

# Bioseguridad en el laboratorio de citometría de flujo

Dra. Maria Florencia Quiroga

Instituto de investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA

UBA-CONICET

# CV resumido - Quien soy?

- ✓ Investigador Adjunto CONICET
- ✓ Operador / Usuario de Citómetros de Flujo desde el año 1995
- ✓ Trabajo en laboratorios de Bioseguridad desde 2007 (INBIRS -exCNRS-)
- ✓ Miembro del Consejo asesor del SNCF desde 2015
  - ✓ Detectamos la necesidad de concientizar a los usuarios de citómetros de flujo sobre la implementación de medidas de Bioseguridad para la protección del operador / usuario / medio ambiente

# Objetivos

- ✓ Educar
  - ✓ Comunidad de citometría de flujo
  - ✓ Comunidad de bioseguridad
- ✓ No inhibir la actividad, sino llevarla a cabo de manera segura
- ✓ Generar conciencia sobre la necesidad de tomar medidas tendientes a la protección del operador / usuario

# Principios de bioseguridad

- ✓ Contención

- ✓ Reducir o eliminar la exposición del trabajador y del medio ambiente a agentes potencialmente dañinos

Ejemplos: cabina de seguridad, centrifugas de seguridad, manejo de aerosoles en citómetros con capacidad de separación celular

Incluye procedimientos (prácticas microbiológicas estándar)

# Principios de bioseguridad

- ✓ Valoración del riesgo
  - ✓ Definición: acción o serie de acciones tendientes a reconocer o identificar los peligros y medir el riesgo o probabilidad de ocurrencia de algún evento causado por ese peligro.
  - ✓ Tener en cuenta la severidad de las consecuencias.
- ✓ Requiere un análisis cuidadoso
  - ✓ Consecuencias si los riesgos son subestimados
  - ✓ Consecuencias de medidas de prevención excesivas: costos y carga adicionales sin una mejoría en la bioseguridad, evasión de acciones por recargo en el trabajo.

# Valoración del riesgo

- ✓ 1. Identificar los agentes biológicos peligrosos
- ✓ 2. Identificar los procedimientos de laboratorio peligrosos
- ✓ 3. Realizar una determinación final del nivel de bioseguridad requerido
- ✓ 4. Evaluar las habilidades o competencias del personal y la integridad de los equipos de seguridad biológica
- ✓ 5. Revisión de la evaluación del riesgo con profesionales de bioseguridad

# 1.- Identificar los agentes peligrosos

- ✓ Conocer la clasificación de los diferentes microorganismos en grupos de riesgo
  - ✓ Habilidad para infectar y causar enfermedad
  - ✓ Virulencia (severidad de la enfermedad)
  - ✓ Disponibilidad de medidas de prevención y tratamientos efectivos
- ✓ Grupos de riesgo OMS / CDC: grupos 1-4
- ✓ Vectores virales y recombinantes:
  - ✓ Agentes peligrosos genéticamente modificados:
    - ✓ Muestras con ADN recombinante, virus, bacterias, levaduras, etc.
    - ✓ Vectores virales: lentivirus, adenovirus y vectores retrovirales

# Los agentes biológicos se clasifican en grupos de riesgo 1 a 4



Courtesy of K Holmes, NIAID, NIH



## 2.- Identificar los procedimientos peligrosos

- ✓ 5 rutas de transmisión en el laboratorio:
  - ✓ 1. Inoculación parenteral (agujas/objetos cortopunzantes)
  - ✓ 2. Derrames/salpicaduras sobre piel o membranas mucosas
  - ✓ 3. Ingestión por pipeteo con la boca
  - ✓ 4. Mordeduras y rasguños de animales
  - ✓ 5. Inalación por exposición a aerosoles infecciosos
- ✓ 1 a 4 dan cuenta de <20% del total de infecciones adquiridas en laboratorios (LAI's)
- ✓ **AEROSOLESON UN PELIGRO IMPORTANTE**

# 3.- Determinar el nivel de bioseguridad

## Identificar el Riesgo:

- ✓ ¿Cuál es la probabilidad de que se produzca un daño?
- ✓ ¿Se dispone de las medidas de control adecuadas para ese peligro?
- ✓ ¿La generación de aerosoles incrementa el riesgo?
- ✓ Las infecciones adquiridas en Laboratorios pueden ocurrir por vías no naturales, debido a la generación de aerosoles:

