

Microbiologische veiligheidswerkkasten

Federale Overheidsdienst (FOD) Volksgezondheid, Veiligheid van de
Voedselketen en Leefmilieu



Team Contained use, Afdeling Bioveiligheid en Biotechnologie
Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid

Koninklijke bibliotheek van België, depotnummer : **D/2006/2505/20**
28 Maart 2006

Auteurs: **Dr. P. Herman**
Dr. Ir. K. Pauwels

Afdelingshoofd dd: Dr. Ir. Myriam Sneyers

Waarschuwing: De inhoud van dit document werd gebaseerd op beschikbare literatuurgegevens, ze dienen als aanbevelingen te worden beschouwd en zijn niet bindend of normatief.

Microbiologische veiligheidswerkkasten

Inhoudsopgave

1. Inleiding

2. Algemeenheden, definities, en technische karakteristieken

- 2.1. De MVK klasse I**
- 2.2. De MVK klasse II**
- 2.3. De MVK klasse III**

3. Keuze van een microbiologische veiligheidswerkkast

4. Gebruik van een microbiologische veiligheidswerkkast

- 4.1. Plaats van de MVK**
- 4.2. Procedure van in werking stellen en stopzetten van MVK**
- 4.3. Onderhoud en "waarmerking"**
- 4.4. Het accidenteel morsen ("Spills")**
- 4.5. Reiniging en ontsmetting**
- 4.6. Decontaminatie**
- 4.7. Persoonlijke beschermingsmiddelen**
- 4.8. Alarm**

5. Referenties en nuttige weblinks

Bijlage 1: Absoluut filter met hoge efficiëntie

Bijlage 2: Ultraviolet lampen

1. Inleiding

Een microbiologische veiligheidswerkkast (MVK) is bij de meeste onderzoeks- en microbiologische laboratoria en laboratoria van de farmaceutische industrie een veel voorkomende veiligheidsuitrusting. Het algemeen doel van deze webpagina's is een overzicht te geven van de verschillende bestaande types MVK's, ook "microbioveiligheidsposten" genoemd, aan laboratoriumverantwoordelijken, studenten en het laboratoriumpersoneel. De beschrijving van deze alsook de gebruiksvorschriften voor de personen die pathogene en/of genetisch gemodificeerde micro-organismen manipuleren zijn het onderwerp van de pagina's waarnaar hieronder wordt gerefereerd.

2. Algemeenheden, definities, en technische karakteristieken

Microbioveiligheidswerkkasten (MVK's) zijn manipulatieluimtes die de bescherming van de proefnemer en het leefmilieu verzekeren bij manipulaties die mogelijk infectieuze aerosols kunnen genereren. Deze dienen te worden ontworpen, aangemaakt en te voldoen aan prestatie-eisen en moeten gewaarmerkt zijn op basis van tenminste een van kracht zijnde internationale norm.

Drie klassen van MVK's worden onderscheiden: De MVK klasse I, de MVK klasse II en de MVK klasse III.

2.1. MVK klasse I: manipulatieluimte die vooraan gedeeltelijk open is en aldus ontworpen dat een aanzuigstroom een onderdruk teweebrengt en daardoor grotendeels verhindert dat aerosols die binnen deze ruimte ontstaan uit, deze ruimte kunnen ontsnappen. De luchtcirculatie is te vergelijken met deze van een chemische trekkast. Nochtans moet de lucht die bovenaan uitgestoten wordt ten minste via één HEPA-filter gefilterd worden. De instromende lucht heeft een gemiddelde snelheid tussen 0,7 en 1 m/sec en is niet gefilterd. Deze veiligheidswerkkast verzekert de bescherming van de proefnemer en van de omgeving maar niet deze van het behandelde monster. De voorzijde bestaat uit een doorzichtige wand die een vaste opening afbakt van 20 - 25 cm. De afgevoerde lucht mag terug in omloop gebracht worden in het labo of naar buiten geëvacueerd worden.

2.2. MVK klasse II: manipulatieluimte die vooraan gedeeltelijk open is en waarin een neerwaartse verticale steriele laminaire luchtstroom ontwikkeld wordt. Ze is dusdanig gebouwd dat dank zij een onderdruk die vooraan een luchtstroom creëert (zogenaamde lucht-barrière), grotendeels verhindert wordt dat aerosols die binnen deze ruimte ontstaan, uit deze ruimte kunnen ontsnappen. De verticale laminaire luchtstroom die door de werkruimte geleid wordt, wordt langsheen het werkoppervlak aangezogen of gaat doorheen het werkoppervlak ingeval het geperforeerd is. De lucht die bovenaan uitgestoten wordt, moet tenminste via één HEPA-filter gezuiverd worden en mag rechtstreeks in het laboratorium of via een uitstootstroom naar buiten worden uitgestoten. Deze veiligheidswerkkast verzekert de bescherming van de proefnemer, de omgeving en het behandelde monster. De Europese norm met betrekking tot de criteria voor de prestatie-eisen van microbioveiligheidswerkkasten (norm EN12469) voorziet bepalingen voor de bescherming van het leefmilieu.

