

# Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



67.

## El laboratorio de Microbiología en respuesta al bioterrorismo

### Editores

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

### Coordinador

Amparo Fernández Rodríguez

### Autores

Alberto Delgado-Iribarren  
García-Campero  
Amparo Fernández Rodríguez  
Carmen Ybarra de Villavicencio  
Isabel Jado García



ISBN: 978-84-09-22265-0

**EDITORES:**

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.  
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

**SUGERENCIA DE CITACIÓN:**

Delgado-Iribarren A, Fernández Rodríguez A, Jado García I, Ybarra de Villavicencio C. El laboratorio de Microbiología en respuesta al bioterrorismo. 2020. 67. Amparo Fernández Rodríguez (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2020.

**AVISO:**

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web [www.seimc.org](http://www.seimc.org)”

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

## 67. El laboratorio de Microbiología en respuesta al bioterrorismo. 2020

Coordinadora:

Amparo Fernández Rodríguez<sup>1</sup>

Autores:

Alberto Delgado-Iribarren García-Campero<sup>2</sup>

Amparo Fernández Rodríguez<sup>1</sup>

Isabel Jado García<sup>4</sup>

Carmen Ybarra de Villavicencio<sup>3</sup>



<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología. Servicio de Biología. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Microbiología. Fundación Hospital Alcorcón. Alcorcón (Madrid). <sup>3</sup>Unidad de Aislamiento de Alto Nivel (UAAN). Unidad NRBQ-Infecciosas Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. Madrid. <sup>4</sup>Sistema de Respuesta Rápida. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda (Madrid).

## INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	5
1.1.	Conceptos básicos en bioterrorismo.....	5
1.2.	Evaluación de la amenaza y el riesgo de un ataque con armas biológicas.....	6
1.3.	La producción de armas biológicas.....	6
1.4.	Dispersión de las armas biológicas.....	6
1.5.	Cómo sospechar un ataque con armas biológicas.....	7
2.	El bioterrorismo a lo largo de la historia .....	8
2.1.	Uso de armas biológicas en la antigüedad .....	8
2.2.	Uso durante el siglo XX.....	8
2.3.	La perspectiva cambiante con respecto a la amenaza de las armas biológicas.....	10
3.	Clasificación de los principales agentes de bioterrorismo.....	11
4.	Descripción de los principales agentes biológicos (ver Anexo I).....	13
4.1.	Principales agentes biológicos objeto de análisis en un sistema nacional de alertas, razones para su inclusión.....	13
5.	Alerta sanitaria de bioterrorismo.....	14
5.1.	Sistemas de respuesta rápida ante posibles alertas sanitarias.....	14
5.2.	La Red de Laboratorios de Alerta Biológica (RE-LAB).....	15
6.	Diagnóstico diferencial en bioterrorismo.....	16
7.	Recogida de muestras, envasado y transporte ante una amenaza biológica.....	16
7.1.	Recomendaciones genéricas.....	16
7.2.	Muestras clínicas.....	19
7.3.	Regulaciones en el transporte.....	19
7.4.	Recogida de muestras medioambientales.....	22
8.	Alerta biológica en el laboratorio de Microbiología.....	23
8.1.	Actuación ante una amenaza biológica. Circuito de comunicación de incidente.....	23
8.2.	Sistema de calidad para el manejo en el laboratorio de una muestra con sospecha de contener un agente biológico.....	24
8.3.	Diagnóstico de laboratorio de los agentes biológicos.....	25
8.4.	Diagnóstico <i>point-of-care</i> .....	28
9.	Bioseguridad y bioprotección en los laboratorios.....	29
10.	Microbiología forense y bioterrorismo. Concepto de cadena de custodia.....	32
11.	Sistemas de aseguramiento de la calidad en los laboratorios de referencia.....	32
11.1.	Acreditación de métodos.....	32
11.2.	Ejercicios inter-laboratorios europeos y tendencias actuales en bioseguridad.....	33
12.	Bibliografía.....	33

## DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-BT-01. Detección de ADN de *Bacillus anthracis* mediante PCR en tiempo real

PNT-BT-02. Detección de ADN de *Yersinia pestis* mediante PCR en tiempo real

# 1. INTRODUCCIÓN

El posible empleo de agentes biológicos como armas bioterroristas representa en la actualidad una amenaza preocupante. Quizá el episodio más mediático de los últimos tiempos ocurrió en el 2001 cuando se difundió una pequeña cantidad de cartas con esporas de *Bacillus anthracis* en Estados Unidos (en adelante EEUU), seguido de múltiples falsos envíos en muchos países incluyendo España. Aunque solo contrajeron la enfermedad 22 personas, el miedo y la concienciación sobre el tema se extendieron por todo el mundo.

A pesar de ello, existe una creencia generalizada por parte de la sociedad a considerar improbable la utilización de estos agentes con fines delictivos. Dicha creencia se halla fundada en su dificultad de dispersión, en que para su producción se requiere un alto nivel tecnológico y en su teórica capacidad para afectar a un número elevado de individuos, lo que la haría moralmente reprobable. No obstante, muchos de los expertos en terrorismo consideran que la liberación de uno o más agentes biológicos es inevitable a medio o largo plazo. La liberación y propagación de un agente altamente contagioso como el virus de la viruela podría causar una catástrofe mundial, y también sería grave la diseminación a gran escala de un agente altamente letal como las esporas de *Bacillus anthracis* o la toxina botulínica. Además, el empleo de agentes modificados genéticamente podría suponer un escalón más en esta amenaza. Aunque los países más desarrollados están trabajando en medidas de prevención rápidas y efectivas frente a estos agentes, el grado de preparación varía entre los mismos, incluso dentro de la Unión Europea, mientras que otros países menos desarrollados no han promovido ninguna medida para enfrentarse a estos desafíos. Más allá del ámbito nacional, las autoridades y comités internacionales deben ser conscientes del potencial peligro de estos agentes para ayudar a establecer programas de actuación coordinados entre los distintos países.

En este documento revisaremos los principales agentes biológicos que pueden ser empleados como armas biológicas (en adelante ambos términos se designarán AB) y la labor de los laboratorios de Microbiología Clínica ante un supuesto ataque bioterrorista.

## 1.1. CONCEPTOS BÁSICOS EN BIOTERRORISMO

Bioterrorismo es el término utilizado para definir el empleo criminal de microorganismos patógenos, toxinas o sustancias dañinas contra la población con el propósito de generar enfermedad, muerte, pánico y terror. Hablamos de biocrimen cuando se comete un hecho delictivo empleando como arma un microorganismo o alguno de sus productos tóxicos.

Son muy numerosos los agentes infecciosos y toxinas que pueden causar grandes daños a la población, pero pocos poseen, entre otras, las características de virulencia o contagio que los conviertan en AB. Cada año se producen innumerables brotes de enfermedades infecciosas en todo el mundo, algunos transportados en agua o alimentos, otros transmitidos por vía respiratoria o vectores. Todos son de origen natural, no intencionados. Salvo el virus de la gripe o la pandemia por SARS-Coronavirus-2, la mayoría de estos brotes son pequeños y no causan mayor alarma si se controlan adecuadamente. Para evaluar los organismos biológicos de mayor preocupación se utilizan dos elementos críticos que son la estimación de amenazas y de riesgos.

## 1.2. EVALUACIÓN DE LA AMENAZA Y EL RIESGO DE UN ATAQUE CON ARMAS BIOLÓGICAS

Para la designación de un microorganismo potencialmente peligroso como amenaza se deben tener en cuenta su probabilidad de producir un ataque, las posibles vulnerabilidades que predigan el éxito de éste y la capacidad de un adversario para adquirir, producir y difundir un agente.

Una adecuada estimación de riesgos deberá valorar entre otras cosas la incidencia de enfermedad y de otros efectos adversos, así como las posibles respuestas al ataque. Dicha estimación permitirá responder

las preguntas críticas necesarias para transmitir la información a la población y a los responsables de la toma de decisiones políticas.

En 1998, en EEUU se creó un Grupo sobre Biodefensa Civil que estableció que los agentes que constituían una mayor amenaza deberían ser aquellos que, en circunstancias epidémicas, podrían amenazar el funcionamiento social. Este grupo estaba formado por expertos federales de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y del Instituto de Investigación Médica del Ejército de EEUU (*United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*, en adelante USAMRIID). Los factores que se tuvieron en cuenta para ello fueron: la magnitud de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad, el contagio, la dosis infectiva, la disponibilidad de medidas terapéuticas o preventivas, las dificultades en el diagnóstico, la viabilidad de la obtención y el crecimiento de organismos, su estabilidad medioambiental y la probable respuesta de la población a una epidemia históricamente temida, como la peste o la viruela.

Con estos datos, finalmente, se consideraron seis los agentes de mayor amenaza, para los que deberían desarrollarse medidas preventivas para responder a un ataque. Estos son los causantes de las siguientes enfermedades: viruela, ántrax, peste, intoxicación por toxina botulínica, tularemia y fiebres hemorrágicas víricas. Al tratarse de infecciones de muy baja prevalencia en nuestro medio hasta la fecha, se puede mejorar notablemente su conocimiento, siendo aconsejable y necesario el desarrollo de programas de formación e investigación. Algunos meses después el CDC ratificó los agentes de mayor preocupación, que ahora se conocen comúnmente como agentes de Categoría A. Se identificó un grupo de menor prioridad, que se etiquetó como agentes de Categoría B. Se compiló una lista de Categoría C que incluía patógenos emergentes.

### 1.3. LA PRODUCCIÓN DE ARMAS BIOLÓGICAS

Aunque los microorganismos a emplear como AB son relativamente poco frecuentes, no es difícil que un potencial terrorista los adquiera. Una posible fuente de estos agentes podría ser el propio personal que haya trabajado en alguno de los programas estatales de armamento, como el antiguo programa soviético de AB. Algunos de los científicos participantes en estos programas se trasladaron a otros países que podrían estar desarrollando sus propios programas de AB, existiendo la posibilidad de que llevaran muestras de AB con ellos, aunque no hay certeza de ello. Otras fuentes para obtener AB podrían ser los casos o brotes que de forma natural tienen lugar en la actualidad en muchas zonas del mundo (peste, ántrax, tularemia y botulismo). Aunque los microbiólogos conservan las cepas congeladas en ocasiones como material de referencia, sería recomendable crear registros nacionales e internacionales de las cepas disponibles en cada laboratorio que permitan la trazabilidad en caso de un brote relacionado con estos agentes.

La producción de AB es más simple y menos costosa que la de armas nucleares. Para muchos de los agentes de categoría A la producción es razonablemente sencilla y si no se tienen los conocimientos, se pueden encontrar en Internet con facilidad. En particular, se requiere relativamente poco espacio, y para la mayoría de los agentes, se necesitan aerosoles en cantidades relativamente pequeñas para producir un gran número de víctimas.

En 1999, la Agencia de Reducción de Amenazas de Defensa (*Defense Threat Reduction Agency*, o DTRA) a través del proyecto BACCHUS (*Biotechnology Activity Characterization by Unconventional Signatures*) determinó que sería relativamente simple para un terrorista ensamblar una instalación de producción de un AB sin ser detectado.

### 1.4. DISPERSIÓN DE LAS ARMAS BIOLÓGICAS

Los métodos más comunes para dispersar AB son la contaminación de los suministros de agua o alimentos y la dispersión de aerosoles. Existe un consenso general que apunta a los aerosoles como la amenaza más grave para la población civil, puesto que los organismos dispersos por otros medios, si bien podrían causar brotes, tendrían menor capacidad de producir situaciones epidémicas en proporciones que representarían una amenaza para la integridad de la población o de emergencia para la Salud Pública.

Los agentes de mayor amenaza pueden diseminarse en un aerosol de partículas en rango de 1 a 5 micras, penetran profundamente en el pulmón a diferencia de las de mayor tamaño, que quedan atrapadas

en las vías aéreas superiores. Por otra parte, las partículas en aerosol pueden permanecer suspendidas y viables durante muchas horas o días. En el brote de ántrax de Sverdlovsk se infectaron pacientes a una distancia de hasta 4 km del punto de liberación, e incluso se describieron casos en animales que estaban a 50 km de distancia.

La generación de un aerosol es relativamente sencilla, existiendo muchos dispositivos disponibles en el mercado: pulverizadores de pintura, máquinas de nebulización de insecticidas, atomizadores pequeños de perfume y dispositivos portátiles de suministro de medicamentos. También las propias circunstancias medioambientales o incluso pequeñas liberaciones de un agente, casi con certeza darían lugar a una seria preocupación pública, como se observó durante la liberación de esporas de *B. anthracis* en EEUU en 2001. Las liberaciones repetidas en diferentes partes del país podrían producir una devastación similar a armas nucleares, especialmente si la respuesta de Salud Pública fuera deficiente. La Oficina de Evaluación Tecnológica estimó que, si se liberaran 100 kg de esporas de ántrax a favor del viento de Washington DC mediante un avión fumigador, se producirían entre 130.000 y 3 millones de muertes.

Aunque son comprensibles las preocupaciones por la contaminación de los depósitos de agua, la mayoría de los agentes de mayor amenaza no se pueden diseminar por este medio. Para aquellos que pueden serlo, se requerirían cantidades enormes del agente para contaminar un depósito e infectar a la población.

En cuanto a la contaminación de los alimentos, la principal amenaza es la toxina botulínica, que, aunque plausible, presenta dificultades para producirse en cantidad y con un elevado nivel de pureza. Su utilización causaría un gusto desagradable y, además, también resulta difícil mantener su estabilidad en los alimentos. Por otra parte, debido al inicio temprano de la acción de la toxina en humanos, produciendo síntomas clínicos característicos, el diagnóstico de los casos y la identificación de los productos contaminados podría resultar rápida, por lo que su éxito en la utilización como AB a consecuencia de este ataque sería poco probable.

## 1.5. CÓMO SOSPECHAR UN ATAQUE CON ARMAS BIOLÓGICAS

El primer indicador que se va a producir es un aumento insospechado de casos de una enfermedad, que se debe estudiar con métodos epidemiológicos diseñados para detectar un posible ataque con AB. Documentar la población afectada, las posibles rutas de exposición, signos y síntomas de enfermedad, junto con la identificación rápida de laboratorio de la causa, es fundamental para preparar una respuesta de Salud Pública.

Un brote producido por un ataque con AB puede resultar similar al de cualquier brote natural de naturaleza infecciosa, pero la vigilancia, la respuesta, y la necesidad de recursos indudablemente serán muy superiores. La investigación epidemiológica debe comenzar inmediatamente para dilucidar si el brote es intencional o no. Se inicia con la definición de caso para determinar el número de éstos y la tasa de ataque, siendo fundamental que esté basado en criterios objetivos. A continuación, se expone el decálogo de sospechas epidemiológicas para sospechar un ataque con AB:

- La presencia de una gran epidemia de una enfermedad o síndrome similar, o de múltiples epidemias simultáneas o seriadas de distintas enfermedades en una misma población.
- Aumento del número de casos de enfermedades o muertes inexplicables.
- Enfermedad más grave de lo que generalmente se espera para un patógeno específico o que no responde a la terapia habitual. Rutas de exposición inusuales para un patógeno (por ejemplo, por inhalación para enfermedades que normalmente ocurren a través de otras exposiciones).
- Una enfermedad que es inusual en un área geográfica o en la estación de transmisión o transmitida por un vector que no está presente en el área local.
- Un solo caso de enfermedad por un agente poco común (viruela, virus causantes de fiebres hemorrágicas), o una enfermedad inusual para un grupo de edad.
- Variantes de microorganismos o patrones de resistencia a los antimicrobianos diferentes de los que circulan, o de un tipo genético similar al de agentes aislados en diferentes tiempos o lugares.
- Mayores tasas de ataque en personas expuestas en ciertas áreas, como dentro de un edificio o de una empresa.
- Brotes de la misma enfermedad que ocurren en áreas no contiguas o bien un brote de enfermedad con impacto zoonótico.
- Notificación de un grupo terrorista o descubrimiento de AB.

## 2. EL BIOTERRORISMO A LO LARGO DE LA HISTORIA

Brevemente, se resumen los principales episodios del uso de AB a lo largo de la historia. Para mayor información se pueden consultar distintas fuentes, como Tucker 1999, o el Manual del USAMRIID de 2014, ambos mencionados en la bibliografía de este procedimiento.

### 2.1 USO DE ARMAS BIOLÓGICAS EN LA ANTIGÜEDAD

La historia de las AB puede remontarse al siglo VI antes AC cuando las tropas asirias envenenaron los pozos de sus enemigos con centeno contaminado con ergotamina. También los ejércitos romanos usaron cadáveres animales y humanos para contaminar las aguas, aunque es dudoso que estas medidas tuvieran un papel relevante. Una excepción fue la plaga de Caffensistera (siglo XIV), en el cerco de Kaffa (actualmente Feodosia) causada por cadáveres con peste negra traídos desde Asia por los mongoles que arrojaron a los genoveses, los cuales al huir extendieron la enfermedad por toda Europa. Algo similar hicieron los rusos en Suecia en 1710.

Está claro que la viruela se empleó como AB en América, aunque su introducción fue accidental por parte de Hernán Cortés en 1520, sufriendo los indígenas tasas de letalidad de alrededor del 70%. Posteriormente, la viruela fue empleada como AB usando fómites, en mantas y otras vestimentas, por franceses, españoles, ingleses y estadounidenses. En la guerra franco-británica (1754-1767) se documentó que oficiales británicos cogieron mantas de pacientes del Hospital de la Viruela y se las dieron a los indios. También durante los años de la Revolución Americana hubo intentos deliberados por parte de las fuerzas británicas de propagar la viruela, por ejemplo, en el asedio de Boston de 1775-1776.

### 2.2. USO DURANTE EL SIGLO XX

El uso potencial de otros patógenos como AB tuvo que esperar el desarrollo de la Microbiología moderna cuando los microorganismos pudieron ser identificados, cultivados y producidos en cantidad. En la primera mitad del siglo XX, los estados desarrollaron AB como parte de su armamento de guerra. Sin embargo, con la evolución posterior de las ciencias biológicas y microbiológicas, la infraestructura del estado ya no era esencial para la producción y difusión de AB, lo que agrega las palabras bioterrorismo y biocrimen a nuestro vocabulario.

El advenimiento de la Primera Guerra Mundial proporcionó el estímulo para el desarrollo de sistemas de armas "especiales", dirigiéndose la mayoría de los esfuerzos al desarrollo y la aplicación de armas químicas. Sin embargo, los científicos alemanes trabajaron con dos agentes destinados a su uso en animales que fueron el ántrax y el muermo. Los saboteadores alemanes, que trabajaban en países aliados, incluido Estados Unidos, se esforzaron por infectar caballos, mulas y ovejas, principalmente para impactar las operaciones de transporte y caballería. Se alegaban intentos de propagar el cólera en Italia y la peste en Rusia, pero probablemente no son creíbles. Aunque las AB no tuvieron especial repercusión en la Primera Guerra Mundial, por el contrario, los horrores de los efectos de la guerra química llevaron a desarrollar un tratado que prohibiría el uso futuro de productos químicos como armas ofensivas, que se hizo extensivo a las AB, proscribiendo el tratado de Ginebra de 1925 por primera vez en la historia el empleo de todas ellas.

El avance de la Microbiología cambió radicalmente el panorama en la Segunda Guerra Mundial. El alcance en ocasiones se conoce posteriormente, como sucedió con el programa japonés, pues se ofreció amnistía por crímenes de guerra por la información proporcionada. Esta información sirvió para impulsar la expansión de los programas de armamento biológico en varios países, incluidos EEUU, Reino Unido, Australia, Francia y Canadá, hasta que la Convención sobre AB y Toxinas entró en vigencia en 1972. En EEUU la investigación se desarrolló principalmente en Fort Detrick, Maryland, frente al ántrax, toxina botulínica, tularemia, brucelosis, fiebre Q, enterotoxina estafilocócica B y encefalitis equina venezolana. También investigaron en defensa (vacunas y antibióticos), dispersión y persistencia de AB y se realizaron avances técnicos que permitieron producción y almacenamiento a gran escala.

La era de la Guerra Fría fue prolífica en el desarrollo de AB, siendo insuficiente el tratado de Ginebra ya

mencionado por lo que se presentaron propuestas para un nuevo protocolo al Comité de Desarme de las Naciones Unidas en 1969. Finalmente se produjo la Convención sobre AB en 1972 que entró en vigor en 1975 y fue firmada por 103 naciones. Se acordó no desarrollar, producir, almacenar o adquirir o retener de otro modo agentes microbianos u otros agentes biológicos o toxinas, cualquiera sea su origen o método de producción, de tipos y en cantidades que no tengan justificación para fines profilácticos, protectores u otros fines pacíficos, así como armas, equipos o medios de dispersión diseñados para usar dichos agentes o toxinas con fines hostiles o en conflictos armados.