**Decidir el nivel de contención requerido para la actividad a realizar**

### 3.- Determinar el nivel de bioseguridad

BSL	Agente	Prácticas	Barreras & equipamiento de seguridad
1	No causa enfermedad	Microbiológicas estándar	Ninguna
2	Causa enfermedad; NO transmite por aerosoles	BSL1 & acceso limitado; señalética; vigilancia medica	CSB clase I o II; guardapolvo; guantes
3	Transmisión por aerosoles posible; consecuencias serias o letales	BSL2 & acceso controlado; decontaminación de residuos; ropa de laboratorio; extracción de suero basal	CSB clase II; ropa protectora; protección respiratoria
4	Enfermedad exótica/peligrosa de alto riesgo; transmisión por aerosoles posible	BSL3 & cambio de ropas; ducha al salir; TODO el material se decontamina al salir	CSB clase III o clase II con traje de protección contra riesgos biológicos

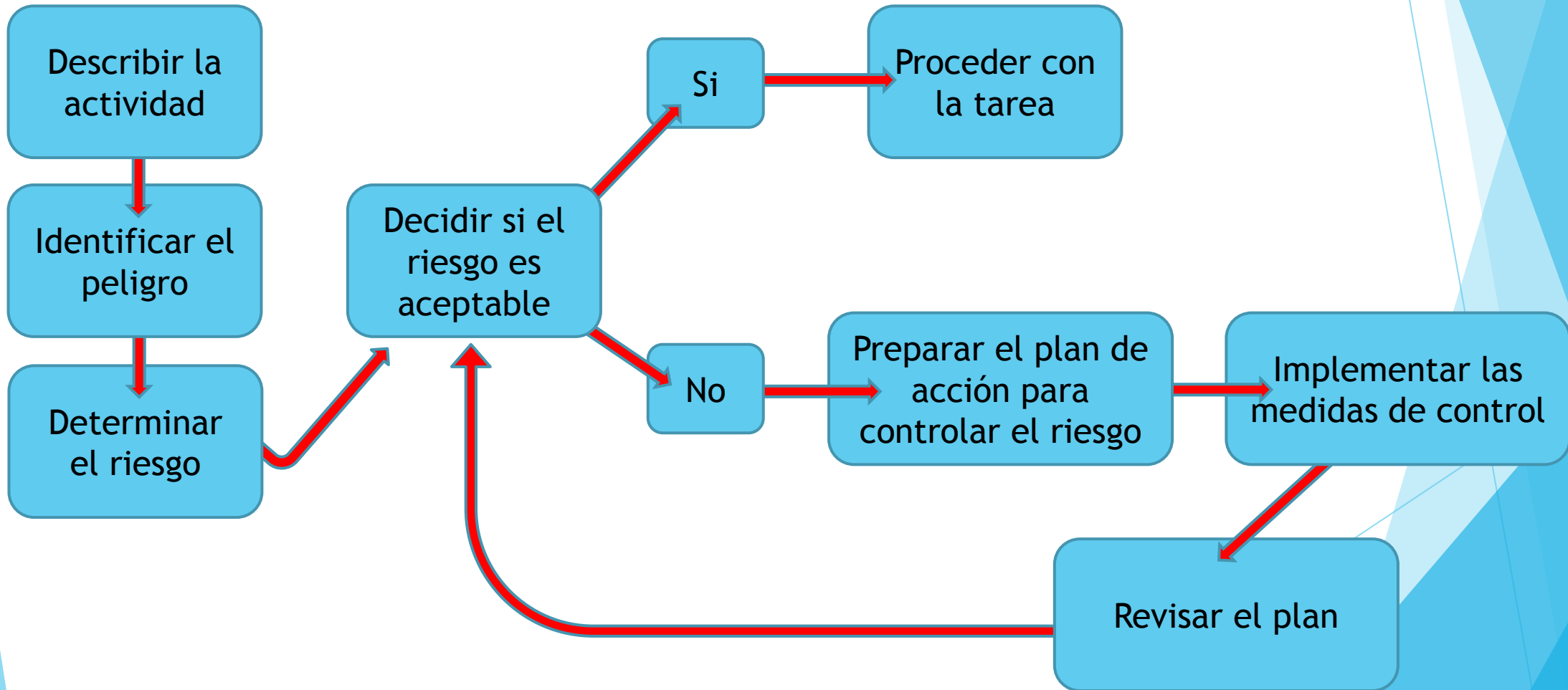
## 4.- Identificar las habilidades del personal y las características del equipamiento

- ✓ Entrenamiento adecuado y/o certificación del personal
- ✓ Equipamiento disponible y funcional
  - ✓ Sistema de manejo de aerosoles, Cabina de Seguridad Biológica, diseño del equipo (camara de Sorting).
  - ✓ Equipo de protección personal: Guantes, guardapolvo, etc. Respirador en caso de necesidad.