Bijkomende informatie: de manipulatieluimte wordt voorzien van een gefilterde luchtstroom (absoluut filter), die uniform en éénrichtingsgewijs gericht is naar onderen. De laminariteit van de stroom wordt verzekerd door de afmetingen van de manipulatieluimte, door de ruimte die onder overdruk staat en de filter voorafgaat, en door een homogene verdeling van de snelheid van de luchtstroom : 0,4 m/s $\pm$ 20% op elk vlak. De luchtstroom wordt door middel van de aanzuigbanden voor en achter het werkoppervlak terug aangezogen, vervolgens via de ventilator naar de ruimte in overdruk geblazen en wordt tenslotte naar de uitstootfilter of opnieuw naar de manipulatieluimte gevoerd na filtratie.

De verlichting bevindt zich buiten de werkruimte teneinde de laminaire flux niet te verstoren. De snelheid van de laminaire lucht is tussen 0,25 en 0,45 m/sec (ideaal 0,40 m/sec) en deze van de binnenkomende luchtstroom tussen 0,38 en 0,70 m/sec (ideaal 0,50 m/sec). De voorkant bestaat uit een schuifraam, vast of afneembaar, bestaande uit veiligheidsglas en met een opening van 20 - 25 cm tijdens de manipulaties. In tegenstelling tot microbioveiligheidswerkkasten klasse I is het behandeld monster beschermd van kruisbesmettingen die kunnen voortkomen als gevolg van de manipuleringsruimte door de gefilterde verticale laminaire luchtstroom en van externe besmettingen door het feit dat de vooraan binnenkomende lucht onmiddellijk wordt gevangen door de openingen die vooraan het werkoppervlak geplaatst zijn. Afhankelijk van het gekozen model zullen microbioveiligheidswerkkasten uitgerust zijn met één of twee motoventilators en UV lampen.

Type MVK klasse II : type A en B

- Bij MVK's type IIA wordt de potentieel besmette lucht zonder filtratie overgebracht naar het bovengedeelte en de ventilator. Naar gelang de plaats van de ventilator zal bij bepaalde uitvoeringen de naar het bovengedeelte gerichte luchtleiding in overdruk staan waardoor lekken van besmette lucht kunnen ontsnappen in het laboratorium of in de manipulatie ruimte (af te raden uitvoering). Bij andere uitvoeringen is de luchtleiding in onderdruk waardoor luchtlekken worden vermeden.
- Bij MVK's type IIB vervoert de luchtleiding enkel gefilterde lucht en is deze in onderdruk. Het voordeel dat deze MVK's van klasse II type B bieden, schuilt in het feit dat deze de manipulatie van vluchtige en toxische stoffen toelaat.

2.3. MVK klasse III: Deze veiligheidskast verzekert de hoogste bescherming van de proefnemer en wordt gebruikt voor de manipulatie van micro-organismen van risicoklasse 4. Alle toegangswegen zijn verzegeld teneinde deze luchtdicht te maken. Binnenkomende lucht wordt via een HEPA filter gefilterd en de buitengaande lucht gaat tevens via HEPA filters. De luchtstroom wordt verzekerd door een externe evacuatiesysteem, wat een onderdruk de veiligheidskast veroorzaakt (200 Pa aangeraden door de norm EN 12469). Het werkoppervlak is toegankelijk via dikke uit rubber vervaardigde handschoenen die aan de openingen van de veiligheidskast zijn vastgehecht. De MVK van klasse III moet voorzien zijn van een doos die doorheen de veiligheidskast kan gebracht worden. Deze moet kunnen worden gesteriliseerd en is uitgerust met een HEPA filter. In afwezigheid van deze doos moet de microbioveiligheidskast kunnen worden aangesloten aan een doorgeefautoclaaf teneinde het materiaal dat in de MVK wordt geplaatst of deze verlaat, te ontsmetten. MVK's van klasse III zijn geschikt voor manipulaties in laboratoria van inperkingsniveau 3 en 4.

Bijkomende informatie: Pascal (Pa) is de eenheid van druk volgens het internationaal systeem¹. De druk staat voor het gewicht van een fluïdum (lucht, water of vaste stof). Voor de druk worden zonder onderscheid zowel pascal als bar gebruikt en in minder mate millimeter kwik. Definitie in de mechanica van vloeistoffen: druk die op een vlakke oppervlakte van 1 vierkante meter een totale kracht van 1 Newton uitoefent. Uniforme druk, die loodrecht op een vlakke oppervlakte van 1 vierkante meter een totale kracht van 1 Newton uitoefent.