Durante los 27 años transcurridos entre el final de la Segunda Guerra y esta Convención, EEUU se vio envuelto en conflictos en Corea y Vietnam con acusaciones de empleo de AB además de las químicas bien documentadas.

Durante los años ochenta y noventa surgieron nuevas preocupaciones serias con respecto a la capacidad de las AB de la Unión Soviética. Al final de la Guerra Fría se supo que el programa de AB soviéticas era una empresa mucho más extensa y sofisticada de lo que se había imaginado. Se cree que 60.000 empleados trabajaban en la investigación de AB, superando a los que trabajaban en armas nucleares. La mayor instalación se llamaba VECTOR, en Koltsovo, Novosibirsk, que contaba con un complejo de 4.000 personas y 30 edificios con instalaciones de alta seguridad biológica, y se cree que solventaron los problemas técnicos para la producción a gran escala del virus de la viruela. Con la caída de la Unión Soviética, más de la mitad del personal científico dejó VECTOR, y, como se ha mencionado anteriormente, muchos de ellos fueron reclutados para trabajar en laboratorios en otras partes del mundo. En teoría, el laboratorio VECTOR y el CDC, contienen los únicos repositorios autorizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) del virus de la viruela. Otra instalación ubicada cerca de Moscú, en Sergiev Posad, fue el principal centro de producción de viruela de la Unión Soviética, capaz de producir más de 20 toneladas de virus de viruela al año, principalmente para su uso en misiles balísticos intercontinentales (cuyo acrónimo en inglés es ICBM). Es una instalación de alto secreto operada por el Ministerio de Defensa de la Federación de Rusia.

Se cree que a finales del siglo pasado siete países tenían programas de AB confirmados: Irán, Irak, Libia, Corea del Norte y Siria; o sospechosos: Cuba y Sudán. La Guerra del Golfo de 1990, se originó por la sospecha de que Iraq tenía un programa de AB sorprendentemente grande, del cual era responsable Hussein Kamal, yerno de Saddam Hussein, quien desertaría informando que habían producido y desplegado bombas, cohetes y aviones con tanques de pulverización que contenían *B. anthracis* y toxina botulínica, aunque nunca se han tenido evidencias certeras de estos eventos.

En cuanto al uso de AB, no respaldado por un estado determinado, se incluyen los casos de terroristas en apoyo de una ideología específica que incluye unas 881 víctimas, el 85% por un incidente de bioterrorismo y 130 (15%) por biocrímenes, 10 de los cuales fueron fatales. Afortunadamente muchos no tuvieron el efecto deseado en la población. Algunos ejemplos son:

- En 1984, miembros de la secta Rajneeshee contaminaron deliberadamente el contenido de las barras de ensaladas a lo largo de un tramo de una carretera interestatal de Oregón con *Salmonella Typhimurium* (751 casos, 45 ingresos y sin decesos)
- En 1995 en Japón, la secta Aum Shinrikyo, lanzó gas nervioso sarín en el metro de Tokio. Más tarde se descubrió que tenían planes para la utilización de AB, y de hecho rociaron un aerosol con *B. anthracis* en toda el área metropolitana de Tokio. No hubo víctimas, al utilizar una cepa vacunal atenuada. También viajaron a Zaire, en 1992, para tratar de obtener muestras del virus Ébola.
- En 2001 se produjeron varios envíos de sobres y paquetes postales conteniendo esporas de *B. anthracis* mencionado en el primer apartado, con gran repercusión a nivel mundial.
- Tras estos eventos, se produjeron varias amenazas con ricina (fitotoxina), la primera en Inglaterra en 2003 y varias en EEUU (Washington DC y Carolina del Sur) entre 2003 y 2004.

### 2.3. LA PERSPECTIVA CAMBIANTE CON RESPECTO A LA AMENAZA DE LAS ARMAS BIOLÓGICAS

Las preocupaciones sobre el uso potencial de las llamadas "armas de destrucción masiva" en el contexto de la Guerra Fría se centraron en las armas nucleares y el potencial resultado de un escenario de invierno nuclear. Las armas químicas ya habían cobrado protagonismo durante la Primera Guerra Mundial. La preocupación por las AB disminuyó tras la Convención de 1972 sobre la Prohibición, Producción y Almacenamiento de Armas Bacteriológicas (Biológicas) y de Toxinas y sobre su Destrucción (generalmente conocida como la Convención de AB, o la Convención de AB y de Toxinas, (CABT en español y BWC o BTWC en inglés), que instaba a la destrucción de todas las existencias de AB y al cese de la investigación sobre su uso como agentes ofensivos.

En la actualidad, los grandes avances de la biología moderna sobre el sistema inmune y la ingeniería genética pueden ser un arma de doble filo, contribuyendo por un lado a un mejor diagnóstico, pero también a la inclusión de nuevos AB o a empeorar la situación sobre los ya incluidos. La generación de bacterias multirresistentes, la alteración de las propiedades antigénicas para producir mutantes de escape vacunales, la modificación de la estabilidad medioambiental de las cepas y la transferencia de factores de patogenicidad son manipulaciones genéticas objeto de preocupación. Lo que en principio estaba reservado a laboratorios de alto nivel actualmente es posible llevarlo a cabo en otros centros menos especializados. Algunos ejemplos son:

- En el centro John Curtin de Australia agregaron un solo gen para el virus de la viruela del ratón y descubrieron que los ratones vacunados perdían su inmunidad, si bien no está claro que esto sea extrapolable a los humanos.
- Se ha publicado la manipulación de una cepa de *B. anthracis* para hacerla resistente a los antibióticos habituales.

Debería existir un cierto control sobre la experimentación en mutaciones que conduzcan a alteraciones en la inmunidad y/o a la generación de microorganismos panresistentes (resistencia a todos los antibióticos), especialmente en los incluidos en el listado de AB, sin menoscabar la necesidad de estudios que busquen la producción de vacunas más eficaces. Conocer con precisión el genoma de los microorganismos, que pueden causar daño a la población de forma intencionada, y cómo actúan, puede permitir la producción de vacunas o tratamientos más eficaces, pero al mismo tiempo puede suponer un arma de doble filo si se persiguen fines delictivos.

En EEUU, tras los ataques de 2001 de las torres gemelas, el Congreso aprobó la Ley Patriota y la Ley de Seguridad y Preparación y Respuesta ante el Bioterrorismo (USA PATRIOT Act, 2001 y *Public Health Security and Bioterrorism Preparedness and Response Act*, 2002) que penaliza la posesión de AB a menos que esté justificado, y prohíbe la posesión, el transporte y la recepción de AB. En 2009, el Presidente Bush firmó la Orden Ejecutiva 13486 "*Strengthening Laboratory Biosecurity in the United States*" para revisar la efectividad de las medidas de bioseguridad relacionadas con determinados AB.

En esa misma línea, el Consejo de Seguridad de las Naciones Unidas, preocupado por la amenaza del terrorismo y el riesgo de que agentes no estatales pudieran adquirir, desarrollar o emplear armas nucleares, químicas y biológicas o traficar con ellas, adoptó la "Resolución 1540" el 28 de abril de 2004.

En Europa, la Organización para la Seguridad y Cooperación en Europa (OSCE) adoptó en julio de 2010 una serie de Recomendaciones exhortando al desarrollo de planes nacionales para la mejor aplicación de la Resolución 1540, incluida la prevención de AB.

La Unión Europea, en el Consejo Europeo de 2008, aprobó unas Conclusiones sobre las "Nuevas líneas de actuación en la lucha contra la proliferación de las armas de destrucción masiva (nucleares, radiológicas, químicas y biológicas) y sus vectores". Cada estado miembro de la Unión Europea tiene el

compromiso de adoptar medidas tendentes a excluir la posibilidad de que los agentes biológicos se utilicen como armas y es responsable del mantenimiento de su seguridad nacional en materia biológica.

En España, dicho compromiso se materializa en el “Plan Nacional de Biocustodia”, aprobado en febrero de 2019 y cuyo objetivo es establecer las medidas necesarias para la custodia de los AB relevantes. Se establece una Comisión Nacional de Biocustodia para la supervisión y aplicación de dichas medidas.

### 3. CLASIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES AGENTES DE BIOTERRORISMO

Históricamente los CDC han clasificado los diferentes patógenos y toxinas que se consideran de interés en bioterrorismo en 3 categorías: A, B y C. La clasificación se realiza teniendo en consideración la facilidad con la que dichos patógenos podrían ser dispersados de forma intencionada, su mortalidad, las medidas necesarias para su control y el pánico provocado en la sociedad.

Categoría A: patógenos considerados de alta prioridad, ya que suponen un riesgo para la seguridad del estado. Son microorganismos que pueden ser fácilmente diseminados o transmitidos de persona a persona, tienen una mortalidad elevada, podrían causar pánico en la sociedad y requieren de una preparación especial y medidas de control complejas por parte de Salud Pública.

Categoría B: agentes de segunda prioridad. Incluye microorganismos que son relativamente fáciles de diseminar, tienen una morbilidad moderada, aunque su tasa de mortalidad sea baja y el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad requiere de capacidades de cierto nivel.

Categoría C: agentes de tercera prioridad. Se incluyen aquellos patógenos emergentes que podrían ser modificados para causar bajas masivas porque se pueden obtener fácilmente, su producción y diseminación es fácil y potencialmente podrían tener una alta mortalidad, morbilidad y suponer un problema de Salud Pública.

Esta clasificación es totalmente independiente de la clasificación de los agentes biológicos en base a sus posibles efectos sobre los trabajadores, que se recoge en los anexos del Real Decreto (RD) 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Dicho RD es a su vez una transposición de la Directiva 90/679/CEE, de 26 de noviembre, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a AB durante el trabajo y establece las disposiciones específicas mínimas en este ámbito; esta Directiva ha sufrido modificaciones para adaptarse a las novedades tecnológicas (Directiva 93/88/CEE, Directiva 95/30/CE, Directiva 2000/54/CE). En la última modificación, de 24 de octubre de 2019, Directiva (UE) 2019/1833 de la Comisión, se modifican los anexos I, III, V y VI.

Tanto en el RD como en las Directivas Europeas, la clasificación de todos los microorganismos se basa exclusivamente en el efecto de dichos agentes sobre los trabajadores sanos. Si bien se habla de agentes biológicos, en este caso no guarda ninguna relación con las armas biológicas o agentes de bioterrorismo (AB). Los diferentes grupos de agentes biológicos se definen a continuación:

Agente biológico del grupo 1: aquél que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre.

Agente biológico del grupo 2: aquél que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.

Agente biológico del grupo 3: aquél que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz.

Agente biológico del grupo 4: aquél que causando una enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaz.

Tabla 1. Clasificación del CDC (*Center for Diseases Control*) de los agentes biológicos\*

Categoría A	Categoría B	Categoría C
<i>Bacillus anthracis</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Francisella tularensis</i>  Variola major Filovirus: Ebola y Marburg Arenavirus: Lassa, Junin y Machupo  Toxina de <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i>	<i>Brucella species</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Salmonella spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Rickettsia prowazekii</i>  Alphavirus: Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Este y Encefalitis Equina del Oeste  Toxina del <i>Ricinus communis</i> Enterotoxina B estafilocócica T-2 Micotoxina Toxina épsilon de <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	Virus Nipah Hantavirus  <i>Mycobacterium tuberculosis</i> multirresistente  Fiebre amarilla

\*Adaptado de <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> (última modificación del CDC en 2018)

En EEUU, las Agencias Federales de Salud Pública (*US Department of Health and Human Services – DHHS*) y Agricultura (*US Department of Agriculture – USDA*) son responsables del Programa Federal para Agentes Relevantes (*Federal Select Agent Program -FSAP*). El FSAP surgió en 2001 (*USA PATRIOT Act* de 2001) para regular la posesión segura, el uso y la transferencia de microorganismos y toxinas que tienen el potencial de representar una amenaza grave para la salud pública, animal o vegetal, o para productos animales o vegetales en los EEUU. Este programa es el responsable de determinar qué microorganismos y toxinas forman parte de los Agentes Biológicos y Toxinas Relevantes (*Biological Select Agents and Toxins –BSATs*), siguiendo los siguientes criterios:

- El efecto sobre la salud humana causado por la exposición al agente o toxina;
- El grado de contagio del agente o toxina y los métodos por los cuales el agente o la toxina se transfieren a los humanos;
- La disponibilidad y efectividad de farmacoterapias e inmunizaciones para tratar y prevenir cualquier enfermedad resultante de la infección por el agente o la toxina; y
- Cualquier otro criterio, incluidas las necesidades de los niños y otras poblaciones vulnerables que se considere apropiado.

Esta lista, revisada cada 2 años, contiene actualmente 67 elementos que se clasifican en 4 grupos, dependiendo de su repercusión sobre los humanos, animales y plantas:

**- Agentes relevantes y toxinas con repercusión sobre humanos** (*HHS Select Agents and Toxins*): abri-na, *Bacillus cereus* Biovar *anthracis*, neurotoxina botulínica, conotoxinas, *Coxiella burnetii*, virus Crimea-Congo, diacetoxyscirpenol, virus de la Encefalitis Equina del Este, virus Ebola, *Francisella tularensis*, virus Lassa, virus Lujo, virus Marburg, virus de la viruela del mono, virus reconstruido Influenza 1918, ricina, *Rickettsia prowazekii*, SARS (por sus siglas en inglés, *Severe Acute Respiratory Syndrom*)- asociado a coronavirus (SARS-CoV), saxitoxina, virus de las fiebres hemorrágicas de Sudamérica (Chapare, Guanarito, Junin, Machupo y Sabia), enterotoxinas estafilocócicas (subtipos A,B,C,D,E), micotoxina T-2, tetrodotoxina, flavivirus (encefalitis por picadura de garrapata), virus Kyasanur Forest, Omsk hemorrhagic fever virus, virus Variola major, virus Variola minor, *Yersinia pestis*.

- **Agentes relevantes y toxinas que afectan a humanos y/o animales y/o plantas** (*Overlap Select Agents and toxins*): *Bacillus anthracis*, *Bacillus anthracis Pasteur strain*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, virus Hendra, virus Nipah, virus del Valle del Rift, virus de la Encefalitis Equina de Venezuela.

- **Agentes relevantes con efecto sobre animales y plantas** (*USDA Select Agents and Toxins*): virus African horse, virus African swine, virus influenza aviar, virus Classical swine fever, virus Foot-and-mouth disease, virus Goat pox, Lumpy skin disease virus, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides*, Newcastle disease virus, *Peste des petits ruminants virus*, Rinderpest virus, *Sheep pox virus*, *Swine vesicular disease virus*.

- **Agentes relevantes con efecto sobre plantas que requieren cuarentena y protección** (*USDA Plant Protection and Quarantine –PPQ– Select Agents and Toxins*): *Coniothyrium lycines*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Rathayibacter toxicus*, *Sclerophthora rayssiae*, *Synchytrium endobioticum*, *Xanthomonas oryzae*.

## 4. DESCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES AGENTES BIOLÓGICOS (ver Anexo I)

La descripción de los principales AB se presenta en forma de tabla (ver anexo I. Modificado de Medical Aspects of Biological Warfare. Ed Joel Bozne, 2018).

### 4.1. PRINCIPALES AGENTES BIOLÓGICOS OBJETO DE ANÁLISIS EN UN SISTEMA NACIONAL DE ALERTAS, RAZONES PARA SU INCLUSIÓN

En los últimos años, hemos asistido a una creciente preocupación debido a la amenaza derivada del potencial uso de AB en conflictos locales o internacionales. Por ello, las autoridades sanitarias de un gran número de países han puesto en marcha programas de Vigilancia Epidemiológica y Respuesta Rápida frente a las enfermedades infecciosas emergentes o reemergentes, ya sean debidas a procesos naturales o por liberación intencionada. Como ya se ha mencionado anteriormente, el envío de cartas con esporas del agente causante del ántrax en EEUU en 2001, tras los graves atentados de las Torres Gemelas, ocasionó varias muertes, causó pánico e incluso tuvo repercusiones negativas a nivel económico. Por tanto, es lógico pensar que los efectos de un ataque masivo podrían tener consecuencias muy relevantes. En muchos países éste fue el punto clave que marcó el inicio de la toma de medidas encaminadas a la preparación y respuesta ante cualquier amenaza biológica. En este sentido, el diagnóstico microbiológico que permite la identificación del agente resulta fundamental a la hora de tomar de decisiones y medidas de control.

En el Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), situado en Majadahonda (Madrid), en los últimos años se han creado y desarrollado todas las herramientas necesarias para responder eventualmente a cualquier amenaza de Salud Pública que se pueda presentar. En la actualidad el ISCIII dispone de:

- a) Sistema de vigilancia epidemiológica adecuado para la detección precoz de casos relacionados con agresivos biológicos.
- b) Laboratorios especializados que disponen de técnicas microbiológicas de diagnóstico rápido permitiendo la identificación rápida de agentes que potencialmente puedan utilizarse como armas biológicas.
- c) Redes de trabajo y centros de coordinación a nivel nacional e internacional.
- d) Sistemas de respuesta rápida ante posibles alertas sanitarias.

## 5. ALERTA SANITARIA DE BIOTERRORISMO

### 5.1. SISTEMAS DE RESPUESTA RÁPIDA ANTE POSIBLES ALERTAS SANITARIAS

Ante los eventos acaecidos a principios de este siglo: la liberación de cartas postales con esporas de *B. anthracis* en 2001 y la descripción de un nuevo coronavirus altamente patógeno, causante del SARS en 2003, la mayoría de los países de nuestro entorno fueron conscientes de las deficiencias en la preparación, coordinación y respuesta rápida ante estos nuevos tipos de amenaza para la Salud Pública. Por ello, en España se creó en 2003 una Unidad de Alertas y Emergencias en el ISCIII con capacidad para enfrentarse a este tipo de situaciones. Sin embargo, fue en 2014 cuando realmente se implementó un Sistema de Respuesta Rápida (SRR) con capacidad de actuación 24h/7días/365 días al año. La iniciativa surgió a partir de la gran epidemia de enfermedad por virus Ébola (EVE) en países del África occidental y la necesidad de responder de forma adecuada ante la posible importación de casos infectados que podían generar una gran alarma social. Este sistema se ha ido reforzando, incrementándose las técnicas de detección en función de las necesidades que varían en el tiempo a nivel nacional, regional y global. Se trata, por tanto, de un sistema flexible preparado para responder eventualmente ante cualquier amenaza ocasionada por un microorganismo patógeno o un potencial agente bioterrorista. Está formado desde su inicio por 6 titulados superiores (TS) y 6 técnicos de laboratorio (TL), que se organizan en parejas: 1 TS y 1 TL que realizan guardias localizadas de 1 semana durante 24h/7días, encontrándose operativo los 365 días del año. Actualmente, la cartera de servicios del SRR engloba la detección rápida de los siguientes agentes:

- a) Bacterias de potencial uso en bioterrorismo: *B. anthracis* y *Y. pestis*.
- b) Virus altamente patógenos:
  - i. Virus causantes de fiebres hemorrágicas (Ébola, Marburg, Crimea-Congo y Lassa).
  - ii. Virus de la viruela humana, viruela del mono y otros orthopoxvirus.
  - iii. MERS-CoV y SARS-CoV-2.
- c) Toxinas: ricina.
- d) Parásitos: *Plasmodium falciparum* (para el diagnóstico diferencial de fiebres hemorrágicas virales).

El Sistema de Respuesta Rápida se activa por dos vías fundamentalmente:

**A)** En casos de enfermedad hemorrágica vírica, importados o autóctonos, o bien sospecha de enfermedad producida por patógenos no presentes en nuestro país, como el MERS-coV, o recientemente el SARS-CoV-2, donde se cumplan los criterios clínicos y epidemiológicos establecidos (ver Protocolos de actuación publicados por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica). El sistema se activa, vía telefónica (24h/365d), a través de los departamentos de Salud Pública de las CCAA que a su vez han sido alertados por el hospital que presenta el caso índice. Además de contactar con el SRR, para la coordinación del trabajo de laboratorio, previamente se debe informar al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, que puede activar o desactivar la alerta, si así lo considera conveniente, a raíz de analizar y evaluar todos los datos disponibles.

**B)** En casos de sospecha de liberación intencionada la RE-LAB (Red de Laboratorios de Alerta Biológica) tiene las competencias para llevar a cabo todos los procedimientos necesarios desde la activación del sistema, la recogida de las muestras por las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado (FFCCSE), la coordinación para el envío al CNM (ISCIII) siguiendo la cadena de custodia, el manejo y registro de la información y por último la emisión del informe de resultados. La dirección de la RE-LAB, que corresponde al ISCIII, mantiene a su vez una coordinación estrecha con el CCAES para la organización eficaz y adecuada de la respuesta y los mecanismos necesarios para la resolución de la crisis.

