	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 1 de 16</p>
---	--	--


Código: GEGMIC 01
<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>

Control de versiones		
Versión	Fecha	Alcance de las modificaciones
01	01-12-14	Elaboración del documento

Autoría
Grupo de Trabajo de la SEIMC sobre Actuación de los Laboratorios de Microbiología en la Infección por el Virus Ébola

ÍNDICE

1. AUTORES	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. PREGUNTAS Y RESPUESTAS FRECUENTES QUE SE PLANTEAN LOS MICROBIÓLOGOS CLÍNICOS.....	5
3.1. Sobre casos en investigación o confirmados.....	5
3.2. Sobre el procesamiento inadvertido de muestras de pacientes con criterios de caso en investigación o confirmado	12
4. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	16

	<p align="center">Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 3 de 16</p>
---	---	--

1. AUTORES

Grupo de Trabajo de la SEIMC sobre Actuación de los Laboratorios de Microbiología en la Infección por el Virus Ébola

Coordinadores:

Leiva León, José. Servicio de Microbiología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Pérez Sáenz, José Luis. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca.

Revisión:

Marimón Ortiz de Zárate, José María. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid.

Miembros del Grupo:

Cantón Moreno, Rafael. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid.


De Oña Navarro, María. Servicio de Microbiología. Hospital Central de Asturias. Oviedo.

Galán Montemayor, Juan Carlos. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

Gimeno Cardona, Concepción. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario. Valencia.

Navarro Marí, José María. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.

Pumarola Suñé, Tomàs. Servicio de Microbiología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

	<p align="center">Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 4 de 16</p>
---	---	--

2. INTRODUCCIÓN

La epidemia que tiene lugar en África de enfermedad por el virus Ébola (EVE) plantea riesgos no solamente a los países que la sufren y a los de su entorno sino, en mayor o menor medida, a toda la comunidad internacional. Nuestro país, por sus características geográficas y socioculturales, está entre aquellos cuya probabilidad de atender casos importados de pacientes que han contraído la infección en África (viajeros, cooperantes) es mayor. También, como han demostrado los acontecimientos y al igual que otros países, está expuesto a casos secundarios entre el personal sanitario, derivados de la alta contagiosidad del virus.


Por otra parte, la elevada mortalidad asociada a la infección y la ausencia, por lo general, de medidas terapéuticas y profilácticas eficaces clasifican al virus Ébola en la máxima categoría de peligrosidad (grupo 4), ante el que deben adoptarse medidas de contención igualmente del máximo nivel a la hora de manejar a los pacientes y a las muestras biológicas. Este concepto genérico, establecido legalmente (RD 664/1997), plantea dudas a la hora de su puesta en práctica.

La SEIMC, la Sección de Microbiología y el Grupo de Estudio para la Gestión en Microbiología Clínica (GEGMIC), a la vista de la gran repercusión social y mediática que ha tenido y tiene la infección por el virus Ébola, ha considerado conveniente clarificar algunos conceptos e interpretaciones acerca de la manipulación de las muestras destinadas al diagnóstico microbiológico y al seguimiento de los pacientes con sospecha de infección por este virus. Para ello ha solicitado a un grupo de socios microbiólogos con interés y conocimiento en este tema que elaboren un documento donde se dé respuesta a dudas que los miembros de la SEIMC, las autoridades o la opinión pública reclaman de los profesionales.

El presente documento se presenta bajo la forma de preguntas y respuestas que se han ordenado en dos grandes grupos: las relacionadas con casos confirmados o en investigación, de acuerdo con los criterios que las autoridades sanitarias tengan establecidos en cada momento, y las referidas a pacientes en los que no se sospecha inicialmente esta circunstancia pero que, con posterioridad, se demuestra que cumplían dichos criterios.

La forma de llevarlo a cabo fue partiendo de un primer bloque de preguntas y respuestas elaboradas por uno de los miembros del Grupo de Trabajo sobre la base de documentos elaborados por organizaciones sanitarias internacionales de prestigio. Posteriormente, en una reunión telemática, la lista inicial fue motivo de una discusión general en la que se añadieron más preguntas o se reformularon las existentes. Las preguntas se distribuyeron entre los miembros del Grupo para que elaborasen las respuestas. Tras una labor de revisión, edición y armonización, el documento fue aprobado por todos los componentes.

Por razones obvias, el presente documento es dinámico, motivado por la situación cambiante de la epidemia y el grado de conocimiento que se va adquiriendo conforme avanza ésta. Cabe esperar que los socios de la SEIMC u otros profesionales planteen sugerencias y modificaciones que hagan conveniente elaborar una nueva versión. La SEIMC y el Grupo de Trabajo agradecen de antemano todas aquéllas que permitan mejorar la calidad y utilidad del documento.

