada ciclo y el 70 % es recircularizado. El escape al medio de los agentes potencialmente peligrosos se previene mediante una corriente de aire entrante en una rejilla frontal.

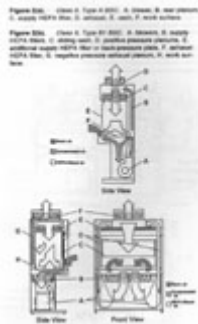
b. **Tipo B.** Se trata de una cabina de flujo laminar para uso general (figura 2.3.C), y en ella se recirculariza sólo el 30 % del aire en cada ciclo, eliminándose el 70 % del aire restante.

c. **Tipo 100 % exhausto.** Se trata de una cabina en la que el 100 % del aire de cada ciclo es eliminado hacia dispositivos que puedan retener los posibles agentes peligrosos (figura 2.3.D). Este tipo de cabinas se emplean fundamentalmente en laboratorios de toxicología en los que se requieren áreas de contención limpias y eliminación del aire posiblemente contaminado.

Las diferencias entre estos tres subtipos se refieren especialmente a la protección del usuario, superior en el caso del tipo A, y a la eliminación de la cabina de posibles contaminaciones de tipo aerosol, no retenibles por el filtro HEPA. La tipo A, que es la más adecuada para el trabajo con agentes patógenos particulados (filtrables) es la menos adecuada para el trabajo con vapores o aerosoles peligrosos.

Asimismo se ha de tener en cuenta que el funcionamiento correcto para la protección del producto y del personal depende de una correcta calibración del instrumento, especialmente de las velocidades respectivas de entrada de aire en el sistema y de flujo vertical. El punto de calibración o ajuste es dependiente del instrumento y debe ser realizado por personal especializado cada 6 a 9 meses de funcionamiento para asegurar la protección al usuario.

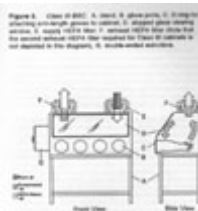
Figura de "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edit, [CDC](#) (Center for Disease Control) / NIH (National Institutes of Health), p. 143.



3. Cabina de clase III.

Se trata de una cabina de seguridad, estanca, para el trabajo con agentes biológicos de alto riesgo. Permite mantener al agente patógeno en un ambiente completamente estanco. Permiten controlar tanto los contaminantes particulados como aerosoles y contaminantes gaseosos mediante sistemas de filtración y disolución de éstos.

Figura de "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edit, [CDC](#) (Center for Disease Control) / NIH (National Institutes of Health), p. 145.



Para garantizar el funcionamiento adecuado de estas áreas se deben realizar controles físicos y microbiológicos.

Controles físicos: se realizan con el fin de garantizar que estos parámetros están dentro de las especificaciones, incluyen:

- _ Temperatura
- _ Humedad
- _ Recuento de partículas
- _ Velocidad del aire
- _ Integridad de los filtros HEPA
- _ Presión del Área

Controles microbiológicos: se realizan con el fin de determinar la cantidad de microorganismos en el aire y en las superficies del área, lo cual influye sobre la calidad microbiológica de los productos elaborados en la misma.

La evaluación de la calidad microbiológica del aire puede realizarse mediante:

Métodos activos: Utilizan dispositivos para tomar un volumen definido de aire y luego determinar las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes en él. Un ejemplo de estos dispositivos es el Dispositivo Centrífugo de Reuter, el cual tiene una turbina que aspira el aire y hace que las partículas impacten sobre una tira de agar colocada en la pared interna de la turbina. Es portátil y funciona con baterías.

Dispositivo Centrífugo de Reuter (RCS)



_ Sedimentación en placas de Petri: es uno de los métodos más utilizados para determinar la calidad microbiológica del aire. Las placas contienen un medio nutritivo sólido. Se exponen un tiempo determinado en sitios establecidos y luego se incuban. En este método los microorganismos viables presentes en el aire, son llevados a la superficie del medio sólido por las corrientes de aire presentes en el área.

Es un método fácil de realizar y económico que nos permite obtener información sobre los microorganismos capaces de sedimentar del aire.

La evaluación de la calidad microbiológica de las superficies puede realizarse mediante:

_ Placas de contacto (RODAC): Son placas llenas con un medio nutritivo sólido con una superficie convexa que se presionan sobre la superficie plana a evaluar. Se utiliza para superficies planas.

Placa RODAC



_ Hisopos: El hisopo humedecido se frota, en tres direcciones, sobre un área predeterminada, luego se coloca en un diluyente para liberar los microorganismos presentes y de allí se toma una alícuota y se siembra en un medio sólido. Se utiliza para superficies irregulares o de difícil acceso.