3. Keuze van een microbiologische veiligheidskast

Alvorens de keuze te laten vallen over de klasse van een microbiologische veiligheidskast (MVK) dient een evaluatie van de biologische risicoklasse te worden uitgevoerd teneinde de risicoklasse

¹ 1 Pa = 1 Newton/m². 1 millibar (mbar) = 1 hecto pascal (hpa). De atmosferische druk op zeepiegelniveau is gemiddeld 1013 mbar of 760 mm kwik.

(risiconiveau) van de activiteit te bepalen. De type van MVK zal afhangen van de biologische risicoklasse van de gemanipuleerde micro-organismen, van de aard van de geplande manipulaties en de noodzaak om het biologisch materiaal al dan niet te beschermen. De klasse van MVK (I, II of III) is niet rechtstreeks verbonden aan de geplande risicoklasse (risiconiveau) van de activiteit.

In praktijk dient een MVK te worden gekozen in functie van de vereiste bescherming : bescherming van het "product" en/of bescherming van het personeel tegen al dan niet genetisch gemodificeerde micro-organismen van klasse 1 tot 4. De bescherming van het personeel tegen vluchtige en toxische bestanddelen en radionucliden of een combinatie hiervan dient te worden overwogen. In ieder geval zal de bescherming van het leefmilieu worden verzekerd. **Tabel 1** geeft een overzicht van het aanbevolen type MVK voor elk gebruik. Meestal zijn de MVK's uitgerust met een UV lamp.

Tabel 1: De verschillende klassen van MVK's en het type van de geboden bescherming

Klasse van MVK		Bescherming		
		Gemanipuleerd biologisch materiaal	Proefnemer	Leefmilieu
Klasse I	Trekkast	✗	✓	✓
Klasse II	A1, A2	✓	✓	✓
	B1, B2			
Klasse III	"handschoenendoos"	✓	✓	✓

Voorbeelden van gebruik van MVK (pathogene organismen en inperkingsniveau)

- Het gebruik van een MVK klasse I of II wordt aanbevolen voor manipulaties met betrekking tot de primo-identificatie en identificatie van de soorten van het *M. tuberculosis* complex. (zie: <http://www.biosafety.be/CU/ClinLab/ClinLabNL.html>)
- De manipulatie van celculturen (zie: <http://www.biosafety.be/CU/animalcellcultures/mainpage.html>)
- De manipulatie van recombinante adenovirussen (zie: <http://www.biosafety.be/CU/Annexes/virNL.html#P21>)
- De productie van recombinante lentivirale vectoren (zie: <http://www.biosafety.be/CU/Annexes/virNL.html#P23>)

Gebruik van MVK met verschillende inperkingsniveau:

- Het gebruik van een MVK is niet vereist in een laboratorium met inperkingsniveau L1, noch in een animalarium van inperkingsniveau A1.
- Het gebruik van een MVK (klasse I of II) is optioneel (kan al dan niet worden vereist in functie van een geval per geval - specifieke evaluatie) in een laboratorium met inperkingsniveau L2, of in een animalarium inperkingsniveau A2.
- Het gebruik van een MVK (klasse I of II) is vereist in een laboratorium met inperkingsniveau L3, of in een animalarium met inperkingsniveau A3.
- Het gebruik van een MVK (klasse III, indien klasse II : isolerend pak dat onder positieve druk staat) is verplicht in een laboratorium met inperkingsniveau L4, of animalarium met inperkingsniveau A4.

Opmerking: De horizontale of verticale flux ("clean-air work stations", chemische trekkasten, enz.) is geen MVK en mag in geen geval als dusdanig worden gebruikt.

4. Gebruik van een microbiologische veiligheidswerkkast

Dit zijn enkele aanbevelingen, gebaseerd op het gezond verstand, met betrekking tot de voorzorgsmaatregelen bij gebruik van een MVK klasse II, die het meeste voorkomt in onderzoeks- en microbiologische laboratoria en laboratoria in de farmaceutische industrie. Deze aanbevelingen worden in **Tabel 2** weergegeven onder de vorm "doen" / "niet doen". Deze lijst is niet exhaustief maar somt de cruciale punten op. De proefnemer speelt een doorslaggevende rol bij zijn/haar eigen bescherming en deze van het materiaal die hij/zij behandelt. Deze aanbevelingen hernemen niet de "goede microbiologische praktijken" noch de opleiding van het personeel die wel essentieel zijn maar buiten het kader van deze pagina's vallen.