	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 5 de 16</p>
---	--	--

3. PREGUNTAS Y RESPUESTAS FRECUENTES QUE SE PLANTEAN LOS MICROBIÓLOGOS CLÍNICOS

3.1. Sobre casos en investigación o confirmados

Como se ha señalado anteriormente, los criterios definitorios de caso en investigación o confirmado son los establecidos por las autoridades sanitarias. Las preguntas y respuestas serán acordes con los criterios vigentes en cada momento.

¿Cuál es el papel de los servicios de vigilancia epidemiológica de las Comunidades Autónomas?

Ante un paciente con sospecha de enfermedad por el virus de Ébola, debe notificarse esta circunstancia de forma urgente al servicio/unidad de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad Autónoma siguiendo los procedimientos establecidos en cada caso. Es competencia de éstas:


- a) Decidir la clasificación del paciente en “Caso en Investigación” de acuerdo con los criterios clínicos y epidemiológicos establecidos.
- b) Pasar la información al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y al Centro Nacional de Epidemiología.
- c) Contactar con el hospital de referencia de la Comunidad Autónoma para avisar de la entrada del paciente y coordinar su traslado.
- d) Realizar el seguimiento de contactos.

¿Cuál es el papel del laboratorio de Microbiología en el protocolo actual del Ministerio de Sanidad?

El diagnóstico de laboratorio de un caso de Ébola se realiza en el laboratorio de referencia, el Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III, en Majadahonda (Madrid). Según la normativa actual del Ministerio de Sanidad, las muestras deben permanecer custodiadas por el personal de laboratorio hasta su envío al CNM. Es potestad de los diferentes comités hospitalarios, constituidos para esta situación de alarma, decidir o priorizar otras opciones. Los facultativos de Microbiología deben ser miembros consultores de estos comités por su opinión formada sobre bioseguridad y manejo de las muestras, así como por su capacitación para resolver cualquier duda científico-técnica o de gestión de alguna parte del proceso.

¿Quién debe hacer las pruebas y las manipulaciones de muestras de pacientes que cumplen criterios de caso en investigación?

Las manipulaciones de los pacientes debe realizarlas el personal entrenado que cuida a los pacientes en el hospital de referencia de cada Comunidad. La manipulación de las muestras debe realizarla también personal entrenado del laboratorio de Microbiología. En este caso, se deben encargar de la custodia y organización del transporte de las mismas por empresas especializadas, siguiendo las normas establecidas por el Instituto de Salud Carlos III.

	<p align="center">Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 6 de 16</p>
---	---	--

¿Cuáles son las condiciones generales de bioseguridad requeridas para la manipulación de muestras con presencia potencial o conocida de virus causantes de fiebres hemorrágicas?

El virus Ébola es un agente biológico del grupo 4, y las muestras deben ser manejadas, teóricamente, en instalaciones de nivel de bioseguridad 4 (NBS4). Como no existen instalaciones de este tipo, las condiciones de bioseguridad deben ser las más altas de las que disponga el laboratorio o el hospital y que, como mínimo, debe incluir instalaciones con presión negativa, habitaciones o cabinas de seguridad biológica de clase II y EPIs adecuados (bata de apertura posterior y capucha o mono con capucha, calzas, pantalla facial, mascarilla FFP3 o FFP2 y dobles guantes).

Lo mejor es minimizar la manipulación de la muestra, por lo cual lo aconsejable es enviarla al laboratorio de referencia directamente desde la habitación del paciente, embalaje incluido.

Si las muestras se hubieran enviado al laboratorio de Microbiología o deban enviarse allí por distintas razones, lo deseable sería manipularlas en cabina de seguridad de clase III en un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 (NBS3). Como la mayor parte de los hospitales carecen de estas instalaciones, o puede no ser factible derivarlas a un centro que cumpla estos requisitos, cuando el procesamiento sea imprescindible, éste debe ser mínimo, realizarse en una cabina de seguridad clase II localizada en un laboratorio con el menor tránsito posible y utilizando protección y prácticas de NBS3.

La técnica microbiológica a emplear será escrupulosa, evitando riesgos de aerosolización, derrames o salpicaduras. En caso de centrifugación manual se deberá disponer de cubetas o rotores herméticamente cerrados lo cuales, una vez finalizada la centrifugación, se abrirán en el interior de la cabina de bioseguridad. El manipulador deberá estar tranquilo, sin presión, y supervisado por una persona con conocimientos técnicos.


Las muestras de los casos confirmados, en el momento de su eliminación deben ser consideradas como residuos sanitarios del grupo III que son aquellos que requieren unas medidas especiales de prevención, recogida, almacenamiento, transporte y eliminación dentro y fuera del centro sanitario. Para su eliminación se utilizarán los contenedores correspondientes del grupo III.

¿Cómo se debe transportar la muestra al laboratorio en caso de ser necesario?