## 5.2. LA RED DE LABORATORIOS DE ALERTA BIOLÓGICA (RE-LAB)

La RE-LAB se creó en España por orden del Ministerio de Presidencia PRE/305/2009 (BOE de 18 de febrero del 2009). Esta red surgió ante la evidencia de dos importantes debilidades identificadas a raíz de los incidentes de 2001 en Estados Unidos. Por un lado, la insuficiente preparación y dotación de las FFCCSE y de los servicios públicos de emergencia para responder eficazmente ante amenazas para la Salud Pública. Y por otro, se disponía de un reducido número de laboratorios de referencia con el nivel de seguridad biológica adecuado para la detección e identificación de agentes altamente patógenos. La RE-LAB coordina una serie de laboratorios especializados y complementarios entre sí, mediante la interconexión de sus bases de datos y protocolos específicos de funcionamiento, que proporcionan una infraestructura científico-técnica esencial para responder ante amenazas en el área de la Salud Pública, sanidad ambiental, seguridad alimentaria, sanidad animal y sanidad vegetal.

La gestión y la dirección científico-técnica de la RE-LAB corresponden actualmente al Ministerio de Ciencia e Innovación, a través del ISCIII y tiene una doble estructura organizativa:

- 1) Una Estructura de Gestión formada por una Comisión de Coordinación y un Comité Científico-Técnico.
- 2) Una Estructura Operativa que engloba a 13 laboratorios pertenecientes a diferentes Comunidades Autónomas y que están especializados en salud humana, sanidad ambiental, seguridad alimentaria, sanidad animal y sanidad vegetal.

La regulación de la RE-LAB ha sido actualizada recientemente mediante la Orden PCI/1381/2018, de 18 de diciembre, con el objetivo de incluir nuevos laboratorios de referencia, nuevos vocales al Comité Científico-Técnico y a la Comisión de Coordinación y actualizar las denominaciones de los Departamentos, grupos de trabajo, organismos e instituciones que forman parte de la RE-LAB.

La RE-LAB desempeña las siguientes funciones en el ámbito de la seguridad biológica:

- a) Detección e identificación de posibles alertas provocadas por la liberación accidental o intencionada de agentes biológicos.
- b) Apoyo científico-técnico en crisis biológicas al Gobierno y a las restantes Administraciones Públicas competentes, como una infraestructura científico-técnica especializada del Sistema de Seguridad Nacional.
- c) Creación y mantenimiento de una red informática para interconexión de datos y compartición de información entre los laboratorios que componen la RE-LAB, integrando en red la detección e identificación de riesgos, la planificación y preparación de respuestas y el desarrollo de las intervenciones que correspondan a cada uno de los departamentos con competencias sectoriales en las áreas anteriormente mencionadas.
- d) Establecimiento de contactos con otras redes de alertas europeas e internacionales.
- e) Elaboración de protocolos de primera actuación y respuesta rápida que, entre otros aspectos, comprenderá: toma de muestras, traslado de éstas, cadena de custodia, asesoramiento, comunicaciones, etc.
- f) Puesta en marcha de técnicas novedosas de detección e identificación de agentes biológicos y optimización de las existentes, así como la cesión y compartición de las técnicas entre los laboratorios integrantes de la RE-LAB a efectos de optimizar y normalizar resultados.
- g) Impulso de la acreditación de los laboratorios de acuerdo a estándares internacionales.
- h) Garantizar el cumplimiento de las medidas de bioseguridad y biocustodia requeridas para el manejo de agentes biológicos en función de su grupo de riesgo.
- i) Coordinación de la intervención adecuada de los laboratorios en cada actuación, así como de las informaciones y las comunicaciones derivadas de las actuaciones de las distintas instituciones que participan en la respuesta.

- j) Apoyo y coordinación de los medios científico-técnicos necesarios para la toma de decisiones de la autoridad competente en cada caso, en las situaciones de alerta y emergencia por agentes biológicos peligrosos.
- k) Formación en el ámbito de estas funciones mediante la organización de ejercicios intercomparativos entre laboratorios que permitan la optimización de técnicas y la normalización de resultados.

La Red dispone actualmente de una serie de elementos de soporte:

- a) Cartera de Servicios de 272 técnicas de laboratorio disponibles para el diagnóstico de 59 patógenos y toxinas de uso potencial en bioterrorismo.
- b) Protocolos de Comunicación y de Actuación específicos.
- c) Se comunica a través de una Plataforma web segura (Portal del Sistema de Seguridad Nacional- Presidencia del Gobierno) para un intercambio seguro de información.
- d) Cuestionario para comunicación de amenazas biológicas *on-line*.
- e) Base de datos para registro y seguimiento de eventos.

La RE-LAB ha establecido en nuestro país un mecanismo de comunicación ágil y eficaz con todas las partes intervinientes en la crisis para su gestión y resolución. Gracias a la colaboración establecida entre las autoridades sanitarias competentes en este tipo de actuaciones, las FFCCSE y el CCAES, la red se encuentra en condiciones de dar una respuesta rápida y eficiente ante cualquier posible alerta para la Salud Pública Nacional y ha podido desactivar en un tiempo mínimo aquellas falsas amenazas que pueden afectar a la Seguridad Ciudadana.

## 6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN BIOTERRORISMO

Ante la sospecha de un acto de bioterrorismo, la evaluación clínica del paciente es fundamental para establecer un diagnóstico. La información proporcionada al laboratorio será crucial para realizar un diagnóstico microbiológico exacto. Establecer cuadros clínicos sindrómicos según el tipo de síntomas predominantes, ayudará a dirigir el diagnóstico y el tratamiento (Tabla 2).

## 7. RECOGIDA DE MUESTRAS, ENVASADO Y TRANSPORTE ANTE UNA AMENAZA BIOLÓGICA

### 7.1. RECOMENDACIONES GENÉRICAS

Las posibles repercusiones internacionales y legales de declarar el uso de AB, han llevado a los países de la OTAN (Organización del Tratado del Atlántico Norte) a estandarizar y normalizar los procesos de toma de muestra, envasado y transporte de las mismas con el fin de, “si fuera necesario, proporcionar pruebas inequívocas de un primer empleo de AB, químicas o radiológicas, a las autoridades militares y políticas de los países de la OTAN, y que pudieran condicionar una respuesta frente a dicho ataque”. Estas normas y procedimientos quedan recogidos en diferentes manuales, entre los que se encuentra el AEP-66: *NATO Handbook for Sampling and Identification of Biological, Chemical, and Radiological Agents* (SIBCRA), de abril de 2015.

Dicho manual recoge los procedimientos a seguir por los equipos SIBCRA (se conocen por esas siglas a los equipos de recogida e identificación de muestras biológicas, químicas y radiológicas), tanto en su vertiente operativa: protección de las personas -tanto en el ámbito civil, como en operación militar-, como en su vertiente forense: obtener pruebas judiciales de confianza que respalden las respuestas políticas.

Cualquier evidencia debe ser verificable por un tercero independiente y por métodos científicos comúnmente aceptados. La posibilidad de verificar el método es una cuestión clave con respecto a la confianza en la identificación del agente. La confianza en el proceso SIBCRA se basa en la calidad de la cadena de evidencia, y esa calidad es tan buena como la calidad del eslabón más débil.

Tabla 2. Diagnóstico diferencial en bioterrorismo. Modificada a partir del ZEBRA MANUAL: *A reference handbook for bioterrorism agents y del Medical Aspects of Biological Warfare* (ver bibliografía)

SÍNDROME INICIAL	SIGNOS DIAGNÓSTICOS	AGENTE DE BIOTERRORISMO	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DISTRÉS RESPIRATORIO AGUDO CON FIEBRE	Radiología: ensanchamiento del mediastino, adenopatías mediastínicas y posible derrame.	<b>Ántrax respiratorio:</b> aparición brusca de fiebre, dolor en el pecho; dificultad respiratoria sin hallazgos de neumonía en radiología; sin historia de trauma o enfermedad crónica; progresión a conmoción y muerte en 24-36 horas.	Gripe, mediastinitis bacteriana, coccidioidomicosis, legionelosis, tularemia, fiebre Q, psitacosis, histoplasmosis, SARS.
	Radiología: condensación parénquima sin afectación mediastínica	<b>Peste neumónica:</b> Neumonía severa adquirida en la comunidad, con hemoptisis, cianosis, síntomas gastrointestinales, shock.	Ántrax respiratorio, Hantavirus, meningococemia, rickettsiosis, gripe, <i>Mycoplasma</i> spp., neumonía bacteriana, SARS
	Radiología: normal	<b>Ricina</b> (aerosolizada): Inicio agudo de fiebre, dolor en el pecho y tos, progresando a dificultad respiratoria e hipoxemia; no mejora con antibióticos; muerte en 36-72 horas.	Peste, tularemia, fiebre Q, Enterotoxina B estafilocócica, fosgeno
		<b>Enterotoxina B estafilocócica:</b> inicio agudo de fiebre, escalofríos, cefalea, tos no productiva y mialgia (cuadro similar a la gripe).	Influenza, Adenovirus
RASH AGUDO CON FIEBRE	Rash pustulovesicular centrífugo y sincrónico	<b>Viruela</b> Fiebre seguida de erupción papular que comienza en la cara y las extremidades y progresa uniformemente a vesículas y pústulas; cefalea, vómitos, dolor de espalda, y delirio común. Gravemente enfermo.	Varicela atípica, Herpes zóster diseminado, síndrome de Stevens-Johnson, sarampión atípico, sífilis secundaria, eritema multiforme, meningococemia, viruela del mono, viruela de la vaca.
	Rash hemorrágico	<b>Fiebre hemorrágica viral</b> (por ejemplo, Ébola) Fiebre con sangrado de membranas mucosas, petequias, trombocitopenia e hipotensión en un paciente sin malignidad subyacente.	Bacteriemia (especialmente meningococemia), malaria, rickettsiosis, leptospirosis, borreliosis, púrpura trombótica trombocitopénica (TTP), síndrome urémico hemolítico (SUH).

Tabla 2. Continuación. Diagnóstico diferencial en bioterrorismo. Modificada a partir del ZEBRA MANUAL: *A reference handbook for bioterrorism agents y del Medical Aspects of Biological Warfare* (ver bibliografía)

SÍNDROME INICIAL	SIGNOS DIAGNÓSTICOS	AGENTE DE BIOTERRORISMO	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
SÍNDROME NEUROLÓGICO	Afebril, parálisis flácida.	<b>Botulismo</b> Afebril, comienzo agudo: parálisis flácida, simétrica y descendente que comienza con los pares craneales. Estado mental normal.	Síndrome de Guillain-Barré, miastenia gravis, derrame cerebral medio, polio, encefalitis por garrapata; intoxicación química, organofosforados, monóxido de carbono, intoxicación por mariscos, intoxicación por alcaloides tipo belladona, síndrome Eaton-Lambert.
	Fiebre, signos meníngeos, convulsiones	<b>Encefalitis por alfavirus</b> (Venezolana, oriental, occidental) Encefalopatía con fiebre y convulsiones y/o déficits neurológicos focales.	Herpes simplex, Virus Epstein Barr, <i>Mycoplasma spp.</i> , Virus del Oeste del Nilo, rabia, sífilis, arbovirus.
SÍNDROME GENERAL INESPECÍFICO		<b>Brucelosis</b> Fiebre irregular, escalofríos, malestar general, cefalea, pérdida de peso, profunda debilidad y fatiga, artralgias, sacroileítis, abscesos paravertebrales. Anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, hepatoesplenomegalia. Puede tener tos y dolor torácico.	Neumonía por <i>B. anthracis</i> (o ántrax con afectación respiratoria), gripe, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , legionelosis, fiebre Q, peste, psittacosis, síndrome pulmonar por Hantavirus, tularemia, SARS
		<b>Tularemia</b> (Tifoidea, neumónica) Fiebre, escalofríos, calambres, cefalea, mialgias, coriza, dolor de garganta inicialmente; seguido por debilidad, anorexia, pérdida de peso. Malestar subesternal y tos seca si existe afectación pulmonar.	Ántrax respiratorio, gripe, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , legionelosis, fiebre Q, peste, psittacosis, síndrome pulmonar por Hantavirus, brucelosis, SARS
		<b>Fiebre Q</b> Escalofríos, cefalea intensa, fatiga, neumonía, mialgias, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso.	Influenza, Adenovirus, tularemia.

## 7.2. MUESTRAS CLÍNICAS

La recogida de muestras clínicas debe ser realizada por personal sanitario, conforme a la normativa nacional existente. Todas las muestras clínicas relacionadas con una sospecha de AB deben ser perfectamente etiquetadas y custodiadas adecuadamente durante todo el proceso de recogida, embalaje y transporte al laboratorio.

La mayoría de las muestras deben enviarse lo antes posible al laboratorio, preferentemente en menos de 24 horas en refrigeración o en hielo. Si el envío se tuviera que realizar posteriormente, se debería emplear nieve carbónica o nitrógeno líquido. En EEUU el USAMRIID ha establecido normas a tal efecto.

Para el almacenaje de muestras con fines de realizar análisis moleculares el *gold standard* es la congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido. También se pueden emplear preservadores del ARN en tejidos para su mantenimiento adecuado a temperatura ambiente. Entre éstos destaca el *Ambion's RNAlater* u otros productos especializados como los de Biomatrica.

Para recoger suero se prefieren los tubos con activador del coágulo ya centrifugados, y para el cultivo de sangre los frascos de hemocultivo frente a los tubos con citrato (siempre y cuando se recojan muestras de dos sitios distintos para mitigar y monitorizar la contaminación de la sangre con flora de la piel).

Las muestras post-mortem se recogerán en condiciones de asepsia, siguiendo las recomendaciones específicas del grupo *ESGFOR (ESCMID – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – Study Group of Forensic and Postmortem Microbiology)* mencionadas en la bibliografía de este capítulo. Los tejidos post-mortem preferidos son hígado, pulmón, bazo, nódulos linfáticos regionales o mesentéricos, glándulas suprarrenales (Ébola o Marburg) y médula ósea. El cultivo de ésta es más sensible que el hemocultivo en casos de brucelosis. Con objeto de que los tejidos post-mortem se puedan usar sin problemas en Microbiología, si el transporte va a ser rápido y en refrigeración, éstos pueden enviarse en solución fisiológica normal o en un contenedor estéril puesto que el fijador universal (formalina al 10%) puede interferir si se va a realizar posteriormente una técnica de PCR y o de RT-PCR.

Las muestras clínicas más adecuadas a recoger según el AB sospechado se exponen en la tabla 3.

## 7.3. REGULACIONES EN EL TRANSPORTE

Desde el envío de cartas con ántrax en 2001 se han impuesto nuevas normativas y regulaciones para el control del envío de muestras biológicas, especialmente el grupo de *Biological Select Agents and Toxins* (BSATs o SAs) en EEUU. Estas regulaciones suelen ser complejas, requieren de certificaciones y procedimientos burocráticos, aunque esta complejidad debe simplificarse lo más posible para no impedir la investigación, no exponer los pacientes a un riesgo sanitario ni al personal médico a un riesgo legal. En EEUU existe una regulación específica sobre cómo recoger la muestra, almacenarla y enviarla con procedimientos de aseguramiento de calidad. El conocimiento de las normativas específicas de los diferentes países es de especial importancia con fines de planificación y preparación ante una amenaza por un agente biológico.

Las normativas y recomendaciones existentes tienen su origen en las propuestas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), adoptadas por las Naciones Unidas (ONU) y sus respectivas organizaciones internacionales de transporte: Comité de Expertos de las Naciones Unidas en Transporte de Mercancías Peligrosas, Unión Postal Universal (UPU), Organización de Aviación Civil Internacional (OACI) y Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA), así como en los respectivos reglamentos de transporte por carretera (ADR), ferrocarril (RID) y marítimo (IMDG). El objetivo básico es facilitar el envío simplificado y seguro de materiales infecciosos, protegiendo al mismo tiempo la seguridad del personal de transporte y del público en general.

Tabla 3. Muestreo según el agente biológico sospechado Adaptada del USAMRIID *BlueBook 8th Edition. Appendix L1*, Fernández-Rodríguez *et al* 2015 y del *Medical Aspects of Biological Warfare, Chapter 26 (Laboratory Identification of Threats)*, referidos en bibliografía

Enfermedad	Hisopo nasal/ faríngeo <sup>B</sup>	Hemocultivo <sup>E</sup>	Tinción <sup>F</sup>	Suero agudo / convaleciente	Heces	Orina	Otros	Muestras post-mortem <sup>G</sup>
<b>Ántrax</b>	+	+	Líquido pleural, LCR, nódulo linfático mediastínico, bazo	+	+/-	-	Aspirado de lesión cutánea/ <i>punch</i> de biopsia 4 mm, detección de toxina	Suero y sangre total, LCR, muestras respiratorias (hisopo faríngeo, pulmón). Si ántrax cutáneo/gastrointestinal (menor letalidad): lesión cutánea/heces y orina
<b>Brucelosis</b>	+	+	-	+	-	-	Médula ósea y sangre (muestras más apropiadas para cultivo)	Suero y sangre total, médula ósea, nódulo linfático, bazo, hígado, LCR
<b>Muermo y melioidosis</b>	+	+	Espuito y aspirado de absceso	+	-	+/-	Cultivo del absceso	Suero y sangre total,
<b>Peste</b>	+	+	Espuito	+	-	-	Aspirado de bubón, LCR, esputo, raspado de lesión, aspirado de nódulo linfático. Nunca diseccionar el bubón	Suero y sangre total, aspirado del bubón, LCR, hisopo faríngeo, pulmón, heces, orina
<b>Tularemia</b>	+	+	+	+	-	-		Suero, pulmón, hígado, bazo, líquido. pleural, sangre
<b>Fiebre Q</b>	+	Sangre con EDTA <sup>C</sup>	Lesiones	+	-	-	Pulmón, bazo, nódulos linfáticos, biopsia de médula ósea	Suero, sangre, biopsia de tejidos, fluidos corporales
<b>Encefalitis Equina de Venezuela<sup>A</sup></b>	+	D	-	+	-	-	LCR	Suero, sangre, LCR, cerebro
<b>Fiebres hemorrágicas virales<sup>A</sup></b>	+	D	-	+	-	-	Hígado	Suero, sangre

Tabla 3. Continuación. Muestreo según el agente biológico sospechado Adaptada del USAMRIID *BlueBook 8th Edition. Appendix L1*, Fernández-Rodríguez et al 2015 y del *Medical Aspects of Biological Warfare, Chapter 26 (Laboratory Identification of Threats)*, referidos en bibliografía

Enfermedad	Hisopo nasal/ faríngeo <sup>B</sup>	Hemocultivo <sup>E</sup>	Tinción <sup>F</sup>	Suero agudo / convaleciente	Heces	Orina	Otros	Muestras post-mortem <sup>G</sup>
<b>Botulismo: <i>C. botulinum</i>: toxinas A-G</b>	+	+/-	Tejido de las heridas	+	+/-	-	Suero / otros fluidos para la detección de toxinas/bioensayo en ratón	Estudios serológicos no útiles. Muestras gastrointestinales
<b>Enterotoxina B de <i>S. aureus</i></b>	+	-	-	+	+	+	Pulmón, riñón	Estudios serológicos no útiles. Muestras gastrointestinales
<b>Ricina</b>	+	-	-	+	+	+	Bazo, pulmón, riñón	Suero
<b>Micotoxinas T-2</b>	+	-	-	-	+	+	Suero, heces u orina para metabolitos	Contenido intestinal, sangre y orina

#### Notas:

- A. Las muestras para virus se tomarán en medio universal o de transporte de virus.
- B. Los hisopos deberán ser de nylon, rayón, dacrón con vástago de plástico.
- C. *C. burnettii* puede persistir varios días en sangre y es resistente a la desecación.
- D. El aislamiento de virus en sangre o hisopos faríngeos se hará en recipiente adecuado.
- E. Sangre para hemocultivo tomada de 2 localizaciones diferentes (brazos derecho e izquierdo para monitorizar una posible contaminación cutánea).
- F. Los esputos deberán clasificarse para descartar contaminación con microbiota oral.
- G. Como muestras post-mortem el suero se utiliza para detección de toxinas, inmunoensayos o serología. El resto de muestras, incluida la sangre total, se emplean para cultivos y/o PCR. Para el diagnóstico post-mortem de Ébola se utilizan hisopos orales (saliva y células epiteliales) WHO (<http://www.who.int/crs/resources/publications/ebola/safely-collector-swabs/en/>). Se pueden utilizar muestras adicionales para otros virus: hisopo, faríngeo y orina para Lassa. Hisopado nasofaríngeo, líquido pleural, orina y tejidos para Bunyavirus, etc.