Tabel 2 : "Doen/ niet doen" tijdens het gebruik van een MVK

"Doen"	"Niet te doen"
De verschillende klassen van MVK goed onderscheiden alvorens gebruik	Geen recipiënt buiten de MVK plaatsten voor het verwijderen van pipetten of elk ander materiaal dat potentieel besmet is tijdens de manipulaties
Kennis nemen van de werking van een MVK alvorens er gebruik van te maken	De verluchttingsroosters niet belemmeren met papier of elk ander voorwerp
Plannen van de manipulaties (materiaalbenodigdheden, volgorde van manipulaties) teneinde het doorgeven van materiaal (in - en uitgaand) te vermijden tijdens de werking van de MVK	Indien de MVK uitgerust is met een UV lamp : de UV lamp niet aanschakelen tijdens het gebruik van de MVK
De procedure voor in werking stellen en stopzetten van de MVK naleven	Geen snelle in- of uittrekkende gaande bewegingen met de handen of de voorarmen uitvoeren in de MVK
Gebruik van een microbrander (elektrische bunsenbrander) eerder dan een vlam die de luchtstroom binnen de MVK zou verstoren.	Geen documenten plaatsen op het venster van de MVK teneinde het zicht van de proefnemer niet te verhinderen
Voor en na de manipulaties dienen de handen en de voorarmen te worden gewassen met een kiemdodend detergent	Deuren of vensters van het laboratorium niet openen of sluiten teneinde luchtverplaatsingen te vermijden die organismen zouden toelaten om doorheen de luchtbarrière van de MVK te geraken.
Zorg voor het vrijlaten van de luchtroosters en voer de manipulaties uit in het midden van de werkzone	Geen materiaal (pipetten, dozen, flessen, enz.) buiten de MVK plaatsen dat tijdens de geplande activiteit moet worden gebruikt

4.1. Plaats van de MVK

De keuze van de lokalisatie van de MVK is uiterst belangrijk om de goede werking ervan te verzekeren. Ideaal gezien moet een MVK op een afstand gelegen zijn van luchtverplaatsingen en luchtstromen (tocht) teneinde de binnenkomende luchtstroom (gemiddeld 0.45 m/s) niet te verstoren. Een ruimte van minstens 0.30 tot 0.35 rondom de MVK (achteraan en op de zijkanten) wordt vrijgehouden om de doorgang te vergemakkelijken ingeval van onderhoud. Een ruimte van minstens 0.30 tot 0.35 m boven de MVK is vereist om een gemakkelijke meting toe te laten van de snelheid van de uitgestoten lucht en een vlotte vervanging van de uitstootfilters te vergemakkelijken.

Tabel 3 geeft enkele aanbevolen minimale afstanden weer tussen 1) de voorkant van de MVK en andere uitrustingen en 2) tussen het uiteinde van de MVK en een hindernis.

Tabel 3 : aanbevolen minimale afstanden

Tussen de voorkant van de MVK en :	Tussen het uiteinde van de MVK en :
een gewone doorgang : 1 m	een muur of een hindernis loodrecht aan de MVK : 0.30 m
een laboratoriumtafel parallel aan de MVK: 1.5 m	een zuil geplaatst aan de voorkant van de MVK : 0.30 m
een tegenoverstaande muur (of elk andere hindernis) : 2 m	een deur in een muur parallel aan de MVK: 1 m
een deur in een muur loodrecht aan de MVK : 1.5 m	
Voorkant van een andere MVK: 3 m	

De effecten van de ventilatie van het lokaal (air-conditioning, luchtbewegingen) op de werking van een MVK en de daardoor veroorzaakte turbulenties in de MVK werden bestudeerd (Rake BW, 1978, Clarck RP, 1990).

Er wordt aangeraden om alle andere activiteiten te beperken in het lokaal tijdens het gebruik van een MVK. Deze activiteiten zouden de luchtdoorstroming in de MVK kunnen verstoren.

4.2. Procedure van in werking stellen en stopzetten van MVK

Een MVK dient niet noodzakelijk 24u/24u te werken, dit kan de levensduur van de HEPA filters verkorten.

Alvorens een MVK te gebruiken

- Indien de MVK uitgerust is met UV lampen, nagaan of deze zijn uitgeschakeld;
- Aanzetten 15/20 minuten alvorens elke manipulatie;
- Zich vergewissen of geen enkel voorwerp de luchtroosters belemmert;
- Indien de MVK voorzien is van een alarm, dit aanzetten;
- Ontsmetten van de binnenkant van de MVK;
- Het materiaal erin plaatsten dat zal nodig zijn voor de manipulatie;
- Indien nodig, het "vuile" materiaal scheiden van het "propere".

Stopzetting van de MVK bij het beëindigen van de manipulatie

- Sluiten van proefbuizen, flessen en dozen alvorens deze uit de MVK te halen;
- De buitenkant van de voorwerpen in de MVK ontsmetten alvorens deze uit de MVK te halen;
- Ontsmetten van de binnenoppervlakken van de MVK;
- Laat de MVK gedurende 5/10 minuten werken alvorens deze stop te zetten.