Previamente a la extracción de las muestras, se debe preparar todo el material necesario (recomendable una lista de comprobación) y rotular el tubo primario con los datos del paciente. Se debe avisar con anterioridad al microbiólogo de su envío al laboratorio. Una vez extraídas, se introducirán en un contenedor a prueba de fugas (una bolsa de plástico autosellable, un tubo rígido de mayor tamaño provisto de material que absorba golpes, etc.) y remitidas directamente a la zona de manipulación de muestras de laboratorio. No se debe utilizar nunca el tubo neumático. Las pruebas a realizar en el laboratorio deben limitarse al mínimo imprescindible y las muestras deben permanecer, en todo momento, perfectamente identificadas y custodiadas por el personal designado del laboratorio en un lugar de acceso restringido.

¿Qué muestras se deben enviar para el diagnóstico del virus Ébola?

La muestra diagnóstica fundamental es la sangre anticoagulada con EDTA. Conforme la enfermedad avanza se puede detectar el virus en muchas otras muestras biológicas, como vómitos, orina, heces, saliva, conjuntiva, semen, exudado vaginal, etc., pero no deben ser consideradas como muestras primarias para diagnóstico.

	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 7 de 16</p>
---	--	--

¿Cómo deben remitirse las muestras para diagnóstico específico de EVE (amplificación de ácidos nucleicos) y otras muestras relacionadas al laboratorio de referencia actual?

La normativa actual de las autoridades sanitarias no establece distinciones según que las muestras procedan de pacientes con sospecha (caso en investigación) o con el diagnóstico confirmado de EVE. Tampoco que su finalidad sea establecer el diagnóstico de esta enfermedad o confirmar un diagnóstico alternativo (v.g., malaria).

En todos los casos, el transporte se realizará en contenedores homologados y utilizando empresas de mensajería autorizadas, bajo normativa de “Sustancia biológica clase A (UN2814)”, de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 97/2014 por el que se regulan las operaciones de transporte de mercancías peligrosas en territorio español.

Los embalajes homologados incluyen tres contenedores:

- a) El tubo o envase primario, que será estanco e identificado.
- b) El contenedor secundario, asimismo cerrado, estanco y a prueba de filtraciones, provisto de material absorbente, irrompible y con tapa de cierre hermético.
- c) El envase externo, provisto de la etiqueta normalizada de “Sustancia biológica clase A” (UN2814)”.


Conviene tener siempre presentes los siguientes aspectos:

- Entre los contenedores secundario y externo debe haber material absorbente de golpes. Si la muestra se envía refrigerada, el elemento refrigerante debe situarse en este lugar.
- La documentación relativa al paciente y la solicitud también se adjuntarán entre el contenedor secundario y el externo.
- En el envase contenedor externo deben figurar las direcciones completas y teléfonos de contacto del remitente y el destinatario.
- En los envíos categoría A sólo se puede incluir un único contenedor primario en el secundario.
- Se debe cumplimentar un formulario normalizado de declaración, específico de categoría A, que se adjuntará en la parte exterior del envase terciario.
- Las empresas de transporte deben estar autorizadas para el envío de muestras de clase A.

¿Quién debe suministrar el material de triple envase para el envío de muestras y quien realiza el transporte de las mismas?

El centro hospitalario y el laboratorio de Microbiología de los hospitales de referencia para pacientes con sospecha de EVE deben:

- Estar provistos de todo el material reglamentario y adecuado para el envío de las muestras. Los envases, etiquetas y documentos pueden obtenerse de las compañías de transporte autorizadas o de empresas fabricantes o comercializadoras de este tipo de material.
- Tener confirmados y actualizados los acuerdos con las compañías de transporte autorizadas, incluyendo los fines de semana, que podrían estar consensuados con las autoridades de Salud Pública de su Comunidad. Las compañías autorizadas por el Instituto de Salud Carlos III para el envío de este tipo de muestras se pueden consultar en el "Área de Orientación Diagnóstica", Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Tel. 91 822 37 01 - 91 822 37 23- 91 822 36 94 - 607 189 076 y cnm-od@isciii.es).

	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 8 de 16</p>
---	--	--

Existen hospitales distintos del hospital de referencia cuya localización geográfica particular (territorios insulares), o cuyas características demográficas les hace candidatos con alta probabilidad de atender pacientes con sospecha de infección por el virus Ébola. Parece razonable que estos centros se provean del material señalado anteriormente y que realicen las gestiones oportunas para el transporte de muestras diagnósticas ante la eventualidad de una demora en el traslado del paciente al hospital de referencia y fuera conveniente ganar tiempo para descartar o confirmar la sospecha.

¿Qué tipo de equipos de protección individual (EPIs) debe usar la persona encargada del transporte? ¿Y quien las recibe en el laboratorio?

Existen diferentes procedimientos en diferentes Comunidades Autónomas y diferentes hospitales de una misma Comunidad, adaptadas a las capacidades e infraestructuras de las diferentes instituciones. El microbiólogo debe formar parte del equipo de profesionales que participarán en la obtención, recepción, embalaje y transporte de la muestra que se remita al CNM como garante de la ausencia de contaminación externa de los embalajes secundario y exterior.