En la clasificación de mercancías peligrosas de la ONU seguida por todos los reglamentos de transportes (ADR, RID, código IMDG e Instrucciones técnicas de la OACI - IATA), los materiales conteniendo agentes biológicos peligrosos se clasifican como "sustancias infecciosas" en la clase 6.2, teniendo asignados distintos números ONU.

De forma general, y siempre teniendo en cuenta la legislación vigente en cada país, habría tres formas básicas de transportar la muestra por parte de los responsables del envío: (i) Enviar la muestra sin realizar ningún análisis como "muestra de diagnóstico general cumpliendo la normativa de material biopeligroso (según RD 664/97 en España). (ii) Fijar o inactivar la muestra haciéndola válida sólo para análisis moleculares, serología o tinciones, pero no para ningún otro ensayo que requiera un organismo vivo, como el cultivo. (iii) Enviar las muestras con las directivas establecidas por la Ley y por medios específicos militares u otros establecidos por cada legislación.

En España, además de la normativa relativa al transporte de mercancías peligrosas, el transporte de agentes biológicos queda supeditado a la normativa de la Comisión Nacional de Biocustodia.

#### 7.4. RECOGIDA DE MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

Aunque estas muestras no se reciben en los laboratorios de Microbiología Clínica convencionales, sino en laboratorios altamente especializados, su trascendencia a lo largo del estudio microbiológico ante una AB puede resultar determinante, por lo que a continuación se describe brevemente el interés de su recogida. Las muestras medioambientales deben recogerse lo antes posible tras el reconocimiento de la liberación de un agente biológico, con objeto de facilitar la identificación de éste y reconocer las circunstancias que la rodean. Es importante señalar que esas muestras, cuando se recogen después del ataque, además de poder contribuir a la identificación del agente empleado, al menos con fines epidemiológicos (y no siempre con fines profilácticos en muchos casos), sí se pueden usar como evidencia forense para la investigación del hecho criminal propiamente dicho o incluso de un crimen de guerra. Aunque la recogida de esas muestras no es estrictamente una responsabilidad médico-sanitaria, su recogida debe realizarse por personal específicamente cualificado para la recogida de este tipo de muestras en el lugar de los hechos. En EEUU se exige que este personal sea médico, en otros como el nuestro, la toma de muestras ambientales se efectúa por cuerpos especializados de las FFCCSE.

Para la toma medioambiental sería conveniente establecer una línea "limpia" y una estrategia de salida y entrada para mitigar la exposición al agente. El personal involucrado, que debe llevar un equipo de protección de personal específico, debería implicarse también en tareas de descontaminación del lugar donde se realice la toma de muestra. Ésta debe hacerse siguiendo las recomendaciones forenses de toma de muestra mediante un procedimiento que siga criterios de cadena de custodia y documentación y fotografías que lo apoyen.

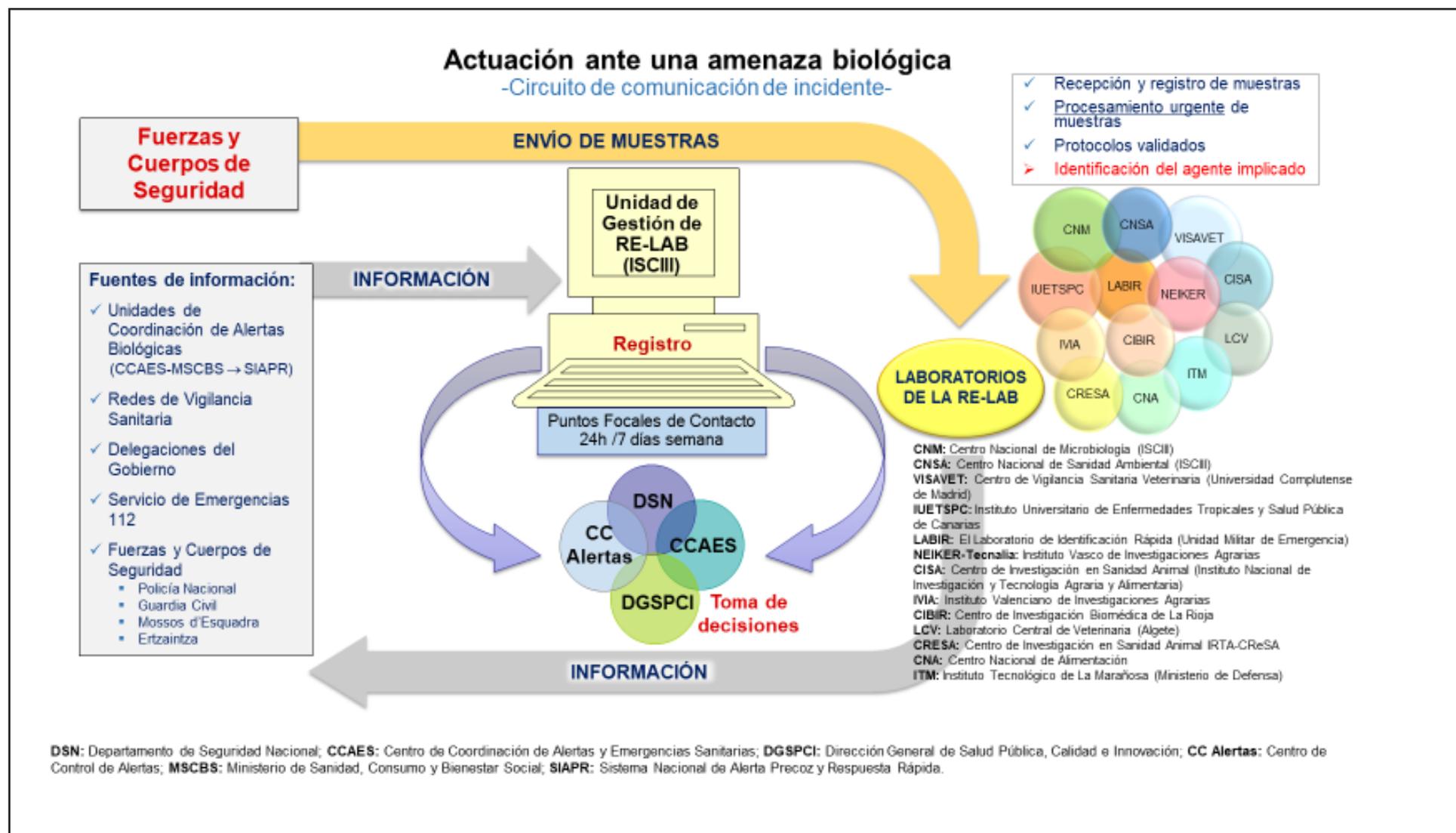
Aunque los tipos de muestras pueden ser muy variados, entre los más probables se hallan: aerosoles recogidos en soluciones tampón, muestras de suelos, hisopos con material biológico, polvos secos, envases con sustancias desconocidas, vegetación, alimentos, agua y fluidos o tejidos corporales.

Durante un ataque es recomendable la toma de aerosoles, mientras que *a posteriori* cualquier material potencialmente contaminado puede recogerse mediante hisopos, habiéndose diseñado *kits* específicos que favorecen la conservación de este material hasta su análisis. Por otra parte, tras la liberación intencionada, también se pueden recoger muestras de restos cadavéricos o de animales muertos. Cualquier muestra debería almacenarse en doble envase, en el que la parte externa de la bolsa deberá descontaminarse con lejía. Cada muestra deberá etiquetarse con todos los datos que permitan su identificación inequívoca, incluyendo la fecha, hora y lugar de recogida, así como los datos de identificación de quienes las hayan recogido.

## 8. ALERTA BIOLÓGICA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

### 8.1. ACTUACIÓN ANTE UNA AMENAZA BIOLÓGICA. CIRCUITO DE COMUNICACIÓN DE INCIDENTE

Figura 1. Actuación ante una amenaza biológica (facilitado por la RE-LAB)



## 8.2. SISTEMA DE CALIDAD PARA EL MANEJO EN EL LABORATORIO DE UNA MUESTRA CON SOSPECHA DE CONTENER UN AGENTE BIOLÓGICO

Ante un incidente con AB, se debe suponer que todas las muestras que llegan al laboratorio contienen material infeccioso o tóxico, a menos que se indique lo contrario, y se deben tomar las precauciones adecuadas para el manejo de tales muestras. El análisis de éstas debe realizarse en un laboratorio debidamente equipado, con experiencia en la identificación de agentes biológicos y tóxicos. Se deben tener en cuenta los siguientes requisitos:

- 1) La llegada de la muestra al laboratorio será comunicada de inmediato al responsable de su manejo, así como a las autoridades que se hayan determinado.
- 2) Debe recordarse que el resultado de las pruebas que se realicen puede tener repercusiones militares (área de operaciones), políticas (alegaciones de uso) o de verificación (CABT, BTWC). Por lo tanto, es obligatorio que el manejo y el análisis de las muestras se realicen con el objetivo de mantener una cadena de custodia continua, - concepto este que se definirá en el apartado 10 de este procedimiento -. Como norma general se tomarán fotos del exterior de los envases, así como de su contenido.
- 3) El paquete debe almacenarse en un nivel de bioseguridad 3 (BSL-3 o BSL-2 con CBS-3). La integridad de la muestra sellada y su embalaje deben confirmarse mediante inspección visual. Cuando haya repercusiones políticas (alegaciones sobre el uso de AB), si el paquete no estuviera sellado o hubiera sido manipulado, no se procederá a su análisis hasta que las autoridades pertinentes lo confirmen.
- 4) El científico responsable debe emplear y mantener registros por escrito en los que asigne a la muestra un número de identificación único y describa el manejo, procesamiento de la muestra y el resultado de todos los análisis.
- 5) El paquete debe abrirse en un nivel de bioseguridad 3. Una vez abierto el paquete, el científico responsable debe asignar a los contenidos de cada paquete un número de identificación único, y poner en ellos la fecha y sus iniciales para mostrar que la muestra está ahora bajo su custodia. Se seguirán procedimientos adecuados y uniformes para el etiquetado de todas las muestras.
- 6) El material de embalaje debe conservarse hasta la finalización de la investigación, con un número de identificación. En la medida de lo posible se debe conservar una muestra representativa para un posible examen futuro. A la muestra representativa también se le asigna un número de identificación único.
- 7) Si la muestra no se va a analizar inmediatamente, debe almacenarse a 4°C en un lugar cerrado que esté bajo control exclusivo del científico responsable. Si la muestra se transfiere a otro científico, se debe completar un formulario de transferencia que detalle la transferencia. El segundo científico debe fechar y poner sus iniciales en el paquete o las muestras, dejando así constancia de fue puesto bajo su custodia.
- 8) Hasta su inactivación, el procesamiento de la muestra objeto de análisis también deberá realizarse en BSL-3 o BSL-2 con CBS-3.

Cada vez más, los laboratorios están obligados a proporcionar evidencia documentada de que los resultados que producen cumplen un estándar prescrito. Términos como: buenas prácticas de laboratorio (BPL), aseguramiento de la calidad (*quality assurance*, conocido como QA), control de calidad (QC) y procedimientos operativos estándar (SOP) son utilizados para describir estos estándares. Sigue siendo una responsabilidad nacional garantizar que los laboratorios cumplen con las normas nacionales y, si corresponde, internacionales. Los métodos utilizados deberán ser validados internamente antes de su uso, además de basarse en literatura científica contrastada y, en el caso de kits comerciales, éstos deberán ser avalados por una validación de desarrollo realizada por el fabricante. En resumen, es necesario demostrar que un laboratorio mantiene registros precisos y detallados y que los métodos que utiliza son los adecuados para que los resultados experimentales puedan verificarse rastreando la información hasta los datos sin procesar. También el personal deberá estar específicamente formado y seguir programas de formación continua que avalen la actualización en su formación tanto teórica como práctica. Adicionalmente, serán necesarios los registros de mantenimiento y calibración de todos los equipos utilizados en el laboratorio.

### 8.3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LOS AGENTES BIOLÓGICOS

La respuesta ante la liberación de un AB o bien la importación accidental de un microorganismo altamente patógeno debe ser rápida para interrumpir la propagación de éste, evitando la aparición de nuevos casos. Por ello, es imprescindible la detección temprana del agente causal. En este tipo de eventos existe un componente ambiental que se relaciona con la liberación del agente y un componente humano que se traduce en la aparición de casos clínicos. Por otra parte, la detección rápida en muestras ambientales contaminadas podría permitir la actuación en las primeras fases del ataque y minimizar los riesgos.

La identificación de un AB en una muestra biológica puede tener diferentes niveles de confianza, según los criterios admitidos internacionalmente: identificación provisional, confirmada e inequívoca.

- Identificación provisional: un agente biológico puede considerarse provisionalmente identificado cuando se cumple uno de los siguientes criterios:

- Se demuestra la presencia de un antígeno único para el agente biológico en cuestión mediante una reacción positiva con un anticuerpo específico en una prueba de inmunoensayo; o
- Se demuestra la presencia de una secuencia de ácido nucleico única para el agente biológico en cuestión por una reacción positiva con una sonda de ácido nucleico específica (sonda génica) en un ensayo molecular; o
- Cultivo in vitro positivo o ensayos multi-metabólicos.

- Identificación confirmada: se cumplen dos de los criterios establecidos para la identificación provisional, en presencia de estándares de referencia (controles positivos y negativos) en condiciones experimentales idénticas.

- Identificación inequívoca: la identificación inequívoca de un agente biológico proporciona el más alto nivel de certeza. Es el nivel requerido para el desarrollo de posiciones estratégicas y políticas. Este tipo de identificación se realiza en Laboratorios de Referencia nacionales o internacionales. Requiere el cumplimiento de los siguientes puntos:

- Se obtiene una respuesta positiva mediante un método de identificación genética; y
- Se obtiene una respuesta positiva por un método inmunológico; y
- Se obtiene una coincidencia positiva mediante cultivo in vitro o ensayo multi-metabólico; y
- Las propiedades de la enfermedad del agente microbiano se confirman en un modelo animal aceptado, si tal modelo existe.

En la tabla 4 se especifican los ensayos microbiológicos más apropiados a realizar para la identificación de AB, si bien la mayoría de ellos quedan restringidos a laboratorios de referencia con el nivel de contención adecuado.

En la práctica, la metodología más eficaz para la detección de los principales agentes son las técnicas moleculares. El primer paso consiste en la extracción rápida de los ácidos nucleicos a partir de la muestra susceptible de contener el AB (mediante *kits* comerciales con protocolos adaptables a los distintos tipos de muestras). Durante esta extracción se procede a la inactivación del posible AB contenido en la muestra. El segundo paso es la PCR en tiempo real, que resulta rápida y específica, permitiendo en ocasiones amplificar varias dianas a la vez para realizar un abordaje más extenso. Los diferentes métodos de detección incluidos en la cartera de servicios del SRR, que se resumen en la Tabla 5, permiten afrontar todo tipo de situaciones de emergencia sanitaria en las que el diagnóstico rápido resulta esencial para reducir el impacto mediático y social, así como para diseñar las medidas de control adecuadas.

Tabla 4. Análisis microbiológicos genéricos para la identificación de agentes biológicos

(Adaptada del *USAMRIID BlueBook 8th Edition. Appendix L3* y del *Medical Aspects of Biological Warfare, Chapter 26 Laboratory Identification of Threats*), ambos referidos en bibliografía

Enfermedad	Agente	Gold standard	Detección de antígenos	IgG	IgM	PCR	Otros
Ántrax	<i>Bacillus anthracis</i>	Cultivo	X	X	X	X	
Brucelosis	<i>Brucella</i> spp.	Cultivo e identificación bioquímica de la especie	X	X	X	X	
Muermo	<i>Burkholderia mallei</i>	Cultivo				X	
Melioidosis	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Cultivo				X	
Peste	<i>Yersinia pestis</i>	Cultivo o incremento de 4 veces el título de anticuerpos (Ac) frente al antígeno F1	X	X	X	X	
Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>	Cultivo (agar chocolate o BYCE) incremento de 4 veces el título de Ac frente al antígeno de <i>F. tularensis</i>	X	X	X	X	
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Fase aguda: incremento del título de Ac para <i>C. burnetii</i> . Fase crónica: IFA para la fase I del antígeno (>1800) <sup>1</sup>	X	X	X	X	Cultivo celular
Viruela	Orthopoxvirus	Solo análisis en laboratorio de referencia (PCR es lo más común)	X	X		X	**
Encefalitis Equina Venezolana	Virus encefalitis equina	Serología en sueros pareados o IgM específica del virus en suero o LCR	X	X	X	X	Cultivo para (confirmación)
Virus responsables de fiebres hemorrágicas	Filovirus y Arenavirus	PCR	X	X	X	X	Cultivo (nivel 4)
	Hantavirus	Serología/PCR	X	X	X	X	

Tabla 4. Continuación. Análisis microbiológicos genéricos para la identificación de agentes biológicos

(Adaptada del *USAMRIID BlueBook 8th Edition. Appendix L3* y del *Medical Aspects of Biological Warfare, Chapter 26 Laboratory Identification of Threats*), ambos referidos en bibliografía

Enfermedad	Agente	Gold standard	Detección de antígenos	IgG	IgM	PCR	Otros
Botulismo	Toxinas botulínicas (A-G)/ <i>Clostridium botulinum</i>	Toxina presente en suero (test serológico) o aislamiento de <i>C. botulinum</i> en una muestra	X			*	Bio-ensayo en ratón
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxina epsilon (producida por los tipos B y D)	Cultivo	X			X	
Saxitoxina	Saxitoxina	HPLC-MS <sup>2</sup>					
Enterotoxina B de <i>S. aureus</i>	Toxina SEB	ELISA <sup>3</sup>	X	X		*	Cultivo inicial
Ricina	Toxina ricina	ELISA <sup>3</sup>	X	X	X	X	
Micotoxinas T-2	Micotoxinas T-2	LC-MS o HPLC-MS <sup>2</sup>	X				
Tetrodotoxinas	Tetrodotoxinas	HPLC-MS <sup>2</sup>	X				

<sup>1</sup> IFA: *Immunofluorescent assay*.

<sup>2</sup> HPLC-MS Cromatografía líquida-espectroscopía de masas de alta resolución.

<sup>3</sup> ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*.

\*La toxina purificada no contiene genes detectables. Para que la detección del gen de la toxina sea útil se requiere que exista detritus celular incluyendo genes como material "contaminante" en la muestra.

\*\*Enviar las muestras al Centro Nacional de Referencia del país.

Tabla 5. Técnicas utilizadas en los laboratorios del Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid) y por el SRR del Instituto de Salud Carlos III

Agente biológico	Técnica / Diana	Referencia bibliográfica / cebadores, sondas / Kit Comercial
<i>Bacillus anthracis</i> <sup>1</sup>	PCR en tiempo real / cromosómica locus BA-5345	Antwerpen M y cols. 2008. Mol Cell Prob 22 (5-6):313-5 ( <i>in house</i> )
<i>Yersinia pestis</i> <sup>1</sup>	PCR en tiempo real / genes <i>pla</i> y <i>caf</i>	Riehm JM y cols. 2011. Mol Cell Prob 25:8-12 ( <i>in house</i> )
MERS-coV <sup>2</sup>	PCR en tiempo real / gen <i>E</i> y marco de lectura abierta <i>ORF 1A</i>	<i>upE</i> : Corman VM y cols. Euro Surveill. 2012. 27;17(39). pii: 20285  <i>ORF 1A</i> : Corman VM y cols. Euro Surveill. 2012. 6;17(49). pii: 20334. (ambas <i>in house</i> )
Virus Ébola/virus Marburg <sup>3</sup>	qRT-PCR en tiempo real / desconocida	RealStar® Filovirus Screen RT-PCR, Kit comercial Altona
Virus de la viruela humana (orthopoxvirus), viruela de los monos y otros orthopoxvirus (viruela de las vacas)	qPCR en tiempo real / región conservada del gen <i>crmB</i>	Fedele G y cols. 2006. J Clin Microbiol. 44 (12):4464-70 ( <i>in house</i> )
Virus Lassa <sup>3</sup>	qRT-PCR en tiempo real / desconocida	RealStar® Lassa Virus RT-PCR, Kit comercial Altona
Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo <sup>3</sup>	qRT-PCR en tiempo real / desconocida	RealStar® CCHFV RT-PCR, Kit comercial Altona
Ricina <sup>4</sup>	Test rápido, ELISA tipo sandwich, inmunoblot	Ricin BioThreat Alert Test Strip, Kit comercial Ricin Tetracore, (ELISA e inmunoblot <i>in house</i> )
<i>Plasmodium falciparum</i> <sup>5</sup>	Test rápido, PCR anidada / ARNr 18S	Immunmoquick contact Malaria 4+, Kit comercial BioSynex, Rubio y col., 2002 Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96:199-204. Ta y col., 2014 Malar J. 24;13(1):68 ( <i>in house</i> )

1: Laboratorio de Referencia e Investigación en Patógenos Especiales

2: Laboratorio de Referencia e Investigación en Virus Respiratorios y Gripe

3: Laboratorio de Referencia e Investigación en Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas

4: Unidad de Inmunobiología Microbiana

5: Laboratorio de Malaria y Parasitosis Emergentes

#### 8.4. DIAGNÓSTICO POINT-OF-CARE

La realización de un diagnóstico *point-of-care* (POC) requiere el empleo de técnicas rápidas, sin apenas manipulación de las muestras, que no requiera personal altamente especializado, sin necesidad de material de laboratorio complejo, que pueda llevarse a cabo incluso fuera del hospital o del laboratorio y que proporcione un resultado rápido, presuntivo que permita descartar o continuar con el diagnóstico de sospecha clínic. Este diagnóstico requiere siempre de un diagnóstico de confirmación en el laboratorio.