4.3. Onderhoud en "waarmerking"

De vervanging van HEPA filters verdient bijzondere aandacht. Deze taak wordt uitgevoerd als gevolg van een alarmsignaal (indien de MVK voorzien is van een alarm) of bij een verlies van lading van de betrokken filter (wordt gemeten aan de hand van een manometer). Indien de assemblage van de filters- dat zoals voorzien door de fabrikant- de veiligheid van het personeel niet verzekert, zal de vervanging van de filters moeten worden voorafgegaan door een fumigatie.

Een periodieke controle van de MVK door de fabrikant of door een gespecialiseerde firma wordt aanbevolen. Meestal bestaat deze controle uit een visualisatie van de luchtdoorstroming in de opening van de MVK en een meting van de snelheid en de "netheid" van de lucht in de neerwaartse luchtstroom. Zoals bepaald door de norm EN 12469 wordt een controle van de prestatie-eisen van de MVK op jaarlijkse basis aanbevolen.

Elk herstellingswerk op een MVK dient te worden uitgevoerd door daartoe bevoegd personeel. Alle vastgestelde functiestoornissen of afwijkingen dienen te worden gemeld aan de laboratoriumverantwoordelijke en moeten worden hersteld alvorens elk volgend gebruik van de MVK.

4.4. Het accidenteel morsen ("Spills")

Indien accidenteel wordt gemorst in een MVK, dient onmiddellijk te worden gedecontamineerd terwijl de MVK nog steeds in werking is. Een geschikt ontsmettingsmiddel moet worden aangebracht op het werkoppervlak om de vorming van infectieuze aerosols te vermijden. Het materiaal dat in contact is gekomen met de gemorste vloeistof dient te worden ontsmet of geautoclaveerd. Absorberend papier is ter beschikking gesteld in nabijheid van de MVK ("Spill Kit"). Het materiaal nodig voor de decontaminatie evenals een geschreven procedure moeten worden ter beschikking gesteld van het laboratoriumpersoneel.



4.5. Reiniging en ontsmetting

De buitenkant van alle in de MVK aanwezige voorwerpen moeten worden ontsmet wanneer een manipulatie wordt beëindigd (de aanwezigheid van residueel cultuurmedium kan als voeding dienen voor bacteriële groei). De binnenkant van de MVK wordt ontsmet vóór en na elk gebruik. Daarvoor kan een oplossing van javelwater of bij voorkeur 70% ethanol worden gebruikt. Indien een corrosief ontsmettingsmiddel wordt gebruikt moet hierna een reiniging plaats vinden met steriel water.

Opmerking : Voor oppervlakken beveelt de norm EN 12469 het gebruik van ontsmettingsmiddelen aan op basis van fenol, quaternaire ammonium of aldehyden.

Tijdens de ontsmetting wordt aanbevolen om de MVK in werking te houden. De MVK wordt uitgeschakeld minimaal 5 minuten na de ontsmetting teneinde de lucht van de MVK te "zuiveren".

4.6. Decontaminatie

De MVK moet worden gedecontamineerd :

- alvorens de filter(s) (en eventueel de voorfilters) vervangen worden;
- alvorens lekken rondom de filters opgespoord worden;
- na de verplaatsing van de MVK in hetzelfde lokaal of in een ander laboratorium;
- na contact van infectieus biologisch materiaal met ontoegankelijke plaatsen.

De meest voorkomende methode voor decontaminatie is de fumigatie met formaldehyde dampen. Deze decontaminatiemethode voor MVK's dient te worden uitgevoerd door daartoe bevoegd personeel. Fumigatie is nuttig voor het decontamineren van plaatsen die moeilijk bereikbaar zijn door manuele methoden. De norm EN 12469 bepaalt aanbevelingen voor de fumigatieprocedure en de redenen waarvoor deze dient te worden toegepast .

4.7. Persoonlijke beschermingsmiddelen

Persoonlijke beschermingsuitrusting dient te worden gedragen zelfs bij het gebruik van een MVK. Beschermende kleding zal worden aangepast aan de situatie en aan het inperkingsniveau van het laboratorium. Handschoenen worden gedragen zodat de mouwuiteinden in de handschoen zitten en niet omgekeerd. In sommige gevallen kan het dragen van een masker of beschermingsbril worden vereist.

4.8. Alarm

Indien een MVK uitgerust is met een alarm zijn er twee soorten. Een eerste soort verwittigt de proefnemer wanneer de positie van het venster van de MVK slecht gepositioneerd staat. Het volstaat om het venster correct te plaatsen opdat het alarm wordt gestopt. De andere soort verwittigt de proefnemer ingeval van een functiestoornis van de luchtdoorstroming in de MVK. In dit geval is de proefnemer in gevaar en moet het ondernomen werk onmiddellijk worden onderbroken. Het incident wordt aan de laboratoriumverantwoordelijke gemeld.