Con el fin de evitar el transporte de la muestra dentro del hospital, el microbiólogo se encontrará en las inmediaciones del área habilitada y de acceso restringido. Deberá participar llevando doble guante, protector facial completo (o gafas protectoras), bata impermeable de apertura trasera y calzas. Será el garante de comprobar que el tubo primario se introduce asépticamente en el envase secundario y terciario.

¿Dónde puedo obtener formación y entrenamiento sobre cómo vestirse y desvestirse?

Existen varias páginas *web* y videos de organismos oficiales, entre ellos la Organización Mundial de la Salud, que enseñan el proceso de vestirse y desvestirse con un sistema EPI para personas de bajo riesgo. También hay diferentes cursos de entrenamiento y protocolos de instituciones sanitarias de prestigio, siendo todos igualmente fiables.


En España, las autoridades sanitarias han organizado, a través del Instituto de Salud Carlos III, unos cursos de entrenamiento destinados a profesionales de hospitales de referencia quienes, a su vez, serán formadores en sus centros respectivos del personal que deba atender a estos pacientes. Cada centro debe asegurar la formación de su personal en función de sus características y posibilidades.

¿Debe asegurarse la cadena de frío para el envío de las muestras diagnósticas de EVE, como dice el informe del Ministerio?

El Ministerio de Sanidad recomienda el envío de muestras al CNM a 4°C, garantizando la cadena de frío. Sin embargo, tal y como recoge la OMS, esta recomendación no sería crítica si el transporte se realiza en menos de 24 horas, pudiendo efectuarse en este caso a temperatura ambiente.

¿Deben realizar los laboratorios de hospitales de referencia pruebas moleculares diagnósticas del virus Ébola?

En la actualidad, las muestras se deben centralizar en el laboratorio de referencia nacional (CNM, Instituto Carlos III). Sólo si el número de muestras se incrementara de forma notable se debería plantear la realización de las pruebas diagnósticas de EVE en los hospitales de referencia de cada Comunidad Autónoma, siempre y cuando reúnan las condiciones de bioseguridad exigibles.

	<p align="center">Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 9 de 16</p>
---	---	--

El diagnóstico molecular se debe realizar en laboratorios con nivel de contención 3 ya que, si bien la técnica en si misma puede llevarse a cabo en áreas con NBS2 utilizando muestras inactivadas, la inactivación se ha de efectuar en una zona NBS3 o utilizando una cabina cerrada clase III.

¿Conviene que los laboratorios descarten la malaria en pacientes que cumplen los criterios de caso en investigación?

En estos momentos, se debe enviar sangre para descartar infección por virus Ébola desde el hospital de referencia para EVE de cada Comunidad al Centro Nacional de Microbiología -CNM-, Instituto Carlos III, que es quien actúa como laboratorio de referencia, debiéndose solicitar a la vez las dos determinaciones cuando haya sospecha de paludismo (circunstancia común). La manipulación de la sangre se debe evitar en lo posible. No obstante, si el paciente cumple criterios de caso en investigación y se dieran circunstancias adicionales que pudieran demorar el diagnóstico de la malaria (territorios insulares dependientes del transporte aéreo, saturación del laboratorio de referencia, entre otras), debería reconsiderarse esta normativa general y llevar a cabo la prueba de detección de malaria en los laboratorios de los hospitales de referencia con las precauciones que se señalan más adelante.

¿Es segura la realización de las pruebas para malaria en pacientes que cumplen criterios de caso en investigación?

Esta pregunta está relacionada con la anterior. Debería realizarse en el CNM, con las salvedades antes señaladas. Si se dieran esas circunstancias, puede llevarse a cabo con seguridad en los hospitales de referencia si se adoptan las precauciones adecuadas. Se recomienda preferentemente la detección antigénica, que tiene menos manipulación. No deberían realizarse extensiones para tinción diagnóstica por el riesgo añadido de exposición, salvo que la extensión se lleve a cabo en cabina de seguridad clase II o superior y sea sometida a un proceso de inactivación apropiado dentro de la propia cabina.

La técnica de detección antigénica debería realizarse en la cabecera del paciente. Si no fuera posible, la muestra debe manipularse en cabina de seguridad biológica clase II o superior, utilizando una técnica microbiológica escrupulosa que minimice el riesgo de aerosolización, vertido o salpicaduras.


Todos los residuos generados en la investigación de malaria (puntas de pipeta, tarjeta diagnóstica, etc.) al igual que la muestra utilizada deben eliminarse con las máximas garantías de seguridad en un contenedor rígido de residuos que se cerrará inmediatamente y se entregará al gestor de residuos autorizado para ser incineradas, evitando demoras innecesarias

¿Se deben realizar pruebas microbiológicas basadas en cultivo celular?

Bajo ningún concepto, ni para el diagnóstico de EVE ni, indirectamente, en el contexto del diagnóstico de otras infecciones. El cultivo vírico está restringido estrictamente a instalaciones de NBS4, el máximo.