Actualmente el diagnóstico rápido de los agentes de guerra biológicos se basa en diferentes métodos:

- **Inmunocromatografía de flujo lateral.** Tiras reactivas inmunocromatográficas rápidas, basadas en la reacción antígeno-anticuerpo. Tetracore Inc. dispone del sistema *BioThreat Alert®* (BTA®): Abrin BioThreat Alert® Kit, Anthrax BioThreat Alert® Kit, Bot Tox BioThreat Alert® Kit, Brucella BioThreat Alert® Kit, Orthopox BioThreat Alert® Kit, Plague BioThreat Alert® Kit, Ricin BioThreat Alert® Kit, SEB BioThreat Alert® Kit (para la enterotoxina B de *S. aureus*), Tularemia BioThreat Alert® Kit. Mediante el lector (BTA Reader CX/TX), se obtiene un resultado en aproximadamente 1 minuto.

- **PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).** Existen diferentes equipos que permiten un diagnóstico rápido basándose en la amplificación de secuencias de ADN. Permiten obtener resultados en menos de 1 hora. Entre ellos destacan:

a) T-COR 8™ Real-time PCR Thermocycler (Tetracore Inc.). Permite realizar una PCR a partir de sangre total, suero o fluido oral, no requiere extracción y utiliza reactivos liofilizados, sin necesitar conservación en congelador. Esta plataforma dispone de *kits* comercializados que permiten la identificación de los siguientes patógenos: *B. anthracis* Lethal Factor (pX01), *B. anthracis* capA (pX02), *Botulinum A*, *Botulinum B*, *Botulinum A/B* Multiplex, *Brucella*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, Ricina, Abrina, SEB, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, Japanese Encephalitis Virus, Orthopox Virus, Venezuelan Equine Encephalitis Virus.

b) FilmArray® (BioFire Defense, LLC). Está disponible el FilmArray Bio Threat Panel ® que permite identificar o descartar los siguientes microorganismos: *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Burkholderia mallei/pseudomallei*, toxina botulínica, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, Ricina, *Rickettsia*, *Yersinia pestis*, Ebola virus, EEE virus, EEE virus, Marburg virus, Variola virus, VEE virus, WEE virus, Orthopox genus viruses. Dispone también de un panel específico para Ébola: FilmArray BioThreat-E. A partir de una muestra desconocida el sistema extrae y purifica todos los ácidos nucleicos de la muestra, a continuación, realiza una PCR multiplex anidada.

Los métodos de diagnóstico citados anteriormente han sido utilizados por varios ejércitos en diferentes operaciones militares en las que se sospechaba podrían emplearse AB.

## 9. BIOSEGURIDAD Y BIOPROTECCIÓN EN LOS LABORATORIOS

“*Biosafety protects people from germs – biosecurity protects germs from people*”. Esta frase, pronunciada en la reunión de 2003 para el seguimiento de la Convención para la Prohibición de Armas Biológicas y Tóxicas (CABT), resume de forma simple las diferencias entre *biosafety* y *biosecurity*. Términos, que en castellano tendemos a traducir simplemente como bioseguridad.

*Biosafety*, es un proceso que incluye los principios, técnicas y prácticas de contención que se realizan con el fin de evitar la exposición involuntaria al material biológico o su liberación accidental, y por tanto para reducir o eliminar el riesgo biológico. Esta parte de la bioseguridad ha sido ampliamente tratada en el Procedimiento 10a de la SEIMC: *Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica*.

*Biosecurity*, es un término más complejo, con diferentes interpretaciones según el área de aplicación. En el ámbito de la Salud Pública, *biosecurity* se refiere a los mecanismos que establecen la seguridad y vigilancia de los patógenos, toxinas y material biológico de valor, relacionándose de forma directa con el bioterrorismo y la guerra biológica. El término evolucionó a *laboratory security* en 2006, cuando la OMS publicó su primera guía sobre el tema y describió la protección, control e inventariado del material biológico de valor (VBM- *Valuable Biological Material*) dentro de los laboratorios, con el fin de evitar el acceso no autorizado al mismo, su pérdida, robo, dispersión o uso del mismo con fines no autorizados por la CABT.

El término se ha traducido por bioprotección por diferentes autores.

En este contexto, VBM hace referencia al material biológico que precisa de supervisión administrativa, control, inventariado y medidas precisas y específicas dentro del laboratorio para proteger, tanto su valor económico o histórico, como a los humanos del potencial daño que la dispersión o pérdida de dicho material podría ocasionar. Podrían ser consideradas como VBM patógenos y toxinas, así como organismos no patógenos, cepas vacunales, organismos genéticamente modificados, componentes celulares, elementos genéticos y muestras extraterrestres.

En relación con la bioprotección (*biosecurity*) todo laboratorio en el que se manejen VBM debe contemplar, al menos, las siguientes medidas:

- 1.- Disponer de un inventario actualizado de las cepas y muestras, en el que se identifique su localización exacta;
- 2.- Selección e identificación del personal con acceso a dicho material;
- 3.- Protocolos de utilización de VBM;
- 4.- Registros del empleo de VBM;
- 5.- Documentación relativa a la transferencia de dicho material a otros laboratorios o instituciones;
- 6.- Documentación de la inactivación o destrucción de dicho material.

En el ámbito de la bioseguridad (*biosafety*) los requerimientos mínimos de un laboratorio donde se manipulen microorganismos quedan establecidos por el grado de peligrosidad de dicho patógeno, según lo establecido en el anexo II del RD 664/97. En ese mismo anexo se establecen los niveles de contención biológica precisos y, por tanto, las características del laboratorio.

Según dicho documento, los diferentes patógenos deben manipularse en diferente nivel de contención biológica, según el grupo de riesgo que se les haya asignado. En relación con los llamados agentes de guerra biológica o bioterrorismo, y siempre según lo marcado en el RD 664/97, estos requieren el siguiente nivel de contención:

- Nivel de contención 2: *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptosporidium parvum*, ricina.
- Nivel de contención 3: *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp., *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Coxiella burnetti*, *Francisella tularensis*, *Chlamydia psittaci*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Rickettsia prowazekii*, *Salmonella typhi*, así como los virus *Hantaan*, Fiebre Amarilla, Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Este y Encefalitis Equina del Oeste, Nipah.
- Nivel de contención 4: Ebola, Marburg, Lassa, Junin, Machupo, Variola mayor.

La OMS, en su Manual de Bioseguridad en el Laboratorio (tercera edición) establece una relación, que no equivalencia, entre el grupo de riesgo de los patógenos, el nivel de biocontención en el que dichos patógenos se pueden manejar y las medidas y equipos de seguridad que se precisan para cada nivel (ver Tabla 6).

Tabla 6. Niveles de bioseguridad y prácticas de laboratorio y equipamiento para los grupos de riesgo

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	PRÁCTICAS DE LABORATORIO EQUIPAMIENTO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Técnicas microbiológicas apropiadas (TMA). Ropa de trabajo adecuada. No requiere equipos de seguridad especiales. Trabajo en mesa de laboratorio al descubierto.
2	Básico Nivel 2	TMA y ropa protectora. Señal de riesgo biológico. Material de bioseguridad indispensable (MBI): dispositivos de pipeteo, asas de siembra de plástico desechables, frascos y tubos con tapón de rosca, autoclaves u otros medios apropiados para esterilizar el material contaminado. Trabajo en mesa al descubierto y cabina de seguridad biológica (CSB) para posibles aerosoles.
3	Contención Nivel 3	Prácticas de nivel 2 y, además: Equipo de protección individual (EPI) adecuado al riesgo. Acceso controlado y flujo direccional de aire. CSB además de otros medios de contención biológica en todas las actividades.
4	Contención máxima Nivel 4	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos. CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared) y aire filtrado.

Modificado del Manual de bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. OMS. Ginebra 2005

Las buenas prácticas en el laboratorio o técnicas microbiológicas apropiadas (TMA), junto con el equipamiento de bioseguridad constituyen la contención primaria, y su combinación con el diseño adecuado de las instalaciones permite trabajar en el nivel de bioseguridad necesario.

Dentro de los equipos de bioseguridad se encuentran los equipos de protección individual (EPI) y las cabinas de seguridad biológica (CSB).

El RD 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual, define los equipos de protección individual (EPI) como “cualquier equipo destinado a ser llevado o sujetado por el trabajador para que le proteja de uno o varios riesgos, que puedan amenazar su seguridad o su salud en el trabajo, así como cualquier complemento o accesorio destinado a tal fin”. Esta definición excluye, entre otros equipos, la ropa de trabajo corriente, pero no la que ofrece protección frente a un riesgo. Una bata, por ejemplo, se considera como ropa de trabajo, excepto que sea anticorrosión o ignífuga, en cuyos casos debe estar certificada frente a estos riesgos.

El uso de los EPI debe contemplarse como un complemento de otras actuaciones preventivas que no garantizan un control suficiente de la situación de riesgo.

Respecto al uso de EPI frente al riesgo biológico, existe cierta tendencia a confundir los equipos destinados a evitar la contaminación de material estéril (protección del producto) con los destinados a la protección del trabajador. Las prendas de vestir y el equipo que se seleccionen dependen de la naturaleza del trabajo que se realice. Serán parte del EPI los guantes impermeables y desechables (látex, nitrilo, vinilo...), pantallas faciales, gafas protectoras, monos impermeables y delantales. La protección respiratoria frente a la inhalación de bioaerosoles implicaría la utilización de equipos con filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Airborne*) capaces de retener los microorganismos y que, en consecuencia, esterilizan el aire inhalado a través de ellos. Sin embargo, como el EPI es un complemento a otras medidas de seguridad, se admite el uso de mascarillas filtrantes FFP3, capaces de impedir el paso de bacterias, virus y esporas.

## 10. MICROBIOLOGÍA FORENSE Y BIOTERRORISMO. CONCEPTO DE CADENA DE CUSTODIA

La Microbiología Forense es una nueva disciplina dentro de las ciencias forenses que aplica los análisis microbiológicos a la investigación judicial. En ésta se incluye el estudio forense del bioterrorismo con el objetivo de determinar la etiología y la identidad del agente causante de un acto bioterrorista, biocrimen, amenaza o liberación accidental, para trazar su origen, empleando con frecuencia técnicas similares a las de la epidemiología.

El microbiólogo y cualquier otro especialista que intervenga en el estudio de un evento bioterrorista debe tener en cuenta que, además de las cuestiones propiamente sanitarias, el fin último de las investigaciones que se llevan a cabo es la atribución del delito al autor de los hechos. Puesto que las muestras recogidas y los análisis realizados podrían considerarse como prueba judicial debe seguirse un procedimiento similar a los usados en cualquier investigación forense. Éste incluye la investigación de la escena de los hechos y el empleo de protocolos para la recolección, el manejo, la conservación de las muestras, su transporte y análisis, la interpretación de resultados e incluso la posible presentación de la prueba ante un tribunal, todo ello preservando la cadena de custodia.

La cadena de custodia es el procedimiento que dota de trazabilidad y fiabilidad a las muestras analizadas y a todas las pruebas obtenidas durante las distintas etapas del proceso de instrucción judicial para poder demostrar que la evidencia no ha sido manipulada. Para ello se requiere disponer de documentación de cada paso en el manejo de la evidencia, es decir, desde el momento de la obtención de la muestra, su traslado al laboratorio, su procesamiento y localización durante el mismo hasta su almacenamiento o destrucción final, hasta que concluya el proceso judicial. Esta documentación implica el uso de formularios de seguimiento o registros, tanto escritos como electrónicos, que deben almacenarse en un sistema de alta seguridad. Cada persona que maneje la evidencia (personal que realice la toma de muestra, transportistas, administrativos y personal de laboratorio) debe firmar, indicando la hora y fecha y el tipo de actividad o traslado realizado o la destrucción de la muestra, cepa o productos derivados de ella. Estos registros deben garantizar la trazabilidad de todas las alícuotas, extractos de ADN/ARN, aislamientos y cepas obtenidos de las muestras originales, que también deberán identificarse de manera inequívoca e independiente. Aunque actualmente la única recomendación oficial europea con respecto a la cadena de custodia con fines legales está dirigida a las drogas incautadas (*Council Recommendation of 30 March 2004 regarding guidelines for taking samples of seized drugs. Official Journal C086, 06/ 04/2004 P.0010-0011*), es de esperar que esta recomendación se extienda pronto a otros ámbitos forenses.

## 11. SISTEMAS DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA

### 11.1. ACREDITACIÓN DE MÉTODOS

En 2013 el ISCIII, a través de la RE-LAB, lideró el proyecto: “*Iberian network of laboratories of biological alert. Accreditation of methods for detection of highly pathogenic agents*” (IB-BIOALERTNET), que fue financiado por la Comisión Europea (HOME/2012/ISEC/AG/CBRN/4000003810) y contó con la participación de otras importantes entidades científicas como el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET); el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA); dos centros de Portugal: el *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge* (INSA) y el *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária* (INIAV) y una entidad privada, *Epistem Limited*.

Uno de los objetivos principales de esta iniciativa fue la puesta en marcha de la acreditación de técnicas relacionadas con la detección de microorganismos altamente patógenos. En la actualidad, en el CNM se encuentran acreditadas por la ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) los ensayos para la detección de *B. anthracis* (norma UNE-EN ISO/IEC 17025); *Y. pestis*, *Variola major* y los filovirus Ébola y Marburg (norma UNE-EN ISO 15189).

## 11.2. EJERCICIOS INTER-LABORATORIOS EUROPEOS Y TENDENCIAS ACTUALES EN BIOSEGURIDAD

El CNM lleva participando desde 2011, y hasta la actualidad, en iniciativas europeas dedicadas al estudio y diseño de planes de preparación y respuesta ante amenazas para la Salud Pública producidas por bacterias de riesgo biológico 3 y virus de clase 4. Entre los objetivos más relevantes de estas iniciativas se encuentran:

- 1) La mejora en la capacidad y eficacia de la metodología de detección y diagnóstico.
- 2) La verificación de los avances obtenidos mediante la participación en ejercicios y controles de calidad.

El primero de estos proyectos fue “*Quality Assurance Exercises and Networking on the Detection of Highly Infectious Pathogens*”-QUANDHIP (100905) financiado por la Unión Europea entre 2011 y 2013. Participaron 39 laboratorios de 23 países europeos. Posteriormente, el CNM participó en el proyecto “*Efficient response to highly dangerous pathogens at EU level*” (EMERGE) (677066), de 2015 a 2018, con la participación de 33 entidades pertenecientes a 25 países.

En abril de 2019 comenzó una nueva propuesta, de acrónimo SHARP JA – “*Strengthened International Health Regulations and Preparedness in the EU*” - *Joint Action*- 848096, que tiene prevista una duración de 3 años y la participación de 26 países.

Formar parte de estos grandes proyectos permite, por un lado, simular una situación de emergencia, ya que la respuesta se realiza en el menor tiempo posible; y por otro, disponer de material de referencia cuantificado y validado. Por otra parte, se llevan a cabo reuniones anuales donde se presentan los resultados obtenidos por todos los países participantes, se realizan intercomparaciones y se debaten puntos de mejora en todos los niveles del proceso (extracción de las muestras, procesamiento, detección molecular, etc.)

Recientemente, ha surgido una novedosa iniciativa, el proyecto RefBio: “*RefBio project: Germany’s Contribution to Strengthen the Reference Laboratories ‘Bio’ in the UNSGM*” (support of the *United Nations Secretary-General’s Mechanism for Investigation of Alleged Use of Biological Weapons*) financiado por el Ministerio Federal de Asuntos Exteriores de Alemania con el objetivo de fortalecer a los laboratorios de referencia en la investigación y preparación ante el uso potencial de armas químicas, biológicas y toxinas. Esta iniciativa, liderada por el *Robert Koch Institute*, cuenta con la participación del CNM y está especializada en realizar controles de calidad o ejercicios: el primero de ellos, en 2018, se realizó a partir de muestras clínicas, muestras de origen alimentario y muestras ambientales inoculadas con *Y. pestis*. En el segundo en 2019, se han analizado muestras clínicas y ambientales de *B. anthracis*. Este trabajo está permitiendo mejorar la metodología de procesamiento de muestras y obtener una visión global de gran interés sobre los genomas bacterianos de agentes de alto poder patógeno. Para ello se han identificado factores de virulencia, resistencia a antimicrobianos, presencia de plásmidos, entre otras dianas, lo que posibilitará obtener las herramientas necesarias para el estudio de la trazabilidad de brotes y para distinguir entre aquellos que pueden producirse de forma natural o bien tienen un origen intencionado.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

### Artículos y capítulos de libro

1. Baron E et al, A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious disease: 2013 recommendations by the IDSA and ASM. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(4):e22-e121. doi: 10.1093/cid/cit278
2. Borio L., Hynes N.A, Henderson D.A. Bioterrorism: An Overview. En Mandell, Douglas and Bennett’s *Principles and Practices in Infectious Diseases*, 7th Edition. Ed.Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Filadelfia, PA: Churchill Livingstone Elsevier, 2009.

3. Budowle B1, Murch R, Chakraborty R. Microbial forensics: the next forensic challenge. *Int J Legal Med.* 2005;119:317-30.
4. Fernández-Rodríguez A, Cohen MC, Lucena J *et al.* How to optimise the yield of forensic and clinical post-mortem microbiology with an adequate sampling: a proposal for standardisation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 ; 34:1045-57. doi 10.1007/s10096-015-2317-x
5. Fernández-Rodríguez A, Burton JL, Andreoletti L *et al.* on behalf of ESGFOR and the ESP. Post-mortem microbiology in sudden death: sampling protocols proposed in different clinical settings. *Clin Microb Inf* 2019; 25:570-579. doi.org/10.1016/j.cmi.2018.08.009
6. O'Brien K. K, Higdon M. L., Halverson J. J. Recognition and management of bioterrorism infections. *Am Family Physician* 2003; 67:1927-1934.
7. Tucker JB. Historical trends related to bioterrorism: an empirical analysis. *Emerg. Infect Dis.* 1999; 5(4).

### Manuales, guías, recomendaciones y normativa

1. AEP-66: NATO Handbook for Sampling and Identification of Biological, Chemical, and Radiological Agents (SIBCRA), Edition A, version 1. NATO Standardization Office (NSO) de abril de 2015.
2. Biorisk Management. Laboratory Biosecurity Guidance. World Health Organization. September 2006.
3. Centers for Disease Control and Prevention: The Select Agent Program. Available at <http://www.selectagents.gov/>.
4. Council Recommendation of 30 March 2004 regarding guidelines for taking samples of seized drugs. Official Journal C086, 06/ 04/2004 P.0010-0011.
5. European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road ADR applicable as from 1 January 2011.
6. Manual de bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. OMS. Ginebra 2005.  
<https://www.boe.es/boe/dias/2019/02/23/pdfs/BOE-A-2019-2553.pdf>  
<https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
7. Medical aspects of biological warfare. Ed. Joel Bozne, PhD; Christopher K. Cote, PhD; Pamela J. Glass, PhD. Office of the Surgeon General. Borden Institute. US Army Medical Department Center and School. Health Readiness Center of Excellence. Fort Sam Houston, Texas. 2018.
8. Quick Bio-Agents: USMRIID's pocket reference guide to biological select agents and toxins. Ed. Jaspal Ahluwalia, MD, MPH; Mathew Chambers, MD, MPH; Janice Rusnak, MD; Mark Withers, MD, MPH. US Medical Research Institute of Infectious Diseases. Fort Detrick. Frederick, Maryland. First printing 2012.
9. Specimen collection and submission manual. Special Pathogens Laboratory. Diagnostic Systems Division. US Medical Research Institute of Infectious Diseases. Fort Detrick. Frederick, Maryland. June 2016.
10. The National Science Advisory Board for Biosecurity. Available at <http://www.biosecurityboard.gov>
11. Unidad de Alerta y Emergencias del Centro Nacional de Microbiología (UAE-CNM). Instituto de Salud Carlos III. Biodefensa: un nuevo desafío para la microbiología y la salud pública. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2007; 25:190-8.
12. USAMRIID's Medical management of biological casualties handbook. 8th edition. Ed. Mark R. Withers, MD, MPH. US Medical Research Institute of Infectious Diseases. Fort Detrick. Frederick, Maryland. September 2014. (Blue Book). ISBN 978-Q-16-093126-O.
13. ZEBRA MANUAL: A reference handbook for bioterrorism agents. Ed. Napolitano, J.; Eden C. R. Division of Public Health Services. Arizona Department of Health services. Phoenix, Arizona. September 7, 2004.
14. Unidad de Alerta y Emergencias del Centro Nacional de Microbiología (UAE-CNM). Instituto de Salud Carlos III. Biodefensa: un nuevo desafío para la microbiología y la salud pública. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2007;25(3):190-8.