5. Referenties en nuttige links

Internationale normen

- NBN EN 12469: Biotechnologie - Prestatie-eisen voor microbiologische veiligheidswerkkasten. Eerste editie, S 46. Brussel, Belgisch Instituut voor normalisatie (BIN), 2000.
- NBN EN 12741: Biotechnologie - Laboratoria voor onderzoek, ontwikkeling en analyse - Leidraad voor de praktijk in biotechnologie laboratoria. Eerste editie, indice de classement S 46. Brussel, Belgisch Instituut voor normalisatie (BIN), 1999.
- NF X 44-201: Postes de sécurité microbiologique. Définitions - classification - caractéristiques. Exigences de sécurité. Essais. Paris, La défense, AFNOR, 1996.
- BS 5726: Microbiological safety cabinets. Part 1: Specification for design, construction and performance prior to installation. Part 2: Recommendations for information to be exchanged between purchaser, vendor and installer and recommendations for installation. Part 3: Specification for

performance after installation. Part 4: Recommendations for selection use and maintenance. London, British Standards Institution (BSI), 1992.

- DIN 12950: Teil 10. Laboreinrichtungen. Sicherheitswerkbanke für mikrobiologische und biotechnologische Arbeiten. Anforderungen; Prüfung. Berlin, Deutsches Institut für Normung (DIN), 1991.

- NSF 49: Class II (laminar flow) Biohazard Cabinetry. Ann Harbor, National Sanitation Foundation (NSF), 2002.

Algemeenheden over MVK's

- Laboratory Biosafety Manual, World Health Organization, 3rd Ed. Chapter 10.

- Laboratory Biosafety Guidelines, 3rd Edition, Public Health Agency of Canada, Chapter 9.

- Kruse RH, Puckett WH, Richardson JH. Biological Safety Cabinetry. Clin Microbiol Rev, 1991; 4 (2): 207-241.

- Stuart DG. Hazard Control: Primary Barriers: Biological Safety Cabinets, Fume Hoods and Glove Boxes, in: Biological Safety, Principles and Practices. Third Edition. Fleming DO and Hunt DL ed. ASM Press, Washington DC. 2000. p. 313.

- Anthology of Biosafety, I. Perspectives on Laboratory Design, Chapter 3: Primary Biocontainment devices, American Biological Safety Association, J-Y Richmond, PhD, Editor.

HEPA Filters

- NBN EN 1822-1: Luchtfilters met een hoog rendement (HEPA en ULPA) - Deel 1: Classificatie, prestatieproefing, merken. Eerste editie. Brussel, Belgisch Instituut voor normalisatie (BIN), 1998.

- Harstad JB, Filler ME. Evaluation of air filters with submicron viral aerosols and bacterial aerosols. Am Ind Hyg Assoc J, 1969; 30: 280-290.

- Kruse RH, Kruse CJ. Class II (laminar flow) biological safety cabinets. In situ testing using submicron particulates. p. 46-55. In Humphrey KL (ed.), Proceedings of the 5th Conference of the Canadian Association for Biological Safety. University of British Columbia, Vancouver. British Columbia, Canada.

- First MW, Macher J, Gussman R, Stuart D, Webb T. Nebulizer Characteristics for Certification Tests of Biosafety Cabinets with Bacteria and Simulants. Applied Biosafety J, 1998; 3 (1).

- Wang WH. Validation of the Integrity of a HEPA Filter System. Health Phys, 2003; 85 (suppl 2): 101-107.

Ventilatie

- Rake BW. Influence of Crossdrafts on the performance of a biological safety cabinet. Appl Environ Microbiol, 1978; 36 (2): 278-283.

- Clarck RP, Osborne RW, Pressey DC, Grover F, Keddie JR, Thomas C. Open fronted safety cabinets in ventilated laboratories. J Appl Bacteriol, 1990; 69 (3): 338-358.

Ontsmetting

- Munro K, Lanser J, Flower R. A comparative study of methods to validate formaldehyde decontamination of biological cabinets. Appl Environ Microbiol, 1999; 65(2): 873-876.
- Luftman HS. Neutralization of formaldehyde gas by ammonium bicarbonate and ammonium carbonate. Appl Biosafety J, 2005; 10(2): 101-106.
- Schechmeister IL. Sterilization by ultraviolet irradiation, in: Disinfection, sterilization and preservation, fourth ed; Seymour S. Block, Lea & Febiger editor, 1991, pp. 553-565.
- American Biological Safety Association (ABSA) Position paper on the Use of Ultraviolet Lights in Biological Safety Cabinets.