¿Deben procesarse muestras para diagnóstico y seguimiento en pacientes con EVE confirmada?

En este momento, el diagnóstico de EVE debe realizarse sólo en el CNM. Una vez confirmado éste, el seguimiento de la viremia se realizará en este mismo laboratorio según las pautas establecidas (ver más adelante). En caso de ser necesario procesar otro tipo de muestras distintas de la sangre con fines de seguimiento de esta infección, se hará previo acuerdo con el CNM.

	<p align="center">Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 10 de 16</p>
---	---	---

Para el diagnóstico de infecciones secundarias en un paciente diagnosticado de EVE, la recomendación general es utilizar tratamientos empíricos y, en consecuencia, evitar o restringir al máximo el procesamiento microbiológico. La excepción más realista sería el hemocultivo, que se manipulará en las condiciones que se detallan más adelante.

¿Podrían procesarse muestras procedentes de pacientes en investigación de EVE en analizadores convencionales de los laboratorios de Bioquímica y Hematología?

Aunque es probable que los sistemas de limpieza y descontaminación habituales en los autoanalizadores de Bioquímica y Hematología sean suficientes para eliminar el riesgo de transmitir el virus Ébola entre el personal, en estos momentos no se recomienda llevar a cabo estas determinaciones analíticas en laboratorios convencionales con carácter general, por la alarma que pudiera causar un accidente o una simple incidencia.

En el caso de ser ineludible realizarlas (por razones de urgencia clínica), las determinaciones y muestras a procesar deben ser las estrictamente necesarias. Se llevarán a cabo en los hospitales de referencia de cada Comunidad, puesto que es allí donde se deben ingresar a los pacientes en investigación. Estos laboratorios debieran de disponer de sistemas analíticos *point of care* situados en una sala especialmente habilitada, en las cercanías de la habitación de aislamiento del paciente, siempre minimizando el transporte y la manipulación de las muestras.

Otras recomendaciones básicas incluyen la limpieza y desinfección escrupulosas de las superficies y material en contacto con las muestras biológicas (ver apartado 3.2.) y evitar cualquier proceso que implique un riesgo de aerosolización (centrifugaciones, movimientos bruscos, etc.) Por último, es recomendable que en estos laboratorios existan protocolos escritos sobre bioseguridad y recordar a todo el personal que siempre se deben adoptar las precauciones universales cuando se manipula cualquier muestra biológica.


Si es necesario hacer un hemocultivo a un paciente con EVE, ¿cómo se recomienda realizarlo?

El número de muestras que se han de tomar al paciente sospechoso o diagnosticado de EVE, debe reducirse al mínimo imprescindible para su correcto manejo. Así mismo, debe evitarse el transporte de muestras por áreas del hospital diferente a donde está ubicado el paciente. En general, el tratamiento empírico adecuado con antipalúdicos y antibióticos suele ser suficiente para tratar las complicaciones infecciosas que puedan surgir.

No obstante, si excepcionalmente se hace necesario tomar hemocultivos, se han de utilizar frascos de plástico (nunca de vidrio), y en espera de los resultados de las pruebas de diagnóstico de EVE se mantendrán incubados en estufa a 35-37°C, en área cercana a la habitación del paciente. No incubar en aparatos de lectura automática. Nunca se deberá utilizar el tubo neumático para el transporte al laboratorio.

Tras conocer los resultados de diagnóstico de EVE, si estos son negativos, los frascos se procesarán como habitualmente se realice en el laboratorio. Si son positivos, el resto de procesamiento: pases ciegos, incubación, tinciones, etc., se debe realizar en un área con NBS3. Las placas en las que se realice el pase se deben sellar antes de incubar. Si se observa crecimiento en las placas, antes de pasar a pruebas de identificación se recomienda realizar un subcultivo en placas nuevas y trabajar a partir de este segundo subcultivo.

Se debe evitar realizar extensiones para tinciones; en caso necesario, se prepararán en el área con NBS3, fijar 30 min con metanol, seguido de 1 hora en calor seco a 90° para inactivar la muestra. Posteriormente, se pueden teñir y observar al microscopio como de costumbre.

	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 11 de 16</p>
---	--	---

¿Cuál es el momento de mayor capacidad infecciosa de las muestras procedentes de paciente con EVE?

Cuando el paciente está muy grave, en fase terminal y, sobre todo, en el momento de la muerte.

¿Cuántas pruebas diagnósticas de EVE (amplificación de ácidos nucleicos, PCR) son necesarias para considerar que un paciente con Ébola ha vencido la enfermedad?

Tras suspender toda medicación que pueda tener influencia sobre la carga viral, se han de obtener al menos 2 resultados negativos de muestras de sangre separadas 48 horas antes de considerar que la enfermedad por el virus Ébola se ha superado. Este hecho no implica que el paciente esté libre del virus (ver puntos siguientes)

Con dos resultados de PCR negativos en sangre, ¿el paciente está libre de virus o deben sugerirse otros tipos de muestras?