## 5.- Revisión con especialistas en bioseguridad

- ✓ Revisión de la estimación del riesgo con un profesional de Bioseguridad, un experto en el campo y/o con el Comité Institucional de Bioseguridad (requerido en ciertos casos)
- ✓ Citometria de flujo: no existe regulación -nacional o internacional- específica
- ✓ Para el caso de citómetros analíticos los **criterios** de bioseguridad son los mismos que para las muestras biológicas que se analizan en el laboratorio.

# Estrategia general para la valoración del riesgo



# Vayamos a nuestro laboratorio....

- ✓ Qué equipos operamos?
- ✓ Qué tipo de muestras se procesan?
- ✓ Cuán entrenado está el personal que ingresa y opera los equipos?

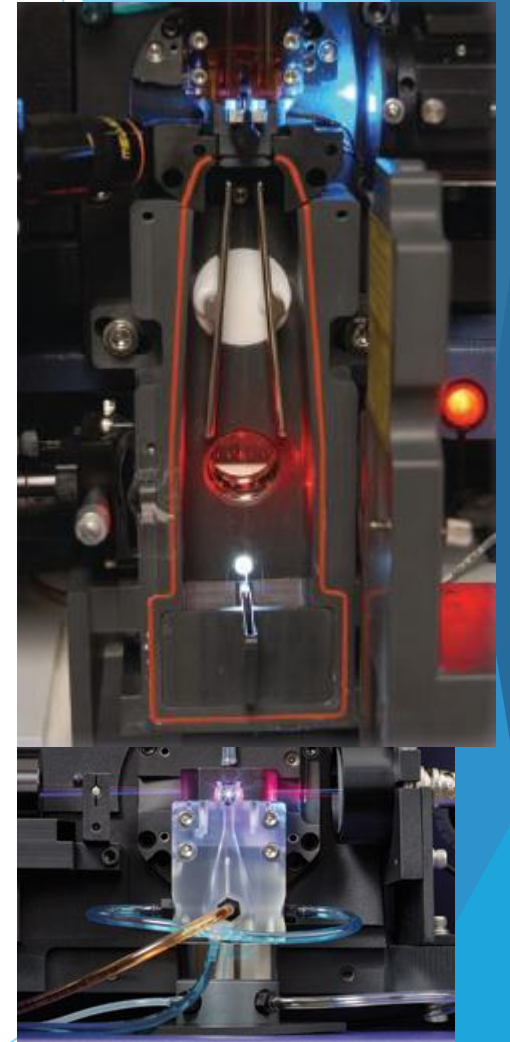
**¿¿Cuál es la probabilidad  
de que se produzcan  
aerosoles??**

# LOS SORTERS PRODUCEN AEROSOLES

Así es como trabajan....alta presión, generación de gotas satélites, obstrucciones accidentales...