Nuttige links

- 2nd Edition, Primary Containment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets, U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. September 2000.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bsc/bsc.htm>
- Environmental Health and Safety, University of Kentucky: Using UV Lamps in Biological Safety Cabinets and fact sheet Ultraviolet radiation.
http://ehs.uky.edu/biosafety/uv_cabinets.html
- Op Belgian Biosafety Server: http://www.biosafety.be/CU/ESM/ESM_Menu_NL.html

Bijlage 1

ABSOLUUT FILTER MET HOGE EFFICIËNTIE

Internationale benaming: HEPA FILTER (High Efficiency Particulate Air) ook genaamd "absoluut filter "

Definitie

Een HEPA filter heeft de mogelijkheid om luchtpartikels te weerhouden van een diameter van 0,3 micrometer met een doeltreffendheid van 99,97% (gebaseerd op de DOP test). De MMPS test vervangt de DOP test². Absoluut filter die aan de van kracht zijnde norm voldoet (EN-1822-1, High Efficiency air filters (HEPA and ULPA) - Part 1: classification, performance testing, marking, zie referenties).

Vervaardigingstechnieken

- Techniek van de diepe plooï met scheiding in aluminium (oude techniek).
- Techniek van de miniplooïen (verhoging van het filteroppervlak). Materie: waterafstotend glasvezelpapier met hoge resistentie.

Mechanismen van lucht filtratie

De luchtpartikels worden door 5 verschillende mechanismen weerhouden :

1. De afzetting : Deze vindt plaats wanneer het partikel zich op de glasvezel afzet door zwaartekracht;
2. De elektrische aantrekkingskracht : dit is de aantrekking van de partikels door de glasvezel als gevolg van de elektrostatische lading (van verschillende polariteit) veroorzaakt door de wrijving van de lucht ;
3. Het onderscheppen (interceptie): afhankelijk van de grootte van de partikels ($>$ of $= 0.3$ micron). Dit fenomeen is mogelijk wanneer een luchtpartikel de luchtstroom verlaat en door de glasvezel van de filter wordt weerhouden ;
4. De impact : wanneer een groter partikel ($>$ of $= 0.5$ micron) de luchtstroom verlaat om zich rechtstreeks op de vezel van de filter te nestelen;
5. De verspreiding (dispersie) : voortdurende beweging van de kleinste partikels (0.07 - 0.3 micron) als gevolg van het moleculaire bombardement. De partikels verspreiden zich dan doorheen de luchtstroom (lijnen van de luchtstroom) met een zeer grote waarschijnlijkheid van impact op de vezel van de filter. De verspreiding is het voornaamste opvangmechanisme in een HEPA filter.

Opmerkingen

- Het terughouden (de interceptie), het impact en de verspreiding (dispersie) zijn de 3 voornaamste weerhoudingsmechanismen bij een absolute filter.
- In theorie stijgt de efficiëntie van de HEPA filter voor partikels waarvan de grootte kleiner is dan 0.3 micrometer. De kans dat een virus op zich in aerosol wordt gebracht is zeer klein en het is zeer onwaarschijnlijk dat een virus een doorgang via de HEPA filter overleeft. Virussen zijn meestal "omkapseld" in mucus, stofdeeltjes of cultuurmedium en de diameter van deze partikels is groter dan 0.3 micrometer. Tenslotte, zou de individualisatie van virale partikels een hoge energie vergen en gekalibreerde openingen vereisen opdat deze partikels in aerosols kunnen worden gebracht. Twee onderzoeken hebben de doeltreffendheid van absolute filters aangetoond voor het weerhouden van partikels met diameter groter en kleiner dan 0,3 micrometer (zie referenties, Harstad & Filler, 1969, Kruse & Kruse, 1984).
- De meeste dampen en gassen worden niet weerhouden door een absolute filter.

² DOP test: meet de efficiëntie van een absolute filter in termen van weerhouding van luchtpartikels op basis van de weerhouding van aerosoldruppeltjes van dioctyl phthalaat (DOP) geijkt op 0.3 micrometer. Deze wordt gewoonlijk uitgedrukt in percent. Een HEPA filter wordt gekarakteriseerd door een weerhouding van 99.97% van DOP. DOP is carcinogeen, het is dus aangeraden om over te gaan tot de MMPS (Most Penetrating Particle Size). Bij deze test wordt het vermogen van de absolute filter nagegaan om luchtpartikels met een diameter tussen 0,1 en 0,2 micrometer te weerhouden.

Bijlage 2

ULTRAVIOLET LAMPEN

UV lampen worden regelmatig aangetroffen in laboratoria, ziekenhuizen en andere plaatsen waar de lucht, het water of oppervlakken dienen te worden ontsmet. De doeltreffendheid van UV stralingen kan beter aangetoond worden voor inactivatie van micro-organismen in de lucht dan op oppervlakken (zie referenties: Schechmeister, 1991).