## Anexo I. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de “Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLÓGICO	ENFERMEDAD	TRANSM. PERSONA-PERSONA	DOSIS INFECTIVA (AEROSOL/DL50)	PERIODO INCUBACIÓN	DURACIÓN ENFERMEDAD	LETALIDAD	PERSISTENCIA FUERA DEL HUESPED	DISTRIBUCIÓN	RESERVORIO/ VECTOR
<b>BACTERIAS</b>									
<i>Bacillus anthracis</i>	Ántrax respiratorio, ántrax gastrointestinal, Carbunco (ántrax cutáneo)	no	8.000-50.000 esporas	1-6 d.	3-5 d. (mortal sin tratamiento)	alta	Esporas muy estables. Persisten en suelo hasta 40 años	Mundial aunque infrecuente en países desarrollados	Vacas, ovejas, cabras y caballos
<i>Brucella</i> spp.	Brucelosis	no	10-100 organismos	5-60 d. (normalmente 30-60 d.)	semanas-meses	baja	Muy estable	Mundial con mayor prevalencia en el Área Mediterránea, Asia Occidental y países de América y África	Bovinos, bisontes, cérvidos, cabras, ovejas, cerdos
<i>Burkholderia mallei</i>	Muermo	baja	potencialmente baja	10-14 d.	7-10 d. (mortal sin tratamiento)	moderada-alta (>50%)	Muy estable	Oriente Medio, Asia, África y Centro y Sur de América.	Caballos, burros y mulas
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidosis	baja	potencialmente baja	1-21 d. (puede llegar a años)	2-3 d. (mortal sin tratamiento)	moderada	Muy estable. Persiste indefinidamente en tierra húmeda y agua estancada	Sureste asiático, Norte de Australia, Papúa Nueva Guinea, mayor parte de la India, sur de China, Hong Kong, Taiwan y Filipinas	Suelo y polvo
<i>Yersinia pestis</i>	Peste bubónica y peste neumónica	moderada (forma neumónica)	500-15.000 organismos	1-7 d. (normalmente 2-3 d.)	1-6 d. (mortal sin tratamiento)	alta	Persiste hasta 1 año en suelo. En tejido vivo hasta 270 d.	África (brote reciente en Madagascar), Sur y centro de Asia, Oriente medio, América noroeste y Sudamérica	Ratas, ratones, ardillas y pulgas
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	no	10-50 organismos	1-21 d. (normalmente 3-6 d.)	mortal sin tratamiento	moderada	Meses en suelo	Hemisferio norte (Norteamérica, Europa y Asia)	Garrapatas, mosca del ciervo y mosquitos infectados
<i>Coxiella burnetii</i>	Fiebre Q	raro	1-10 organismos	7-41 d.	2-14 d. (prolongada sin tratamiento)	baja	Meses en arena y madera	Mundial	Ovejas, vacas, cabras, gatos, perros, roedores, aves, conejos, reptiles y garrapatas
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Tifus epidémico	no	baja	7-14 d.	2 semanas	Aumenta con la edad; puede ser del 50% en mayores de 60 años	Estable en heces de piojo hasta 100 d.	Mundial con brotes relacionados con catástrofes y hacinamiento	Piojo ( <i>Pediculus humanus corporis</i> ); pulga de la ardilla voladora

## Anexo I. Continuación. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de "Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLÓGICO	ENFERMEDAD	TRANSM. PERSONA-PERSONA	DOSIS INFECTIVA (AEROSOL/DL50)	PERIODO INCUBACIÓN	DURACIÓN ENFERMEDAD	LETALIDAD	PERSISTENCIA FUERA DEL HUESPED	DISTRIBUCIÓN	RESERVORIO/ VECTOR
<b>VIRUS</b>									
Orthopox: Variola mayor	Viruela	alta	10-100 organismos	7-17 d.	4 semanas	alta	Muy estable	Erradicada en 1980	Humano
Alfavirus: Encefalitis Equina Venezolana (VEE), Encefalitis Equina del Oeste (WEE), Encefalitis Equina del Este (EEE)	Encefalitis víricas	No	10-100 organismos	EEE: 4-10d.; WEE: 2-10d.; VEE: 1-6d.	días-semanas	VEE y WEE baja; EEE moderada	Relativamente inestable	EEE en la costa este de EE. UU. y Canadá, norte de América del Sur, Caribe. WEE principalmente en América (oeste de Misisipi en los EE. UU.) VEE: Endémico en América Central y Sudamérica, Méjico, Florida y Trinidad	Mosquitos <i>Aedes</i> o <i>Culex</i> infectados por caballos o pájaros. VEE: mosquito <i>Psorophora</i> o <i>Aedes</i>
Arenavirus: Lassa, Junin, Machupo	Fiebre Hemorrágica	No habitual; puede transmitirse por fluidos contaminados	1-10 organismos	Lassa: 5-18 d. Junin, Machupo: 1-2 semanas	Lassa: 2 semanas	Lassa: 1-2% (hasta un 15-20% enfermos hospitalizados); Junin: 30%; Machupo: 25-30%	Relativamente estable; roedores infectados asintomáticos	Lassa: Africa Occidental; Junin: Pampa Argentina; Machupo: Bolivia	Excretas de roedores
Bunyavirus: Fiebre Hemorrágica Crimea-Congo (FHCC)	Fiebre Hemorrágica	Alta	1-10 organismos	1-6 d.	3-4 semanas	Moderada: 30%	Relativamente inestable	Africa y Eurasia (Turquía, Los Balcanes); Oriente Medio (Afganistán, Irán, Pakistán), Rusia, China occidental y España (desde 2016)	Garrapata género <i>Hyalomma</i>
Bunyavirus: Hanta virus	Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (HFRS): Síndrome Pulmonar por Hantavirus (HPS)	no; algunos hantavirus en Sudamérica pueden transmitirse por fluidos.		HFRS: 4-42 d.; HPS: 14-17 d.	3 semanas	5-10%; Virus Andes: 40%		Virus Hantaan y Seúl: endémicos en el sudeste asiático y Rusia (al este de los montes Urales); Virus Puumala y Dobrava: Europa y Rusia (al oeste de los Montes Urales). Otros Hantavirus: América	Inhalación de excretas de roedores infectados (orina, heces, saliva)
Filovirus: Ebola y Marburgo	Fiebres Hemorrágicas Viricas	alta	1-10 organismos	Ebola: 2 - 21 d. Marburg: 2-14 d	muerte en 7-16 d.	alta	Relativamente inestable (depende del organismo)	Ebola: Rep. Democrática Congo, Mali, Sierra Leona, Liberia, Guinea, Costa de Marfil, Sudan; Marburgo: Kenia, Angola y Zimbabue	Murciélagos, humanos infectados, primates no humanos

Anexo I. Continuación. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de "Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLÓGICO	ENFERMEDAD	TRANSM. PERSONA-PERSONA	DOSIS INFECTIVA (AEROSOL/ DL50)	PERIODO INCUBACIÓN	DURACIÓN ENFERMEDAD	LETALIDAD	PERSISTENCIA FUERA DEL HUESPED	DISTRIBUCIÓN	RESERVORIO/ VECTOR
<b>TOXINAS</b>									
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	no	0,003µg/kg para tipo A	12-36h.	Muerte en 24-72h; si no es letal, puede durar meses	alta	Semanas en agua y alimento (si no exposición UV)	Distribución mundial siendo poco frecuentes los brotes, especialmente en países desarrollados	Vegetales, frutas y pescado enlatados
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicación por toxina SEB	no	0,0004µg/kg	Post-inhalación: 2-12 horas (rango 1.5-24 horas) Post-ingestión: 1-12 horas	horas	baja	Resistente a la congelación	Mundial	Alimentos contaminados con <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Ricinus communis</i> (Castor beans)	Intoxicación por Ricina	no	3-5µg/kg (LD50 en ratones)	4-8 h. post-inhalación o inyección; 1-2 h. post-ingestión	días	alta	Estable	Distribución mundial siendo poco frecuentes los casos de intoxicación	Ricino
<i>Fusarium tricinatum</i>	Intoxicación por Tricothecenos (Mycotoxina T-2)	no	moderada	minutos-horas	días-meses	moderada	Años a temperatura ambiente	Distribución mundial siendo poco frecuentes los casos de intoxicación	Granos de cereal completo, enmohecidos, que se empleen para fabricar pan
<i>Clostridium perfringens</i> tipo B y D	Enterotoxemia por toxina Epsilon	no	70ng/kg	30-60 minutos	horas-días	alta	estable a 37°C	Distribución mundial siendo poco frecuentes los brotes, especialmente en países desarrollados	Suelo y polvo

## Anexo I. Continuación. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de “Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLOGICO	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	ELEMENTOS IDENTIFICATIVOS
<b>BACTERIAS</b>			
<i>Bacillus anthracis</i>	<b>ANTRAX PULMONAR O INHALATORIO:</b> -Fase inicial: síntomas no específicos: fiebre leve, tos no productiva, malestar general, dolor de cabeza, fatiga, mialgias, sudoración profunda, molestias en el pecho (los síntomas del tracto respiratorio superior, como la rinorrea, son raros). 1-5 días de duración. -Fase posterior: puede estar precedida por 1-3 días de mejora aparente. Inicio abrupto de fiebre alta y dificultad respiratoria severa (disnea, estridor, cianosis), síntomas de meningitis (pueden ser subclínicos). Colapso, muerte dentro de las 24–36 horas del inicio de síntomas graves.	PCR; Inmunoanálisis	Difiere de otros <i>Bacillus</i> por la producción de beta-hemolisinas, visible en ágar sangre. <i>B. anthracis</i> existe tanto como célula vegetativa, como espora estable en el medioambiente. Contiene 2 plásmidos: pXO1 y pXO2 que le proporcionan su característica virulencia y que sirven de marcadores diagnósticos en la PCR e inmunoanálisis. Los inmunoensayos serán diferentes para célula vegetativa o espora. Se requiere cultivo para confirmación. Bacilo Gram-positivo, formador de esporas, aeróbico, inmóvil, catalasa-positivo; colonias grandes, blancas-grisáceas y no hemolíticas en placas ágar-sangre (de carnero)
<i>Brucella</i> spp.	Fiebre de origen desconocido: Fiebre (ondulación: fluctuaciones horarias y diarias), sudores nocturnos, malestar, anorexia, vómitos, diarrea, ileitis, artralgias, fatiga, pérdida de peso, depresión, linfadenopatía o hepatoesplenomegalia y posible implicación de muchos otros órganos: sacroileitis, epididimoorquitis, meningitis, endocarditis y hepatitis infiltrativa.	PCR; Inmunoanálisis	Difícil diferenciar las especies de <i>Brucella</i> patógenas para el hombre ( <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> ) de las no patógenas. La diferenciación requiere de varios cultivos y determinaciones bioquímicas y son necesarias para la confirmación del diagnóstico. Cocobacilo Gram-negativo; blanco, inmóvil, no capsulado, no forma esporas, crecimiento muy lento; colonias no hemolíticas en ágar sangre. Algunas especies precisan CO <sub>2</sub> para crecer.
<i>Burkholderia mallei</i>	<u>Infección supurativa localizada aguda:</u> aparición aguda o subaguda de lesión papular o pustular local con ulceración posterior, secreción mucopurulenta (si es mucosa) y linfangitis y linfadenitis regionales. Los ganglios infectados pueden ulcerarse y drenar pus. Puede estar asociado con síntomas sistémicos. <u>Infección pulmonar aguda:</u> puede ocurrir por inhalación o siembra hematógena. Fiebre, escalofríos, rigores, mialgia, fatiga, dolor de cabeza, con dolor torácico pleurítico (secreción nasal purulenta en casos naturales). <u>Infección por septicemia aguda:</u> puede ocurrir después de una infección localizada o exposición por inhalación. Erupción papular generalizada (puede volverse pustulosa) con absceso de órganos internos (hígado, bazo, pulmones) y abscesos intramusculares (especialmente piernas y brazos). <u>Infección supurativa crónica:</u> absceso crónico múltiple (principalmente abscesos subcutáneos e IM, pero también pulmonar, ocular, esquelético, hepático, bazo); 6 semanas a 15 años de duración.	PCR	<i>Burkholderia mallei</i> no crece en ágar MacConkey. La morfología de sus colonias puede ser variable. Las pruebas de identificación bioquímica deben incluir sensibilidad a gentamicina y polimixina, determinación de arginina dihidrolasa y lysina decarboxilasa y fermentación de la arabinosa, para diferenciar <i>B. mallei</i> y <i>B. pseudomallei</i> . Bacilo Gram-negativo, oxidasa positivo, pequeño, inmóvil, no esporulado, no capsulado; su aislamiento inicial requiere 48-72h. a 37°C; colonias no hemolíticas de 1mm de ancho, blancas, aunque amarillean con el tiempo.
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<u>Exposición mucocutánea:</u> nódulo local o formación de absceso y linfadenitis regional (menos común que con muermo). La mayoría de las exposiciones percutáneas se presentaron inicialmente con neumonía o sepsis. En raras ocasiones, se presentará como un absceso focal distal con o sin sitio obvio de inoculación primaria; . La <u>exposición inhalatoria</u> generalmente produce neumonía aguda o subaguda y septicemia. 1) La <u>melioidosis septicémica</u> generalmente se presenta con fiebre, rigor, sudoración nocturna, mialgia, anorexia y dolor de cabeza. La mayoría de los pacientes son bacteriémicos. 2) La <u>melioidosis neumónica</u> puede presentarse en muchas formas, pero se ve más comúnmente como una consolidación lobular o segmentaria. La cavitación es común, el esputo a menudo es purulento y puede haber hemoptisis.	PCR	A diferencia de <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> crece bien en ágar MacConkey. La morfología de sus colonias puede ser variable. Las pruebas de identificación bioquímica deben incluir sensibilidad a gentamicina y polimixina, determinación de arginina-dehidrolasa, lisina-decarboxilasa y fermentación de la arabinosa, para diferenciar <i>B. mallei</i> y <i>B. pseudomallei</i> . Bacilo Gram-negativo, oxidasa positivo, pequeño, inmóvil, no esporulado, no capsulado; su aislamiento inicial requiere 48-72h. a 37°C; colonias no hemolíticas de 1 mm de ancho, blancas, aunque amarillean con el tiempo.

## Anexo I. Continuación. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de "Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLOGICO	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	ELEMENTOS IDENTIFICATIVOS
<b>BACTERIAS</b>			
<i>Yersinia pestis</i>	<b>PESTE NEUMÓNICA:</b> El inicio es agudo y a menudo fulminante. Síntomas iniciales de fiebre alta, escalofríos, dolor de cabeza, malestar general, mialgias; tos y taquipnea en 24 horas, produciendo finalmente esputo sanguinolento. La neumonía progresa rápidamente, dando lugar a disnea, estridor y cianosis y terminando con insuficiencia respiratoria y colapso circulatorio. Los síntomas gastrointestinales incluyen náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal.	PCR; Inmunoanálisis	<i>Y. pestis</i> posee varios plámidos que le confieren su virulencia, pero pueden ser encontrados en otras especies, lo que origina falsos positivos. La cápsula (F1) es un buen marcador para identificar <i>Y. pestis</i> , pero tiene el problema de que no se produce a la temperatura de crecimiento óptimo de <i>Y. pestis</i> (28°C), sino que a parece al cultivarlo a 35-37°C, por lo que no es un marcador fiable en muestras medioambientales. La PCR y los inmunoensayos sirven para diagnóstico presuntivo, pero la confirmación requiere de cultivo y pruebas de phagos. En medio MacConkey forma colonias cobrizas, siendo un cocabacilo pleomórfico, no formador de esporas, anaerobio facultativo.
<i>Francisella tularensis</i>	- <b>Tularemia ulceroglandular:</b> caracterizada por una aparición repentina de fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, tos y mialgias, concordante con la aparición de una pápula dolorosa en el sitio de la inoculación. La pápula progresa rápidamente a pústula y luego úlcera dolorosa (generalmente de 0.4-3.0 cm de diámetro con bordes colmados) con linfadenopatía regional dolorosa localizada. - <b>Tularemia tifoidea:</b> se manifiesta como un síndrome febril inespecífico que consiste en aparición repentina de fiebre, dolor de cabeza, malestar, mialgias, tos y postración. Ocasionalmente, los pacientes presentarán náuseas, vómitos, diarrea o dolor abdominal. - <b>Tularemia pulmonar:</b> se manifiesta como tos no productiva, molestias en el pecho y / o disnea.	PCR; Inmunoanálisis	<i>F. tularensis</i> es relativamente fácil de cultivar y su cultivo requiere confirmación, generalmente mediante inmunofluorescencia directa. Es un cocabacilo extremadamente pequeño, Gram-negativo; no esporulado; parásito intracelular facultativo; inmóvil; catalasa positiva; colonias ligeramente opalescentes en ágar-cisteína-corazón.
<i>Coxiella burnetii</i>	Inicio repentino de fiebre alta (40°C), fatiga, dolor de cabeza intenso, escalofríos, mialgias, tos seca y náuseas. Fiebre mantenida durante 2-4 días, termina después de 1-2 semanas Puede haber neumonía atípica o hepatitis aguda. La enfermedad no tratada a menudo se convierte en enfermedad crónica (como endocarditis, hepatitis crónica, meningitis aséptica, encefalitis, osteomielitis, etc.)	PCR; Inmunoanálisis	<i>C. burnetii</i> es un parásito intracelular obligado, difícil de cultivar. Generalmente el diagnóstico se realiza mediante serología, PCR e inmunofluorescencia directa.
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Inicio no específico: fiebre brusca, dolor de cabeza intenso y malestar general. Posiblemente también tos, dolor abdominal, náuseas, diarrea, escalofríos y sensibilidad muscular. El sarpullido comienza unos días después del inicio de los síntomas anteriores: máculas rojas en el tronco, que luego se extienden a las extremidades, a veces evitando palmas y plantas. Neurológico: confusión o somnolencia, raramente convulsiones o coma.	PCR	Bacteria aerobia, Gram-negativa, parásito intracelular obligado.