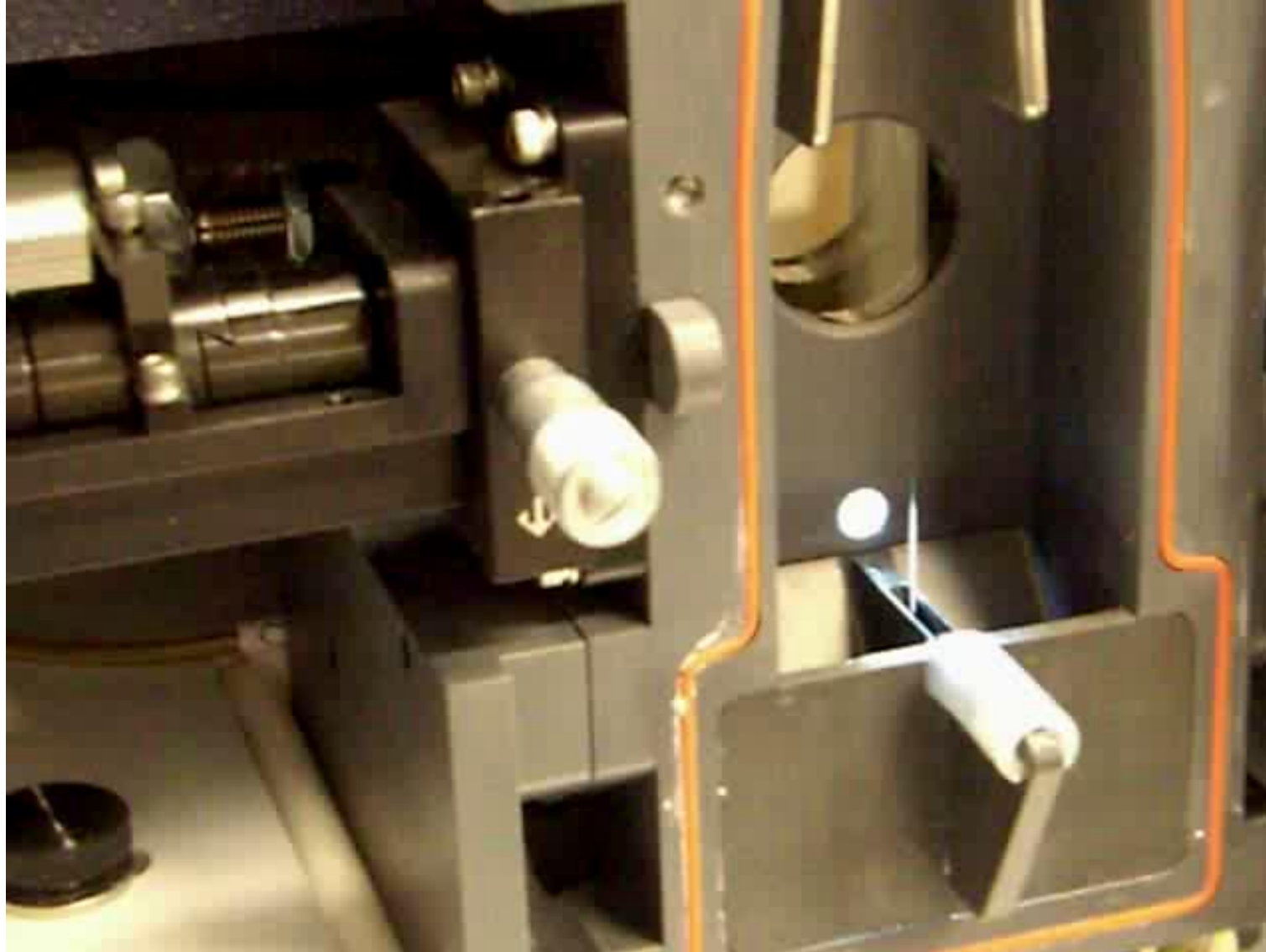
# LOS CITOMETROS PARA ANALISIS PRODUCEN MENOS AEROSOLES

Menor presión de trabajo PERO generan situaciones donde se producen aerosoles: descarte presurizado, “back flush”, tubo expulsado del SIT, etc....