Definities

UV stralen zijn niet-ioniserende elektromagnetische stralingen die aan de wetten van de optica beantwoorden. Voornamelijk op basis van het biologisch effect wordt het UV spectrum in 3 reeksen van golflengten onderverdeeld : UV-A: 315 - 400 nm, UV-B: 280 - 315 nm et UV-C: 100 - 280 nm. De golflengte < 180 nm hebben geen biologisch effect (deze worden geabsorbeerd door de atmosfeer). De golflengten < 320 nm zijn actinisch, d.w.z. ze zijn in staat om chemische reacties te veroorzaken. De UV-C hebben een zeer hoge frequentie en zijn zeer energetisch, ze worden gebruikt als kiemdodend middel (maximum activiteit op 260 nm, absorptiepiek van nucleïnezuren). DNA en in mindere mate RNA zijn het doelwit van de UV.

Opmerking : in het algemeen zijn sporen meer resistent aan UV dan de vegetatieve vormen van bacteriën. De letale aard van de UV stralen voor micro-organismen is te wijten aan de vorming van Thymine-dimeren (en andere dimeren zoals Uracil-Thymine) in het DNA. Sommige bacteriën zijn in staat om deze DNA-"schade" te herstellen. De herstellingmechanismen (fotoreactivatie of enzymatische herstellingen) worden o.a. beschreven voor *Micrococcus radiodurans* en *E. coli*.

Het gebruik van UV lampen in MVK's

Het gebruik van UV-lampen wordt niet aanbevolen bij een MVK (NIH, CDC, WHO, norm EN 12469). Wanneer goede werkpraktijken worden nageleefd is het gebruik van een UV lamp niet onontbeerlijk, te meer daar de uitgestoten lucht van een MVK gefilterd (HEPA filters) is. Verschillende factoren kunnen het kiemdodend effect van UV lampen belemmeren, bovendien betekent de blootstelling aan UV-stralingen een gevaar voor de gebruiker.

- Penetratie: UV licht gaat niet doorheen in een dynamische luchtdoorstroming (luchtstroom in de MVK). Micro-organismen die zich onder stofdeeltjes of oppervlakken (werkoppervlak, dozen, elk ander voorwerp aanwezig in de MVK) bevinden of beschaduwde zones worden niet bereikt door UV. "UV's zijn niet werkzaam daar waar het nodig zou zijn " (bij voorbeeld onder de luchtrooster waar zich micro-organismen kunnen bevinden).
- Relatieve luchtvochtigheid : boven een relatieve luchtvochtigheid van 70% daalt het kiemdodend effect op significante wijze.
- Temperatuur en luchtbewegingen : Bij een temperatuur lager dan 27°C vermindert de emissie van het UV licht met golflengten die een kiemdodend effect hebben. Luchtbewegingen leiden tot een verkoeling van de UV lamp waardoor het kiemdodend effect van deze wordt verminderd.
- Netheid: ideaal gezien moeten de UV lampen elke week zorgvuldig met 70% ethanol worden gereinigd teneinde een optimaal rendement te verzekeren.
- Slijtage : UV lampen zouden aan een zes maandelijks controle moeten worden onderworpen teneinde na te gaan of de lichtintensiteit nog steeds een kiemdodend effect heeft. Een lichtintensiteit van 40 microwatt/cm² aan 253,7 nm in het centrum van het werkoppervlak wordt aangeraden.
- Productie van ozon: Lampen die een golflengte van < 250 nm uitzenden, kunnen de productie van ozon bevorderen. Ozon kan de rubber en andere polymeren die zich in de MVK bevinden (verbindingen, verbindingstukken, buizen) aantasten. Lampen met zwakke of geen ozon emissies zijn commercieel verkrijgbaar. Een van de gevaren zou de slijtage van buizen kunnen zijn die voor de toevoer van een ontvlambaar gas zorgen in de MVK.

- Gevaar voor de gebruiker : UV stralen (vooral UV-C) kunnen verbrandingen van de huid en de cornea veroorzaken. Er wordt aanbevolen om nooit UV lampen te laten werken tijdens het uitvoeren van de manipulaties in de MVK. Indien de lampen worden gebruikt, wordt het personeel aangeraden om het lokaal te verlaten.

Opmerkingen

- Het weerkaatsende metaaloppervlak van MVK stelt tevens een gevaar voor de persoon die zou aanwezig zijn in het lokaal wanneer de UV lampen aanstaan. De regel is om geen UV lamp in de MVK aan te zetten wanneer het personeel aanwezig is in het lokaal, en dit zelfs wanneer de MVK niet werkt.
- Het plaatsen van een UV lamp in een MVK die hiervan aanvankelijk niet was uitgerust (of hiermee niet voorzien was door de fabrikant) wordt afgeraden. Deze plaatsing zou als effect kunnen hebben dat de criteria voor prestatie-eisen van de MVK worden gewijzigd (aërologisch schema) en hierdoor een gevaar ontstaat voor de gebruiker en/of het leefmilieu.
- De norm EN 12469 doet geen melding van criteria voor prestatie-eisen met betrekking tot de UV lampen en geeft geen aanbeveling voor het gebruik ervan in MVK's (Bijlage A, pt. A2).