## Anexo I. Continuación. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de "Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLOGICO	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	ELEMENTOS IDENTIFICATIVOS
<b>VIRUS</b>			
Orthopox: Variola mayor	Inicio agudo: fiebre, malestar general, dolor de cabeza, rigores, postración, vómitos, dolor de espalda. A los 2 - 3 días, se desarrolla una erupción en la orofaringe, seguida de (o concomitantemente) con una erupción en la cara, luego en los antebrazos y las piernas, luego en el tronco y, posteriormente, en las manos y los pies. Las lesiones progresan de máculas a pápulas, luego a vesículas (generalmente en el día 3) y pústulas en los días 5 o 6 (pústulas descritas como lesiones umbilicadas profundamente incrustadas en la piel; sensación de cuerpo extraño redondo y duro en la palpación de la lesión). Las lesiones permanecen sincrónicas en las etapas de desarrollo. En el día 10-14, las pústulas comienzan a formar costras. Se considera que ya no es contagioso después de que todas las costras se hayan caído (generalmente 3 semanas después del inicio de la erupción).	PCR; Inmunoanálisis	Virus DNA, bicatenario; morfología de ladrillo, con envuelta. Al microscopio se aprecian inclusiones: cuerpos de Guarnieri. Su identificación debe hacerse en el CDC.
Alfavirus: Encefalitis Equina Venezolana (VEE), Encefalitis Equina del Oeste (WEE), Encefalitis Equina del Este (EEE)	<b>EEE:</b> Pródromo de malestar, seguido de fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y diarrea. En días (hasta 11 días) síntomas de inicio abrupto del SNC (rigidez en el cuello, temblores, espasmos musculares, parálisis espástica, confusión, somnolencia, coma, convulsiones). Secuelas neurológicas ~ 30% de los casos. Mortalidad 36-80%. <b>WEE:</b> Dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, diarrea, dolor de garganta, fotofobia, mialgias, vértigo. Puede progresar a afectación del SNC en pocos días (confusión, somnolencia, coma, rigidez en el cuello, espasmos musculares, temblores, parálisis espástica, convulsiones). La mayoría de los adultos se recuperan en ~ 10 días sin secuelas (30% de los niños con secuelas). Mortalidad 3-10%. <b>VEE:</b> Inicio agudo de fiebre, escalofríos, dolor de cabeza intenso, malestar generalizado, fotofobia y mialgias que son prominentes en los muslos y la espalda baja; seguido de náuseas, vómitos, tos, dolor de garganta y diarrea. Los síntomas graves generalmente desaparecen en 2-5 días, seguidos de malestar y fatiga durante 1-2 semanas antes de la recuperación total en la mayoría de los adultos. Encefalitis en ~ 0.5% adultos y 4% niños. Mortalidad <1%.	PCR; Inmunoanálisis	Virus RNA lineal (sentido positivo), monocatenario; con envoltura; viriones esféricos con espículas de glycoproteínas. Cultivado en células Vero tiene efecto citopático.
Arenavirus: Lassa, Junin; Machupo	<b>LASSA:</b> Fase prehemorrágica: fiebre de inicio gradual, debilidad, fatiga. Días 3-4 enfermedad: artralgias, dolor de espalda, tos no productiva, dolor retroesternal o epigástrico agudo o ardiente; Días 4-5 de la enfermedad: dolor de cabeza intenso, dolor de garganta, síntomas gastrointestinales (calambres, náuseas, vómitos, diarrea). Diagnóstico sugerido por tríada de faringitis, dolor torácico retroesternal y proteinuria o vómitos, en área endémica. Enfermedad leve: la mayoría de los casos leves; recuperación dentro de 8 a 10 días. Enfermedad moderada-severa: progresión rápida de la enfermedad (días 6 a 10); Los casos severos pueden desarrollar dificultad respiratoria, shock, sangrado o encefalopatía. Factores pronósticos negativos: AST $\geq 150$ UI / ml (55% de mortalidad); tríada de fiebre, dolor de garganta y vómitos; alta carga viral en suero; sangrado.	PCR	Los virus Lassa son virus de ARN envueltos, monocatenarios, bisegmentados y ambisensivos. Su genoma está contenido en dos segmentos de ARN que codifican dos proteínas cada uno, uno en cada sentido, para un total de cuatro proteínas virales.

## Anexo I. Continuación. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de "Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLOGICO	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	ELEMENTOS IDENTIFICATIVOS
<b>VIRUS</b>			
Bunyavirus: Fiebre Hemorrágica Crimea-Congo (FHCC)	Fase prehemorrágica (dura 3 días): fiebre, mialgias, vómitos, dolor de cabeza, fotofobia, mareos, conjuntivitis, hiperemia de cara / cuello, esclerótica congestionada, ictericia. Fase hemorrágica (dura 2-3 días, comienza 3-5 días después del inicio): petequias, equimosis, epistaxis, sangrado gingival, hematemesis y melena. Convalecencia (días 10-20 después del inicio): debilidad, confusión, pulso lábil, mala visión / audición / memoria, pérdida completa temporal del cabello, polineuritis, dificultad para respirar.	PCR	El orthonairovirus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV) es un miembro del género Orthonairovirus, familia Nairoviridae de virus de ARN. Los viriones tienen un diámetro de 80-120 nanómetros (nm) y son pleomórficos. No hay ribosomas del huésped dentro del virión. Cada virión contiene tres copias del genoma.
Bunyavirus: Hanta virus	<b>HFRS:</b> Enfermedad febril con insuficiencia renal; generalmente solo manifestaciones de hemorragia leve Presentación inicial: enfermedad febril indiferenciada con fiebre de inicio agudo, dolor de cabeza, malestar general, mialgia y náuseas / vómitos. Frecuente el dolor abdominal, de flanco o de espalda. Conjuntiva inyectada, edema facial, enrojecimiento facial, petequias a menudo presentes. Trombocitopenia y proteinuria. Fase oligúrica: a menudo asociada con insuficiencia renal (diálisis en 40% de los casos). <b>HPS:</b> Enfermedad febril asociada a insuficiencia respiratoria por edema pulmonar. Presentación inicial: pródromo febril con mialgia severa, dolor de cabeza y malestar de 3 a 5 días (rango 1-12 días) de duración. La tos / disnea a menudo no está presente hasta el final de la fase del pródromo, a menudo precede al inicio del edema pulmonar. El recuento bajo de plaquetas puede ayudar a diferenciarse de la enfermedad febril autolimitada. Fase cardiopulmonar: a menudo inicio abrupto de edema pulmonar y shock; el edema pulmonar puede progresar rápidamente durante 4-24 horas y requiere soporte de ventilación; dura ~ 3 a 6 días en sobrevivientes (muerte en 1-3 días en casos severos). Insuficiencia renal, hemorragia y miopericarditis con el virus de los Andes, pero poco frecuente en el virus Sin nombre. Duración de la enfermedad: mejora rápida después del inicio de la diuresis (inicio generalmente en la 2ª semana de la enfermedad). Mortalidad: ~ 40% con SNV y virus de los Andes	PCR	Los viriones de hantavirus tienen forma esférica con un tamaño que varía entre 80 y 120 nm. Cada virión generalmente contiene cantidades equimolares de ARN genómico, con una sola molécula de la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) unida a cada segmento de ARN viral.
Filovirus: Ebola y Marburgo	Inicio brusco con fiebre, síntomas constitucionales, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, linfadenopatía, faringitis, inyección conjuntival, ictericia y pancreatitis. La erupción maculopapular a menudo ocurre aproximadamente en el día 5. El delirio, la obnubilación y el coma son comunes. Las características hemorrágicas se desarrollan a medida que la enfermedad progresa.	PCR	Virus RNA, monocatenario, lineal sensenegativo. El virus del Ébola generalmente tiene aproximadamente 80 nm de diámetro y 970 nm de largo. Son cilíndricos / tubulares y contienen envoltura viral, matriz y componentes de nucleocápsides.

## Anexo I. Continuación. Descripción de los principales agentes biológicos (ver tabla) (Modificado de "Medical Aspects of Biological Warfare. Ed. Joel Bozne, 2018)

AGENTE ETIOLOGICO	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	ELEMENTOS IDENTIFICATIVOS
<b>TOXINAS</b>			
<i>Clostridium botulinum</i>	Parálisis flácida simétrica, descendente y aguda, que comienza inicialmente con parálisis de los nervios craneales (síntomas oculares de visión borrosa, diplopía y / o ptosis seguidos de disartria, disfonía y / o disfagia) en un afebril con sensorium normal. Seguido de debilidad / parálisis de brazos, músculos respiratorios accesorios y luego extremidades inferiores. No afecta el nervio sensorial. La insuficiencia respiratoria puede ocurrir abruptamente debido a la obstrucción de la vía aérea superior o la debilidad de los músculos respiratorios accesorios. Síntomas SNA: sequedad de boca, íleo paralítico, estreñimiento, retención urinaria.	PCR; Inmunoanálisis	Bacilo grampositivo; formación de esporas; anaerobio obligado, catalasa negativa; producción de lipasa en ágar de yema de huevo; La toxina (tipos A – G) es una proteína de 150,000 Da.; 2 subunidades
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fase inicial: síntomas inespecíficos similares a la gripe, como fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y mialgias. Los síntomas posteriores dependen de la ruta de exposición. 1) Ingestión: síntomas gastrointestinales: náuseas, vómitos y diarrea durante 1-2 días. 2) Inhalación: síntomas respiratorios de tos no productiva, dolor torácico retroesternal, disnea (puede progresar a edema pulmonar), shock y muerte. Rinorrea, congestión sinusal y faringitis en un tercio de los casos. La fiebre / síntomas pueden persistir hasta 5 días y toser hasta 4 semanas. 3) Ocular: conjuntivitis, hinchazón localizada, pueden presentarse síntomas gastrointestinales (por ingestión accidental de toxina o efecto directo del SNC). El cuadro suele resolverse en 4-5 días.	Inmunoanálisis	Cocos Gram-positivo, anaeróbico facultativo, colonias grandes, blanco a amarillo, colonias beta-hemolíticas en ágar sangre; típica forma "racimo de uva" en Tinción de Gram; catalasa y coagulasa positivo; múltiples toxinas
<i>Ricinus communis</i> (Castor beans)	<b>Inhalación:</b> fiebre, opresión en el pecho, tos, disnea, náuseas y / o diaforesis con dosis subletales en humanos. Dosis más altas (primates no humanos) causan respiración dificultosa dentro de las 18-24 horas; edema pulmonar debido a necrosis de las vías respiratorias y fuga capilar; dificultad respiratoria severa y muerte en 36-48 horas. <b>Ingestión:</b> inicio de náuseas severas, vómitos, calambres abdominales; seguido de diarrea, colapso vascular, shock, muerte (si es una dosis más alta). Necrosis del epitelio gastrointestinal, hemorragia local; necrosis hepática, esplénica y renal. La ingesta de ricina puede resultar menos toxina debido a la degradación de la toxina por enzimas / mala absorción. <b>Inyección IM o SC:</b> dolor, induración y necrosis de tejido en el sitio de inyección con linfadenopatía localizada; síntomas sistémicos de debilidad, náuseas, vómitos, fiebre, diarrea, dolor de cabeza, dolor en el pecho / abdomen; sangría; insuficiencia orgánica terminal (hígado, renal), hipotensión / colapso vascular y muerte en 72 h.	PCR; Inmunoanálisis	La estructura cuaternaria de la ricina es un heterodímero globular glucosilado de aproximadamente 60-65 kDa. La cadena A de la toxina ricina y la cadena B de la toxina ricina son de pesos moleculares similares, aproximadamente 32 kDa y 34 kDa, respectivamente. La cadena A (RTA) es una N-glucósido hidrolasa compuesta de 267 aminoácidos.
<i>Fusarium tricinctum</i>	Cuadro cutáneo: ardor, enrojecimiento, sensibilidad, ampollas y progresión a necrosis de la piel. Cuadro respiratorio: picazón nasal, dolor, estornudos, epistaxis y rinorrea. La toxicidad pulmonar y traqueobronquial produce disnea, sibilancias y tos. La exposición a la boca y la garganta causa dolor y saliva y esputo teñidos de sangre. Cuadro GI: anorexia, náuseas, vómitos y diarrea acuosa o con sangre con dolor abdominal tipo calambre Cuadro sistémico: a través de cualquier ruta de exposición, y produce debilidad, postración, mareos, ataxia y pérdida de coordinación. La taquicardia, la hipotermia y la hipotensión son signos fatales.		Los tricotecenos tienen un anillo sesquiterpenoide tetracíclico 12,13-epoxytrichothec-9-eno en común, y el anillo 12,13-epoxy que es responsable de la actividad toxicológica.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo B y D	Diarrea, distress respiratorio y disfunción SNC (convulsiones, opistótonos, movimientos incontrolados, ataxia)	Enviar al CDC	La toxina epsilon de <i>C. perfringens</i> es una proteína de 311 aminoácidos (32.9 kDa) secretada como una protoxina; activado posteriormente por proteasas extracelulares (tripsina y quimotripsina) que eliminan el terminal amino (14 aminoácidos) y carboxi-terminal (29 aminoácidos). La toxina es resistente a la inactivación por proteasas de tipo serina comúnmente encontrado en toda la naturaleza, incluidas las del aparato digestivo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

## PNT-BT-01

### Detección de ADN de *Bacillus anthracis* mediante PCR en tiempo real

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2010	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este procedimiento es describir el método de detección de ADN de *Bacillus anthracis* mediante PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan. Este procedimiento es aplicable a los ADNs de todas aquellas muestras ambientales en las que se sospeche la presencia de *B. anthracis*.

## 2. FUNDAMENTO

En el Laboratorio de Referencia e Investigación en Patógenos Especiales del CNM (ISCIII) se reciben muestras ambientales con sospecha de contener *B. anthracis*. Por esta razón, se ha puesto a punto una técnica de PCR en tiempo real basada en la diana cromosómica BA5345 [Antwerpen y cols. 2008. Mol. Cell. Prob. 22 (5-6): 313-5] para detectar de forma rápida y específica ADN de *B. anthracis*.

Una vez obtenido el ADN mediante extracción de ADN a partir de muestras con sospecha de contener esporas de *B. anthracis*, se realiza la técnica de PCR siguiendo el presente procedimiento. La extracción se puede llevar a cabo mediante *kits* comerciales como QIAmp DNA Minikit (Qiagen®) u otros similares disponibles en el mercado. La extracción de ADN mencionada, que conlleva la inactivación de *B. anthracis* se realizará en el Laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (en adelante BSL3).

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C, Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Saénz JL, Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Manual de instrucciones del kit de extracción: QIAmp DNA Minikit (Qiagen®).
4. Manual o Instrucción Técnica para el manejo de un equipo de PCR en tiempo real.

## 4. MUESTRAS

- a) Polvo resuspendido en tampón AVL (compuesto químico utilizado como desnaturante de proteínas en general, que contiene la sal caotrópica, tiocianato de guanidinio). Se trata de un buffer de lisis de partículas virales que se utiliza para la inactivación de la viabilidad de muchos microorganismos procariontes y la purificación de ácidos nucleicos).
- b) Hisopo de polvo sumergido en tampón AVL.
- c) Soporte sólido sumergido en tampón AVL.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N°1	Página 3 de 9

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

### 5.1. Reactivos

- Agua para PCR libre de ADNasas y ARNasas (W4502, Sigma-Aldrich) o similar.
- Master Mix Sso-fast (172-5280/172-5281/172-5282 BioRad) o similar.
- Cebador F: Dhp61\_183\_113F.
- Cebador R: Dhp61\_183\_208R.
- Sonda: Dhp61\_183\_143T.
- Cebador F (Control Interno, a partir de ahora CI): FCI-RT1.
- Cebador R (CI): RCI-RT2.
- Sonda (CI): 1CI-RT-CS.
- Plásmido de CI Referencia: ANDA P, ESCUDERO R, RODRÍGUEZ-MORENO I, JADO I, JIMÉNEZ-ALONSO MI. 2006. *Method and kit for the detection of bacterial species by means of DNA*. U.S. patent WO/2006/136639.
  - <http://www.google.com/patents/US8445195>;
  - <http://www.google.com/patents/US8445195#backward-citations>

### 5.2. Patrones y materiales de referencia

Como material de referencia para el control positivo se utilizará ADN de una cepa de referencia de *B. anthracis* validada. Las cepas se deben almacenar en un congelador de -80°C en instalaciones del BSL3. El ADN se extraerá y conservará de acuerdo con las especificaciones y controles de calidad de cada laboratorio.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. EQUIPO DE LABORATORIO

#### 6.1.1. Aparatos, instrumentos y material volumétrico

- Cabinas de bioseguridad.
- Minicentrífuga.
- Pipetas mecánicas de intervalos variables: 0,2-2, 1-10, 2-20, 20-200 y 100-1000 µL.
- Congeladores de -20°C.
- Nevera.

#### 6.1.2. Equipo de PCR en Tiempo Real CFX96 (BioRad) o similar. Material fungible y auxiliar

- Gradillas para tubos eppendorf.
- Gradillas de frío.
- Tubos de tapón de colores.
- Tubos opacos de 0,5 mL.
- Puntas de pipeta estériles con filtro.
- Tira de tubos transparentes para PCR en tiempo real.
- Tapas para tubos de PCR para PCR en tiempo real.
- Guantes.
- Tubos de 0,2 µL.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N° 1	Página 4 de 9

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. PREPARATIVOS

Todo el procedimiento se realizará en un laboratorio con separación de áreas, tal y como se indica a continuación, en cabina de bioseguridad y con guantes hasta la colocación de los tubos en el equipo de PCR o termociclador.

### 7.2. REALIZACIÓN

#### 7.2.1. Distribución de áreas de trabajo

- Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos.
- Área 2 de manipulación de muestras y extracción de ADN.
- Área 3 de amplificación y análisis post-PCR.

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo el estrictamente necesario. El flujo de trabajo debe ser: área 1→2→3 y nunca a la inversa.

#### 7.2.2. Oligonucleótidos. Reacción de PCR (Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos)

Las secuencias de los cebadores y la sonda utilizadas en el ensayo son las siguientes:

	Nombre	Secuencia
<b>Cebador F (BA)</b>	Dhp61-183-113F	5'-CGTAAGGACAATAAAAGCCGTTGT-3'
<b>Cebador R (BA)</b>	Dhp61-183-208R	5'-CGATACAGACATTTATTGGGAACACTACAC-3'
<b>Sonda (BA)</b>	Dhp61-183-143T	5'-FAM-TGCAATCGATGAGCTAATGAACAATGACCCT-BHQ1-3'
<b>Cebador F (CI)</b>	FCI-RT1	5'-GTATTGCCCTACTGTTGGCG-3'
<b>Cebador R (CI)</b>	RCI-RT2	5'-ACCACCACGTATAGCCCAA-3'
<b>Sonda (CI)</b>	1CI-RT-CS	5'-Cy5-TAGTGGAGGAGGCTATGGAGCATTGATG-BHQ3-3'

Los cebadores y sondas llegan liofilizados y se almacenarán a 4°C, en la zona del laboratorio habilitada para la preparación de reactivos y *master-mix*, protegidos de la luz hasta que se reconstituyan.

Para reconstituir los cebadores y sondas hay que emplear agua para PCR que se puede guardar repartida en nevera. Las alícuotas de agua que se empleen serán de un solo uso.

Los cebadores de BA se reconstituirán a una concentración de 500 pmol/μL (10X) y de ésta se prepararán varias alícuotas de 50 pmol/μL (1X). Si la cantidad de cebador suministrada no es suficiente se reconstituirán a una concentración final de 50 pmol/μL.

La sonda se reconstituirá a una concentración de 50 pmol/μL (1X) y se harán alícuotas en tubos de 0,5 ml opacos.

Los cebadores de CI se reconstituirán a una concentración de 100 pmol/μL y la sonda a 40 pmol/μL y se prepararán alícuotas en tubos de 0,5 ml opacos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N°1	Página 5 de 9

Para su uso en las reacciones de PCR se prepararán 2 premezclas (preMix) de cebadores y sondas de la siguiente forma:

Mezcla A de oligos y sonda de *Bacillus anthracis* (BA):

- 45 µL de Dhp61\_183\_113F (50 pmol/µL)
- 15 µL de Dhp61\_183\_208R (50 pmol/µL)
- 12,5 µL de Dhp61\_183\_143T (50 pmol/µL)

Mezcla B de oligos y sonda de Control Interno (CI):

- 5 µL de FCI-RT1 (100 pmol/µL)
- 5 µL de RCI-RT2 (100 pmol/µL)
- 5 µL de 1CI-RT-CS (40 pmol/µL)
- 20 µL de plásmido CI (104 copias/µL)
- 65 µL de agua

Estas pre-mezclas también se repartirán en tubos opacos de 0,5 ml y se guardarán a -20°C.

Todas las alícuotas se rotularán con el número de lote y fecha.

Toda la información referente a las sondas, cebadores y sus alícuotas, así como los tubos que contienen las pre-mezclas se reflejará en el formulario adecuado. Estas hojas se guardarán en el laboratorio de *master-mix*.

### 7.2.3. Preparación de la mezcla de la reacción

En función del número de reacciones de PCR necesarias para el ensayo se preparará una mezcla con la siguiente composición:

Componentes	Volumen 1 reacción
Master-Mix Sso-fast (BioRad) o similar	10 µL
Mix A <sup>1</sup> de cebadores y sonda diana BA	0,6 µL
Mix B <sup>2</sup> de cebadores, sonda de CI y plásmido de CI	2,0 µL
Agua PCR	2,4 µL
<b>Total</b>	<b>15,0 µL</b>

<sup>1</sup>Usando esta mezcla se consigue una concentración final en la reacción de 0,9 µM de Dhp61\_183\_113F; 0,3 µM de Dhp61\_183\_208R y 0,25 µM de sonda Dhp61\_181\_143T. Esta mezcla se almacena a -20°C.

<sup>2</sup>Usando esta mezcla se consigue una concentración final en la reacción de FCI-RT1 y RCI-RT2 de 0,5 µM y 0,2 µM de sonda 1CI-RT-CS.

Previo a la preparación de la mezcla se atemperarán las alícuotas de uso de los cebadores y del *Master Mix Sso-fast*. Este último una vez descongelado puede mantenerse a 4°C hasta 6 meses por lo que la primera vez que se descongele se conservará a 4°C y se apuntará la fecha en el tubo para no sobrepasar ese periodo de tiempo.