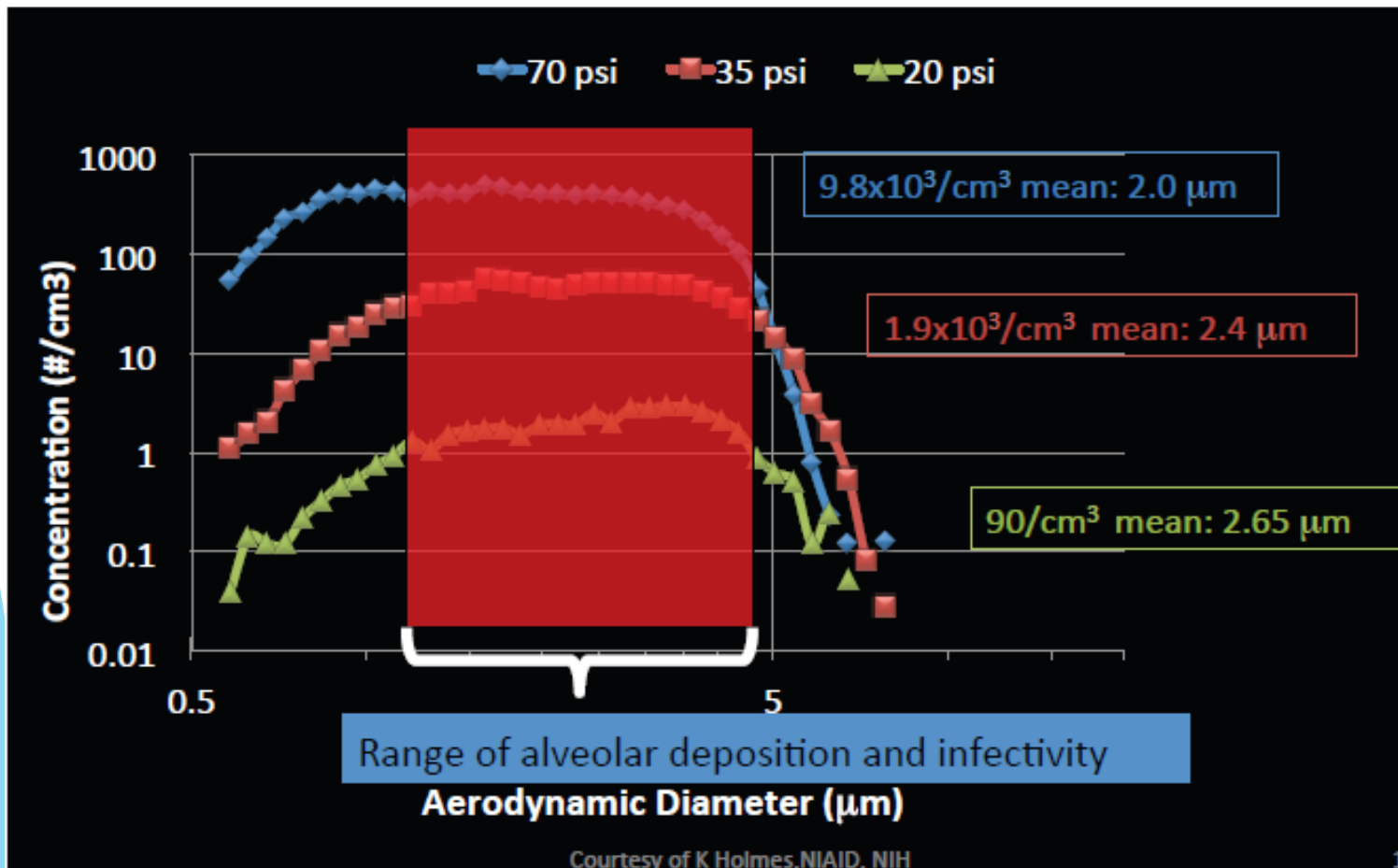




# LOS SORTERS PRODUCEN AEROSOLES...



# Aerosoles generados por un sorter en modo de falla



- ✓ A mayor presión de sheath, mayor concentración y menor diámetro aerodinámico
- ✓ Los aerosoles de entre 1-3 μm de diámetro se pueden depositar en los alveolos

# Bioseguridad en el lab de citometría: qué debemos saber?

- ✓ Seguir los principios de bioseguridad generales
- ✓ Desarrollar un POE para la utilización del equipo y el manejo de los problemas que pueden suscitarse
- ✓ Usar los recursos que tenemos disponibles!!!!
  - ✓ Profesional de Bioseguridad de la Institución
  - ✓ Estándares publicados

# Valoración del riesgo

Cinco pasos sencillos:

- ✓ 1. Identificar los agentes biológicos peligrosos
- ✓ 2. Identificar los procedimientos de laboratorio peligrosos
- ✓ 3. Realizar una determinación final del nivel de bioseguridad
- ✓ 4. Evaluar las habilidades o competencias del personal y la integridad de los equipos de seguridad biológica
- ✓ 5. Revisión de la evaluación del riesgo con profesionales de bioseguridad

# Valoración del Riesgo: Paso 1

- ▶ En que grupo se ubica el agente biológico?
- ▶ El agente puede ser desconocido
  - ▶ Origen de la muestra?
  - ▶ Humano, ratón, primate, linea celular. TODOS SE TRATAN COMO CLASE 2!
- ▶ Existe evidencia de Infecciones Adquiridas en Laboratorio por ese agente?
- ▶ Modo de transmisión
  - ▶ Aerosol?
- ▶ Personal del Laboratorio
  - ▶ Factores de Riesgo (embarazo, inmunocompromiso, etc.)