Siempre debe de realizarse la prueba, y ser negativa en dos ocasiones en otros líquidos corporales, antes de descartar definitivamente la contagiosidad de un paciente con EVE. Estas muestras son: heces, orina, saliva, exudados conjuntival y vaginal, semen y sudor. Se debe discutir con los facultativos responsables y el personal del CNM el protocolo de muestreo de seguimiento de forma individualizada para cada paciente.

¿Se deben manejar muestras (por ejemplo, orina) de un paciente con EVE confirmada después de que la carga viral en sangre se ha negativizado?


El cese de la viremia no supone que el virus se haya eliminado totalmente del organismo del paciente. En la fase de convalecencia, con el paciente ya sano, el virus puede seguir excretándose fuera del organismos por diferentes vías; en semen y secreciones vaginales, puede detectarse hasta 2-3 meses del inicio del cuadro clínico; en heces alrededor de 50 días; en publicaciones recientes en algún paciente se describe la detección del virus viable en orina 15 días después de la viremia negativa y del ARN vírico en sudor hasta 30 días después. Por lo tanto, a no ser estrictamente necesario, debe evitarse la manipulación de estas muestras en el primer trimestre tras el inicio del cuadro clínico.

¿Cómo se deben manejar y durante cuánto tiempo?

Por lo expuesto en la pregunta anterior, durante los 3 meses siguientes a la viremia sea negativa, es prudente restringir al mínimo imprescindible el manejo de muestras que contengan fluidos del paciente, y en su caso manipularlas como potencialmente infecciosas, dentro de cabinas de seguridad biológica tipo II con prácticas de NBS 3.

¿Qué tipo de point of care debería existir en la cabecera del paciente (bioquímica, hematología, detección antigénica de malaria, inactivación de las muestras)?

En los hospitales de referencia de las Comunidades Autónomas, debería existir una zona de laboratorio cercana a la zona de aislamiento del paciente y provista de garantías de seguridad biológica adecuadas para el procesamiento seguro de las muestras. Allí sólo deberían procesarse aquéllas que se consideren estrictamente necesarias para el manejo del paciente.

	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 12 de 16</p>
---	--	---

3.2. Sobre el procesamiento inadvertido de muestras de pacientes con criterios de caso en investigación o confirmado

¿Qué se debe hacer en el caso de haber procesado inadvertidamente en el laboratorio muestras de pacientes que cumplieran criterios de casos en investigación de EVE? ¿Y una vez confirmado?

Los laboratorios de microbiología no deben recibir ninguna muestra de un caso en investigación o confirmado para diagnóstico de virus de Ébola o para el diagnóstico diferencial, con las excepciones señaladas en la sección 3.1 de este documento. Preferiblemente, éstas debieran ser remitidas directamente desde la habitación del paciente, al Centro Nacional de Microbiología según protocolo del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

En el caso de que un paciente no fuera detectado en la puerta de entrada al hospital, se hubieran enviado muestras al laboratorio de Microbiología y éstas se hubieran procesado inadvertidamente, las actuaciones a realizar serán:


- Notificación urgente a los Servicios de Medicina Preventiva y de Prevención de Riesgos Laborales del hospital. Fuera de horario laboral, se debe contactar inmediatamente con el Jefe de Guardia.
- Realizar las actuaciones necesarias previamente consensuadas y protocolizadas con los Servicios anteriores y el Servicio de Urgencias dirigidas a:
 - Eliminar las muestras en doble bolsa cerrada herméticamente. Esta bolsa se debe verter en un contenedor de residuos del grupo III.
 - Determinar el circuito que han realizado las muestras.
 - Identificar el personal que ha estado en contacto y cuantificar el riesgo de infección. Valorar la clasificación del profesional como contacto de caso en investigación.
 - Proceder a la limpieza y desinfección de superficies.
 - Detectar y desinfectar el instrumental y aparatos donde se han procesado las muestras.

¿Cuál ha de ser la formación y composición de equipos de actuación tras el conocimiento de recepción y procesamiento inadvertido de muestras de pacientes que cumplieran criterios de casos en investigación de EVE?

Es conveniente formar un equipo de actuación, por turno laboral, tras el conocimiento de recepción y procesamiento inadvertido de muestras de pacientes que cumplieran criterios de casos en investigación de EVE, que podría estar compuesto inicialmente por dos técnicos de laboratorio y un especialista en Microbiología y Parasitología. La formación debe ser consensuada y realizada por los Servicios de Medicina Preventiva y de Prevención de Riesgos Laborales del hospital y referirse a la utilización de los EPIs, la manipulación y eliminación de las muestras y a la limpieza de material y superficies contaminadas.

¿Qué se debe hacer con un hemocultivo que se está procesando inadvertidamente de un paciente con EVE?

Si el frasco aún no tiene resultado positivo en el incubador de lectura automática en el que se haya colocado, debe retirarse del mismo y pasar a incubarse en estufa situada en un área de acceso restringido del laboratorio, idealmente en una zona específica con NBS3 o, en su defecto,

	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 13 de 16</p>
---	--	---

puede utilizarse la zona destinada a investigación de micobacterias (que suele corresponder con el área más protegida).