# Valoración del Riesgo: Paso 1

## Identificar el agente

- ▶ ATCC recomienda que TODAS las líneas humanas/primates sean manipuladas como probables portadoras de HIV o virus de la hepatitis
- ▶ Política de Bioseguridad de NIH para Citómetros con capacidad de Cell Sorters: “Tratar las líneas celulares humanas como infecciosas”

**TODAS LAS CELULAS DERIVADAS DE HUMANO DEBEN MANIPUARSE EN UN NIVEL DE CONTENCIÓN 2 O SUPERIOR**

# Valoración del Riesgo: Paso 1

## Identificar el agente: Vectores virales y recombinantes

- ▶ Peligros asociados al uso de agentes modificados genéticamente
  - ▶ Muestras con r.DNA, virus, bacterias, levaduras, etc. & vectores virales: lentivirus, adenovirus o retrovirus, etc.
  - ▶ Ir a la bibliografía para aquellos agentes aún no clasificados.
- ▶ Comité asesor sobre DNA recombinante (NIH)
  - ▶ Guías del NIH para investigaciones que involucren DNA recombinante

**MANIPULARSE EN UN NIVEL DE CONTENCIÓN 2 O NIVEL DE CONTENCIÓN 2 CON PRACTICAS MEJORADAS, DEPENDIENDO DE LOS FACTORES DE RIESGO**

# Valoración del Riesgo: Paso 1

## Identificar el agente: Hoja de Bioseguridad

- ▶ Descripción de la muestra:
  - ▶ Origen
  - ▶ Procesamiento / modificaciones sufridas
  - ▶ Fijación

AQUÍ EL INVESTIGADOR PRINCIPAL TOMA LA RESPONSABILIDAD DE LA MUESTRA QUE ES ENVIADA AL LABORATORIO DE CITOMETRIA DE FLUJO!!!

**Biological Risk Assessment Worksheet**

Tracking # \_\_\_\_\_ Building/Lab Room # \_\_\_\_\_ **PI Name** \_\_\_\_\_

Laboratory protocols consist of one or more procedures. Each procedure in the protocol needs an agent-specific Biological Risk Assessment. Once an agent-specific Biological Risk Assessment has been completed for the procedure, it can be used for multiple protocols by referencing its tracking number. The procedure may be performed with additional precautions, if desired, but must be no less stringent than what is calculated below at Section II.

Keep a completed copy of this worksheet in your Biosafety Manual. The *Biosafety in Microbiological and Biological Laboratories (BMBL)* 5<sup>th</sup> Edition has additional guidance on facilities, work practices, PPE, and medical surveillance.

---

Section I: Complete All Data Entry in this Section

1. Agent Used \_\_\_\_\_
2. Is a vaccine available? Yes  No
3. Risk Group of Agent (check [www.absa.org](http://www.absa.org)) 1  2  3  4  (Inactivated agents = Risk Group 1)
4. Procedure \_\_\_\_\_
5. For Risk Group 2-3, is there a splash potential? Yes  No
6. For Risk Group 2-3, does the procedure generate aerosol or large concentration? Yes  No   
(e.g., cell culture, vortex, centrifuge, aerosol chamber, sonicate)

---

Section II: Data will be calculated in this Section according to the answers entered above in Section I

1. Facility and Work Practices Biological Safety Levels (BSLs)  
Facility BSL 1  2  3  4  Work Practices BSL 1  2  3  4
2. Biological Safety Cabinet Class I/II  Class III
3. Personal Protective Equipment Needed for Procedure: (left to right = increased protection)
  - a. Gloves latex/nitrile required
  - b. Eye safety glasses  goggles + face shield
  - c. Lab coat white  blue smock/coveralls  space suit
  - d. Respirator\* N-95/PAPR  space suit



# Valoración del Riesgo: Paso 2

## Identificar el procedimiento de Laboratorio:

- ▶ Qué ocurre con la muestra dentro del laboratorio?
- ▶ Se filtra? Riesgo de aerosoles
- ▶ Se utiliza algún elemento cortopunzante?
- ▶ Existen riesgos físicos y/o químicos? Por ej. Lasers
  - ▶ El sorting en sí mismo es un procedimiento peligroso
  - ▶ Según NIH *“existe un consenso general entre los expertos en bioseguridad que indica que la generación de aerosoles durante procedimientos u operación de equipos es una fuente probable de infecciones adquiridas en el Laboratorio”*. Kevin Holmes, NAID, NIH.