Si se ha realizado algún subcultivo, se deben sellar las placas e incubarlas en una estufa situada en zona mencionada anteriormente.

Si se han realizado tinciones manualmente, eliminar los portaobjetos utilizados en un contenedor rígido al efecto y descontaminar objetivos y platina del microscopio usado, con un antiséptico de superficie. Si se ha utilizado un teñidor automático, se procederá a la descontaminación del mismo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El riesgo de contagio para el personal de laboratorio, si se han seguido las normas de seguridad básicas en el procesamiento de estas muestras, es muy bajo y como tal debe contemplarse.

¿Qué hacer si, inadvertidamente, se han inoculado cultivos celulares con fines diagnósticos de otras infecciones víricas en un paciente con EVE?

Se debe poner en conocimiento del responsable del laboratorio esta incidencia y atender a sus instrucciones. Es obligado usar, en todo momento, los EPIs adecuados (bata de apertura posterior y capucha o mono con capucha, calzas, pantalla facial, mascarilla FFP3 o FFP2 y dobles guantes). El operador deberá mantener la serenidad antes de comenzar a actuar. La zona será cerrada a cualquier circulación. Bajo ningún concepto se abrirán los viales o recipientes que contengan los cultivos virales.

En primer lugar, se debe proceder inmediatamente a la destrucción de los cultivos, eliminando todos los materiales en un contenedor para residuos de tipo III, que se cerrará a continuación y se entregará al gestor de residuos autorizado para su destrucción. A continuación se debe hacer un recuento de los materiales, instrumentos o superficies que han podido estar en contacto, para proceder a su descontaminación rigurosa, tal como se especifica a continuación


¿Cómo se realiza la descontaminación en caso de procesamiento inadvertido de muestras de pacientes con EVE?

La limpieza de las superficies y objetos con un paño impregnado en una solución de hipoclorito sódico recién preparada sería suficiente. La OMS recomienda el uso de una dilución 1:10 de lejía comercial doméstica (4-5% de cloro activo [40-50 g/L]; la concentración final es de 4000-5000 ppm) empapando el área y dejando actuar 10 minutos. En superficies que pueden corroerse o decolorarse, se debe utilizar una dilución 1:100 (concentración final, 400-500 ppm) durante más de 10 minutos. A este procedimiento se puede añadir, si las muestras han sido procesadas en campana, la exposición posterior a luz UV. Otros desinfectantes válidos pueden ser:

- Ácido acético al 3%.
- Glutaraldehído 1% durante 10 minutos.
- Productos basados en alcohol (metanol, etanol, isopropanol), en diluciones 1:10 a 1:100 durante, al menos, 10 minutos.
- Hipoclorito de calcio.

¿Cómo se deben inactivar las muestras de pacientes con EVE?

La inactivación se debe hacer en un entorno de NBS3 que permita una posterior manipulación segura en un laboratorio con NBS2. Las soluciones de lisis compuestas con sales de guanidina (isotiocianato o tiocianato de guanidinio) han demostrado su eficacia en la inactivación de virus

	<p>Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 14 de 16</p>
---	--	---

RNA envueltos, desestabilizando la envuelta viral, eliminando las nucleasas celulares y respetando la estructura del RNA para análisis posteriores. Por tanto estas sales están indicadas para la inactivación previa al diagnóstico mediante ensayos de PCR. También existe evidencia de la efectividad de métodos basados en Trizol®, un producto comercial con sales de guanidina y fenol, como procedimiento de inactivación.

Para análisis bioquímicos se recomienda la inactivación mediante calentamiento a 60°C durante 1 h. A esta temperatura, las determinaciones de sodio, potasio, magnesio, urea, creatinina, ácido úrico, bilirrubina, glucosa y proteína C reactiva no se afectan significativamente. Sin embargo, las determinaciones de fosfatasa alcalina, GPT, GGT o CK sí se ven afectadas por el calor. Para las pruebas serológicas se recomienda calentar a 57°C durante 1 hora, ya que a 60°C se agregan las moléculas de IgG.

Otro método de inactivación del virus en el suero y otros líquidos orgánicos es el tratamiento con el detergente Triton® X-100 (10 µL de Triton® X-100 por 1 mL de suero. En una hora se reduce de forma significativa el título de virus, aunque no se debe asumir un 100% de eficacia, por lo que se debiera usar asociado a tratamiento con calor. Hay que tener en cuenta que puede alterar aquellas pruebas donde es necesaria la preservación celular.

¿Cómo podemos minimizar el riesgo de infección ante la posibilidad de procesar inadvertidamente en el laboratorio muestras de pacientes que cumplan criterios de casos de investigación de EVE?