# Valoración del Riesgo: Paso 3

## Identificar el Riesgo:

- ▶ Cuán probable es su ocurrencia?
- ▶ Se dispone de los medios adecuados para su control?
- ▶ Los aerosoles incrementan el riesgo?
- ▶ Las IAL pueden ocurrir aún si la vía aérea no existe en la naturaleza: altas concentraciones & procedimientos que generan aerosoles
- ▶ Ejemplo: 1er caso de infección a través de aerosoles
  - ▶ Patógeno que se transmite por vector
  - ▶ Se realizó una lisis de células infectadas por sonicado en la mesada

**¡Decidir el nivel de Contención Requerido!**

Infection

Case Report

**Scrub Typhus Pneumonitis Acquired through  
the Respiratory Tract in a Laboratory Worker**

M. Oh, N. Kim, M. Huh, C. Choi, E. Lee, I. Kim, K. Choe

# Valoración del Riesgo: Paso 3

Determinar el Nivel de Contención:

BSL	Agente	Prácticas	Barreras & equipamiento de seguridad
1	No causa enfermedad	Microbiológicas estándar	Ninguna
2	Causa enfermedad: NO	BSL 1 & acceso limitado:	CSB clase I o II:
	serias o letales	residuos, ropa de laboratorio; extracción de suero basal	protección respiratoria
4	Enfermedad exótica/peligrosa de alto riesgo; transmisión por aerosoles posible	BSL3 & cambio de ropas; ducha al salir; TODO el material se decontamina al salir	CSB clase III o clase II con traje de protección contra riesgos biológicos

**¡Los niveles de Riesgo correlacionan pero no son = al Nivel de Contención!**

# BSL2 con precauciones aumentadas

- ▶ También conocido como BSL2 con prácticas de BSL3
  - ▶ NO es un nivel de contención
  - ▶ BSL3 puede incluir practicas / instalaciones no aplicables al Lab de BSL2 (autoclave, aire filtrado con HEPA, etc.)
  - ▶ Entonces, “precauciones aumentadas” se definen internamente (contención antes del sorting, método de desinfección, etc.)

# Valoración del Riesgo: Paso 4

## Determinar las medidas de Control:

- ▶ Ingeniería
  - ▶ Laboratorio de contención (usualmente BSL2)
  - ▶ Diseño de la cámara de Sorting
  - ▶ Sistema de control de aerosoles incorporado al equipo
  - ▶ Cabina de Seguridad Biológica
- ▶ Elementos de Protección Personal
  - ▶ Guantes, Guardapolvo, etc.
  - ▶ Mascara N95 (aunque siempre es mejor contener aerosoles en el sitio donde se generan)



# Valoración del Riesgo: Paso 4

## Determinar las medidas de Control:

- ▶ Procedimientos
  - ▶ Desarrollo de Procedimientos Operativos Estándar (POEs)
  - ▶ Son específicos para cada instrumento
  - ▶ Paso a paso, describiendo:
    - ▶ Seteo
    - ▶ Sorting
    - ▶ Fallas de sorting (nozzle obstruido)
    - ▶ Decontaminación (camara de Sorting, Fluidica, Cabina de Seguridad Biológica)
    - ▶ Apagado

- \* Revisar periódicamente
- \* Entrenamiento del personal

# Valoración del Riesgo: Paso 4

Determinar las medidas de Control:

- ▶ Procedimientos
  - ▶ Entrenamiento y/o certificación apropiada del personal es ESENCIAL!
  - ▶ El equipamiento debe estar disponible y funcional (Testeado)

# Valoración del Riesgo: Paso 5

## Revisar:

- ▶ Revisar las normas generadas con el profesional de Bioseguridad
- ▶ Consensuar el nivel de contención a implementar
- ▶ DOCUMENTAR y revisar las normas regularmente

No existe regulación específica para el sorting por citometría, pero las normas internacionales indican que “los procedimientos que generan aerosoles en el BSL2 o mayor nivel DEBEN realizarse en una Cabina de Seguridad Biológica en un nivel de contención adecuado”.

[www.hse.gov.uk/biosafety/biologagents.pdf](http://www.hse.gov.uk/biosafety/biologagents.pdf)



# Nuestra experiencia....

## FACSAria FUSION:

- ▶ Un citómetro de Flujo y cell sorter (jet in air system) dentro de una cabina de seguridad biológica con Sistema de control de aerosoles (SMA).
  - ▶ CSB debe estar CERTIFICADA!
- ▶ Se puede llegar a evitar el requerimiento de una habitación separada y de N95 para los ocupantes del Lab compartido
- ▶ **NO SE ELIMINA LA NECESIDAD DEL SISTEMA DE MANEJO DE AEROSOLE**