En los Servicios de Microbiología siempre ha existido el peligro de procesar muestras con la presencia potencial de microorganismos altamente patógenos. La protección eficaz de los profesionales siempre ha consistido en un seguimiento estricto de las precauciones universales y, en el caso del virus de Ébola, de todas aquellas dirigidas a evitar el contacto con microorganismos patógenos de transmisión parenteral, cutánea y mucosa. Todos estos aspectos se hayan recogidos en el Procedimiento de Microbiología 10a (Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. En resumen, los 5 aspectos más importantes son:

- Considerar toda muestra con potencial peligro de transmitir microorganismos altamente patógenos.
- Utilizar siempre medidas de protección personal: guantes; ropa de trabajo y, si es necesario por la posible generación de aerosoles, protección respiratoria y ocular.
- Manipular las muestras en cabinas de bioseguridad.
- Evitar la creación de aerosoles.
- En caso de exposición avisar inmediatamente al inmediato superior y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales.

¿Cómo se deben descontaminar los autoanalizadores en los que se han procesado inadvertidamente muestras de pacientes con EVE?

Los rotores y las cubetas de centrifuga deben esterilizarse en autoclave o mediante inmersión en glutaraldehído al 1% durante 10 minutos en un recipiente sellado.



Los autoanalizadores deben descontaminarse con hipoclorito sódico al 0,5% (5000 ppm; dilución 1:10 de lejía comercial doméstica) durante varios ciclos de lavado y las superficies externas deben limpiarse igualmente con hipoclorito sódico al 0,5%. Si los fabricantes recomiendan un procedimiento de descontaminación alternativo, entonces debe verificarse su actividad frente a

	<p align="center">Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 15 de 16</p>
---	---	---

virus productores de fiebres hemorrágicas. Si el proceso es activo para la inactivación de los virus de las hepatitis C o B, entonces también lo es para los virus productores de fiebres hemorrágicas.

¿En qué condiciones y cuánto tiempo sobrevive el virus Ébola en superficies?

El virus Ébola necesita un reservorio (organismo humano o animal) para sobrevivir y multiplicarse, o bien un cultivo celular adecuado para ello. No tiene facilidad de mantenerse en el ambiente, a no ser en gasas o vendas húmedas, y pierde su virulencia fuera del organismo de manera paulatina. Sobrevive durante poco tiempo en superficies que están al sol o que se han secado. A temperatura ambiente y condiciones de humedad normales, la viabilidad puede mantenerse por más de 24 h. Puede sobrevivir varios días a 4°C o de manera indefinida por congelación a la temperatura de -70°C o inferior (hay que tener presente que no se hayan archivado muestras inadvertidamente). El lavado de ropa a altas temperaturas (>60°C) o la incineración de cualquier material aseguran la eliminación del virus.

 	<p align="center">Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el virus Ébola</p>	<p>Código: GEGMIC 01 Versión: 1 Fecha: 01-12-14 Página: 16 de 16</p>
---	---	---

4. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedraza E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. En: Pérez Sáenz JL (coord.). Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica (Procedimiento 10a). Madrid. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

American Society for Microbiology. Interim laboratory guidelines for handling/testing specimens from cases or suspected cases of hemorrhagic fever viruses, 2nd version. 10 September 2014.

Blow JA, Dohm DJ, Negley DL, Mores CN. Virus inactivation by nucleic acid extraction reagents. Journal of Virol Methods. 2004; 119:195-8.

Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance for managing patients with suspected viral hemorrhagic fever in US hospitals. 2005.

Centers for Disease Control and Prevention. Ebola (Ebola Virus Disease). <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/index.h=tml>. Último acceso: 19 de noviembre de 2014.

Kreuels B, Wichmann D, Emmerich P, et al. A case of severe Ebola virus infection complicated by gram-negative septicemia. N Eng J Med. 2014; DOI: 10.1056/NEJMoa1411677.

Ministerio de Empleo y Seguridad Social. Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo. Fichas de agentes biológicos. Virus Ébola. <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos>. Último acceso: 19 de noviembre de 2014.

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Protocolo de actuación frente a casos sospechosos de enfermedad por virus Ébola (EVE). Documento de 26 de noviembre de 2014.

Organización Panamericana de la Salud. Procedimientos generales para inactivación de muestras potencialmente infecciosas con el virus Ébola y otros agentes virales altamente patógenos. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=27982&Itemid=270. Último acceso: 18 de noviembre de 2014.

Public Health England. Summary guidance for acute trust staff: frequently asked questions on laboratory testing of samples from patients with possible Ebola virus disease. London: PHE Publications. Gateway No: 2014290; Agosto 2014.

UpToDate. Diagnosis and treatment of Ebola and Marburg virus disease. <http://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-treatment-of-ebola-and-marburg-vir>. Último acceso 19 de noviembre de 2014.

WHO/OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ª ed. Génève: World Health Organization. 2005. ISBN 92 4 354650 3.

WHO/OMS. Laboratory guidance for the diagnosis of Ebola virus disease. Interim recommendations. 19 September 2014.