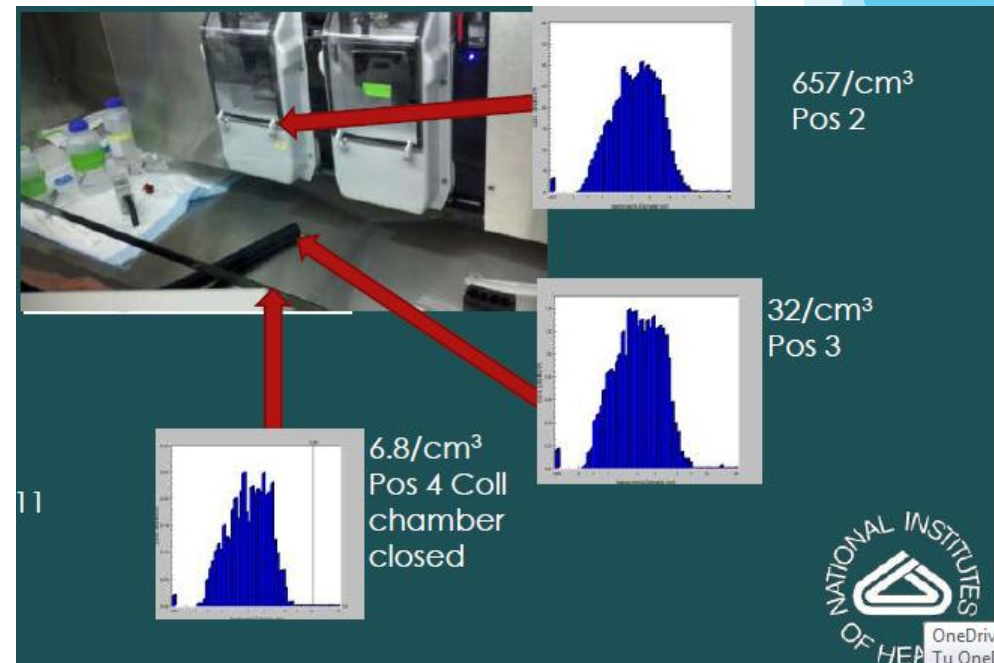
# Sistema de manejo de Aerosoles

Porqué se necesita un SMA dentro de una Cabina de Seguridad ?

¡Se trata de Contención en el lugar donde se generan los aerosoles!

**Condiciones:**  
Cabina: ON  
Sorter: FAIL MODE  
SMA: OFF

**¡¡Los aerosoles salen de la cabina!!**



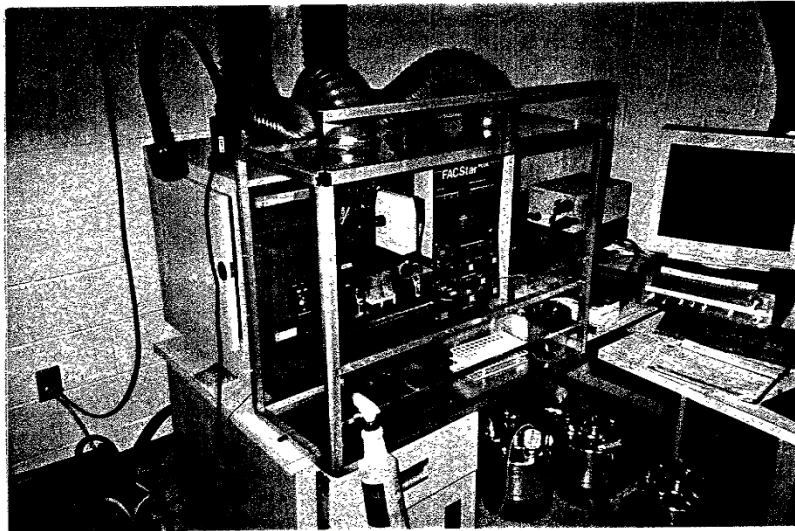
# Citometría analítica

- ▶ Fijar las muestras!
  - ▶ La mayoría de los ensayos admiten fijación...
- ▶ O tratar las muestras como si fuera un sorting!
  - ▶ Ya que colocar / quitar las muestras del puerto de muestras -> Aerosoles!

**¡SIEMPRE HACER EL ANALISIS DE RIESGO!**

# La Bioseguridad ha recorrido un largo camino....

**Antes**



Simon Monard, 2002

**Ahora**



MoFlo Astrios



BD FUSION

The background features abstract, overlapping geometric shapes in various shades of blue, ranging from light sky blue to deep navy blue. These shapes are primarily located on the right side of the slide, creating a modern, dynamic feel. The rest of the slide is a plain white background.

Gracias!

Preguntas?