Los datos de las alícuotas empleadas en la preparación de la mezcla se anotarán en un formulario de PCR diseñado por el laboratorio y que contenga los datos más importantes del proceso. Este formulario se almacenará como registro interno del laboratorio incluyendo entre los datos recogidos la fecha, los operadores (que deben firmarlo), número de lote de los reactivos y su fecha de caducidad, etc. Este documento, que

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N°1	Página 6 de 9

forma parte de las Hojas de Registro de Datos del laboratorio, deberá contener la información mínima requerida para poder utilizarse como parte del sistema de custodia de las muestras.

De esta mezcla se repartirán 15 µL en cada tubo de la tira o placa. En cada reacción se deja un margen de hasta 5 µL de ADN de la muestra para añadir a cada tubo.

Los tubos alicuotados se trasladarán a la zona del laboratorio habilitado para la extracción donde se les añadirán las cantidades correspondientes de ADN.

Las gradillas que se utilizan en cada laboratorio no deben pasar de una zona a otra.

#### 7.2.4. Muestras y controles (Área 2 de manipulación de muestras y extracción de ADN)

Las muestras a analizar serán:

- a) Polvo resuspendido en AVL
- b) Hisopo sumergido en AVL
- c) Soporte sólido sumergido en AVL. El ADN de estas muestras se extraerá según el protocolo de extracción validado en el laboratorio. Para ello se pueden utilizar kits comerciales disponibles en el mercado, como QIAmp DNA Minikit (Qiagen®) u otros similares.

#### 7.2.5. Reacción de PCR

Se incluirán en cada ensayo:

- Los ADNs de las muestras problema, puro y dilución 1/10, ambas por duplicado.
- 5 µL de agua como control negativo de PCR.
- El ADN de control positivo que contendrá 1000, 100 y 10 EG (Equivalentes de Genoma) por reacción. Estos se obtendrán añadiendo respectivamente 5 µL de las alícuotas de 10<sup>3</sup> EG/5 µL, 10<sup>2</sup> EG/5 µL y 10 EG/5 µL de una cepa de *B. anthracis* a cada tubo de reacción.
- Un control negativo de extracción: 5 µL de la elución de la columna que corresponde al procesamiento de los mismos reactivos utilizados en la extracción de las muestras en estudio pero que no llevan ninguna muestra, sirve para validar que todos los componentes del *kit* están libres de contaminantes de la PCR (este paso es muy conveniente, aunque no se realiza de forma generalizada).

#### 7.2.6. Desarrollo de la PCR

En cada tubo de la tira se añade la cantidad correspondiente de muestra o controles.

Una vez utilizados, los ADN de las muestras se conservarán congelados a -20°C con el número de muestra correspondiente.

Una vez preparadas las reacciones se llevarán a la zona del laboratorio habilitada para la amplificación, donde se aplicará un *spin* en la microcentrifuga antes de colocarlas en el termociclador en tiempo real (Área 3 de amplificación y análisis post-PCR)

Para su uso se seguirá una instrucción técnica de procedimiento de uso específica para el manejo del termociclador en tiempo real (puede ser CFX96 de BioRad u otro similar).

La detección de los amplicones específicos de *B. anthracis* se realizará utilizando el canal FAM. La detección del CI se llevará a cabo en el canal Cy5.

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N°1	Página 7 de 9

CFX 96		
<b>Nombre del programa</b>	ANTRAX (u otro nombre)	
<b>Desnaturalización</b>	95°C 2 min	1 ciclo
<b>Amplificación</b>	95°C 5 seg	45 ciclos
	55°C 10 seg	
	Lectura del tubo	

El experimento se guardará en el ordenador con datos (nombre y fecha) inequívocos para diferenciar cada uno de los ensayos.

Para la visualización de los resultados previamente se ajustará el umbral de detección a 100 RFUs (*Relative Fluorescence Units*). Los resultados del ensayo se considerarán como:

**POSITIVO:** si la fluorescencia de la sonda FAM observada durante la amplificación es superior a 100 RFUs y sigue una curva sigmoidea.

**NEGATIVO:** si la fluorescencia observada de FAM está por debajo de 100 RFUs o no sigue una curva sigmoidea.

**INHIBIDO:** si la fluorescencia observada de Cy5 está por debajo de 100 RFUs o no sigue una curva sigmoidea. Se ha observado experimentalmente que concentraciones elevadas de ADN de la diana de BA ( $\geq 10^6$  EG/5) pueden salir inhibidas en el canal Cy5 y positivas en FAM. Este resultado sería considerado como POSITIVO y se procederá como tal.

A continuación, se registrarán los valores de ciclo umbral (CT, "*cycle threshold*") para cada resultado positivo y N/A (no aplicable) en el caso de las reacciones negativas. El resultado obtenido en cada reacción se transcribirá a un formulario de PCR para la detección de *B. anthracis* correspondiente a cada experimento.

## 7.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ENSAYO

### 7.3.1. Controles de calidad internos

En cada ensayo se incluirán tres controles positivos que contendrán 1000, 100 y 10 EG de *B. anthracis* por reacción y un control negativo de PCR (agua).

Al menos una vez al año se realizará una PCR utilizando los controles positivos y el control negativo para comprobar el correcto funcionamiento de la técnica.

Cada 5 años se recomienda llevar a cabo una extracción de ADN de una cepa de control de referencia validada de *B. anthracis* y realizar 5 verificaciones independientes analizando diluciones seriadas que contengan desde  $10^5$  EG hasta 1 EG por reacción siguiendo las indicaciones de la instrucción técnica para la verificación y validación de controles positivos puestas a punto por cada laboratorio. Con los resultados obtenidos se determinará la media de los ciclos umbral (CT), las desviaciones estándar y los intervalos de confianza, así como el límite de detección.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N°1	Página 8 de 9

### 7.3.2. Intercomparaciones

Se recomienda realizar intercomparaciones nacionales o internacionales que contemplen ejercicios de controles de calidad para la detección molecular de este patógeno.

## 8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Las acciones a llevar a cabo dependerán de los resultados obtenidos de las muestras y de los controles que se han introducido en cada ensayo:

1. Los valores de CT de los controles positivos deben ajustarse a lo especificado en un documento de Validación de controles positivos de PCR.
2. El control negativo de la amplificación debe resultar negativo.
3. El control negativo de extracción debe resultar negativo.
4. Todas muestras deben ser positivas en el canal de Cy5 lo que determina la ausencia de inhibidores de la polimerasa en el extracto de ácido nucleico analizado, con la excepción de muestras positivas con elevada carga bacteriana que pueden resultar inhibidas.

### 8.1. ACCIONES A EMPRENDER EN CASO DE CUMPLIMIENTO

Los resultados se validarán y se emitirá el correspondiente informe.

### 8.2. ACCIONES A EMPRENDER EN CASO DE INCUMPLIMIENTO

#### Situación 1:

Ninguno de los tres controles positivos se encuentra dentro del rango con fluorescencia superior a 100 RFUs y siguen el perfil de amplificación de una curva sigmoidea. Se asume que ha habido una pérdida de sensibilidad que afectaría a las muestras negativas

Acción: validación de los resultados positivos en su caso y emisión del correspondiente informe. Repetir las muestras con resultado negativo.

#### Situación 2:

Los controles positivos presentan una fluorescencia inferior a 100 RFUs. Se asume que ha habido un problema que ha afectado a la PCR.

Acción: repetir el ensayo.

#### Situación 3:

El control negativo de PCR presenta fluorescencia superior a 100 RFUs. Se asume que ha habido un problema de contaminación que puede afectar a las muestras positivas.

Acción: validación de los resultados negativos.

Repetir la PCR de las muestras con resultado positivo.

#### Situación 4:

El control negativo de extracción presenta fluorescencia superior a 100 RFUs. Se asume que ha habido un problema de contaminación en la extracción que puede afectar a las muestras positivas.

Acción: validación de los resultados negativos.

Repetir la extracción de las muestras positivas.

#### Situación 5:

Tres o las cuatro reacciones de la PCR correspondiente a los duplicados de la muestra y su dilución 1/10 han presentado inhibición. Se asume que en la extracción de los ácidos nucleicos existen inhibidores de la

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-BT-01 Detección de ADN de <i>Bacillus anthracis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-01	
		Edición N°1	Página 9 de 9

enzima taq polimerasa que impiden la amplificación.

Acción: repetir la extracción de la muestra.

En caso de repetirse el mismo problema se solicitará una nueva muestra al cliente.

#### Situación 6:

Sólo una de las cuatro reacciones de la PCR correspondiente a los duplicados de la muestra y su dilución 1/10 ha sido positiva. Se asume que puede tratarse de un falso positivo.

Acción: repetir la muestra.

En caso de obtenerse resultado similar se volverá a extraer la muestra.

#### Situación 7:

La PCR correspondiente a la muestra y a su duplicado han resultado positivas. Se asume que se trata de una muestra positiva (aunque la dilución 1/10 pueda resultar negativa por pérdida de sensibilidad, en caso de muestras límite).

Acción: validar el resultado positivo y emitir el informe.

Los resultados se emitirán siguiendo el procedimiento interno de cada laboratorio para la elaboración, emisión y modificación de informes de laboratorio.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico y experiencia en un laboratorio con los requisitos de bioseguridad y de separación de áreas establecidos. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, el transporte y la conservación, para casos de potencial liberación intencionada, se llevan a cabo por parte de los Cuerpos y Fuerzas de Seguridad del Estado especializados y cualificados para este tipo de actividades.

## 10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida. Ocasionalmente, se pueden producir inhibiciones de la PCR que no permitirán obtener un resultado y que se detectarán por falta de amplificación de la diana de control interno. Si no se consigue amplificación del control interno el resultado deberá informarse como: "muestra inhibida". Otras limitaciones del procedimiento podrían deberse a la degradación de la muestra o a la baja carga bacteriana presente en la misma (muestras límite).

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Antwerpen M, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. Mol. Cell. Prob. 2008, 22 (5-6): 313-315.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 1	Página 1 de 9

## PNT-BT-02

### Detección de ADN de *Yersinia pestis* mediante PCR en tiempo real

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este procedimiento es describir el método de detección de ADN de *Yersinia pestis* mediante PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan. Ante una potencial sospecha de la enfermedad de la peste pueden recibirse muestras clínicas con sospecha de contener *Y. pestis*. Por esta razón, se han puesto a punto dos técnicas de PCR en tiempo real basadas en las dianas plasmídicas *pla* y *caf1* para detectar de forma rápida y específica ADN de *Y. pestis*.

## 2. FUNDAMENTO

Este procedimiento es aplicable al ADN extraído de las muestras de sangre (con EDTA o citrato), biopsia de ganglio, aspirado o lavado bronquial y esputo con sospecha de infección por *Y. pestis*, que se reciban en el laboratorio para su detección mediante PCR en tiempo real, que serán realizadas por su personal de acuerdo con su nivel de cualificación. Una vez obtenido el ADN siguiendo un procedimiento de extracción del mismo a partir de la muestra, se realiza la técnica de PCR siguiendo el presente procedimiento. La extracción se puede llevar a cabo mediante *kits* comerciales como QIAmp DNA Minikit (Qiagen®) u otros similares disponibles en el mercado. La extracción de ADN mencionada, que conlleva la inactivación de *Y. pestis* se realizará en el Laboratorio de Bioseguridad de Nivel 3 (en adelante BSL3) cuando se trate del cultivo de cepa. La inactivación y extracción a partir de muestra clínica se puede llevar a cabo en un BSL2.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C, Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Sáenz JL, Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Manual de instrucciones del *kit* de extracción: QIAmp DNA Minikit (Quiagen®).
4. Manual o Instrucción Técnica para el manejo de un equipo de PCR en tiempo real.

## 4. MUESTRAS

- a) Sangre (en EDTA o citrato)
- b) Biopsia de ganglio
- c) Muestras respiratorias: aspirado o lavado bronquial y esputo

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

### 5.1. REACTIVOS

- Agua para PCR libre de ADNasas y ARNasas (W4502, Sigma-Aldrich) o similar.
- Master Mix Sso-fast (172-5280/172-5281/172-5282 BioRad) o similar.
- Cebadores: YPplaS, YPplaR, YPcaf1BK2, YPcaf1S2.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

- Sondas: YPplaTM, YPcaf1TM.
- Cebador F (Control Interno, CI a partir de ahora): FCI-RT1.
- Cebador R (CI): RCI-RT2.
- Sonda (CI): 1CI-RT-CS.
- Plásmido de CI. Referencia: Anda P, Escudero R, Rodríguez-Moreno I, Jado I, Jiménez-Alonso MI. 2006. *Method and kit for the detection of bacterial species by means of DNA*. U.S. patent WO/2006/136639. <http://www.google.com/patents/US8445195>;  
<http://www.google.com/patents/US8445195#backward-citations>.

## 5.2. PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA

Como material de referencia para el control positivo se utilizará ADN de una cepa de referencia de *Y. pestis* validada. La cepa debe almacenarse en un congelador de -80°C en instalaciones de Laboratorio de Bioseguridad de Nivel 3 (en adelante BSL3). El ADN se extraerá y conservará de acuerdo con las especificaciones. El ADN se extraerá y conservará de acuerdo con las especificaciones y controles de calidad de cada laboratorio.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. EQUIPO DE LABORATORIO

#### 6.1.1. Aparatos, instrumentos y material volumétrico

- Cabinas de bioseguridad.
- Minicentrífuga.
- Pipetas mecánicas de intervalos variables: 0,2-2, 1-10, 2-20, 20-200 y 100-1000 µL.
- Congeladores de -20°C.
- Nevera.

#### 6.1.2. Equipo de PCR en Tiempo Real CFX96 (BioRad) o similar. Material fungible y auxiliar

- Gradillas para tubos eppendorf.
- Gradillas de frío.
- Tubos de tapón de colores.
- Tubos opacos de 0,5 mL.
- Puntas de pipeta estériles con filtro.
- Tira de tubos transparentes para PCR en tiempo real.
- Tapas para tubos de PCR para PCR en tiempo real.
- Guantes.
- Tubos de 0,2 µL.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. PREPARATIVOS

Todo el procedimiento se realizará en un laboratorio con separación de áreas, tal y como se indica a continuación, en cabina de bioseguridad y con guantes hasta la colocación de los tubos en el equipo de PCR o termociclador

### 7.2. REALIZACIÓN

#### 7.2.1. Distribución de áreas de trabajo

- Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos.
- Área 2 de manipulación de muestras y extracción de ADN.
- Área 3 de amplificación y análisis post-PCR.

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo el estrictamente necesario. El flujo de trabajo debe ser: área 1→2→3 y nunca a la inversa.

#### 7.2.2. Oligonucleótidos. Reacción de PCR (Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos)

Las secuencias de los cebadores y la sonda utilizadas en el ensayo son las siguientes:

Gen <i>pla</i>	Nombre	Secuencia
Cebador F	YPplaS	5'-GTAATAGGTTATAACCAGCGCTT-3'
Cebador R	YPplaR	5'-AGACTTTGGCATTAGGTGTG-3'
Sonda	YPplaTM	5'-FAM-ATGCCATATATTGGACTTGCAGGCCAGT-BBQ-3'
Cebador F (CI)	FCI-RT1	5'-GTATTGCCCTACTGTTGGCG-3'
Cebador R (CI)	RCI-RT2	5'-ACCACCACGTATAGCCCAA-3'
Sonda (CI)	1CI-RT-CS	5'-Cy5-TAGTGGAGGAGGCTATGGAGCATTGATG-BHQ3-3'
Gen <i>caf1</i>	Nombre	Secuencia
Cebador F	YPcaf1BK2	5'-TACGGTTACGGTTACAGCAT-3'
Cebador R	YPcaf1S2	5'-GGTGATCCCATGTACTTAACA-3'
Sonda	YPcaf1TM	5'-FAM-ACCTGCTGCAAGTTTACCGCCTTTGG-BBQ-3'
Cebador F (CI)	FCI-RT1	5'-GTATTGCCCTACTGTTGGCG-3'
Cebador R (CI)	RCI-RT2	5'-ACCACCACGTATAGCCCAA-3'
Sonda (CI)	1CI-RT-CS	5'-Cy5-TAGTGGAGGAGGCTATGGAGCATTGATG-BHQ3-3'

Los cebadores y sondas se reciben en el laboratorio liofilizados y se almacenarán a 4°C, en la zona del laboratorio habilitada para la preparación de reactivos y *master-mix*, protegidos de la luz hasta que se reconstituyan.

Para reconstituir los cebadores y las sondas hay que emplear agua para PCR que se puede guardar alcuotada en la nevera. Las alcuotas de agua que se empleen serán de un solo uso.

Los cebadores se reconstituirán a una concentración de 100 pmol/μL (10X) y de ésta se prepararán varias alcuotas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

La sonda se reconstituirá a una concentración de 20 pmol/μL (1X) y se harán alícuotas en tubos de 0,5 ml opacos.

Los cebadores de CI se reconstituirán a una concentración de 100 pmol/μL y la sonda a 40 pmol/μL y se prepararán alícuotas en tubos de 0,5 ml opacos.

Para su uso en las reacciones de PCR se prepararán 2 premezclas (preMix) de cebadores y sondas de la siguiente forma:

Mix A1 para amplificación de la diana pla:

- 10 μL de YPplaS (100 pmol/μL)
- 10 μL de YPplaR (100 pmol/μL)
- 20 μL de YPplaTM (20 pmol/μL)
- 160 μL de agua

Mix A2 para la amplificación de la diana caf1:

- 10 μL de YPcaf1BK2 (100 pmol/μL)
- 10 μL de YPcaf1S2 (100 pmol/μL)
- 20 μL de YPcaf1TM (20 pmol/μL)
- 160 μL de agua

Mezcla B de oligos y sonda de Control Interno (CI):

- 5 μL de FCI-RT1 (100 pmol/μL)
- 5 μL de RCI-RT2 (100 pmol/μL)
- 5 μL de 1CI-RT-CS (40 pmol/μL)
- 20 μL de plásmido CI (104 copias/μL)
- 65 μL de agua

Estas pre-mezclas también se repartirán en tubos opacos de 0,5 ml y se guardarán a -20°C.

Todas las alícuotas se rotularán con el número de lote y fecha.

Toda la información referente a las sondas, cebadores y sus alícuotas, así como los tubos que contienen las premezclas se reflejará en el formulario adecuado. Estas hojas se guardarán en el laboratorio de *master-mix*.

#### PCR *pla*<sup>1</sup>

Componentes	Volumen para 1 reacción
Master-Mix Sso-fast (BioRad)	10 μL
Mix A1: mezcla de cebadores y sonda (S+P Pla) <sup>1</sup>	2 μL
Mix B <sup>2</sup> de cebadores, sonda de CI y plásmido de CI	2 μL
Agua PCR	1 μL
<b>Total</b>	<b>15 μL</b>

#### PCR *caf1*<sup>\*</sup>

Componentes	Volumen para 1 reacción
Master-Mix Sso-fast (BioRad)	10 μL
Mix A2: mezcla de cebadores y sonda (S+P Caf) <sup>1</sup>	2 μL
Mix B <sup>2</sup> de cebadores, sonda de CI y plásmido de CI	2 μL
Agua PCR	1 μL
<b>Total</b>	<b>15 μL</b>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N°1	Página 6 de 9

<sup>1</sup>Usando estas mezclas se consiguen concentraciones finales en la reacción de 0,5 µM de YPplaS y YPplaR o YPcaf1BK2 y YPcaf1S2, y 0,2 µM de la sonda YPplaTM o YPcaf1TM. Estas mezclas se almacenarán a -20°C.

<sup>2</sup>Usando esta mezcla se consigue una concentración final en la reacción de FCI-RT1 y RCI-RT2 de 0,5 µM y 0,2 µM de sonda 1CI-RT-CS.

Previo a la preparación de la mezcla se atemperarán las alícuotas de uso de los cebadores y del *Master Mix Sso-fast*. Este último una vez descongelado puede mantenerse a 4°C hasta 6 meses por lo que la primera vez que se descongele se conservará a 4°C y se apuntará la fecha en el tubo para no sobrepasar ese periodo de tiempo.

Los datos de las alícuotas empleadas en la preparación de la mezcla se anotarán en un formulario de PCR diseñado por el laboratorio y que contenga los datos más importantes del proceso. Este formulario se almacenará como registro interno del laboratorio incluyendo entre los datos recogidos la fecha, los operadores (que deben firmarlo), número de lote de los reactivos y su fecha de caducidad, etc. Este documento, que forma parte de las Hojas de Registro de Datos del laboratorio, deberá contener la información mínima requerida para poder utilizarse como parte del sistema de custodia de las muestras.

De esta mezcla se repartirán 15 µL en cada tubo de la tira o placa. En cada reacción se deja un margen de hasta 5 µL de ADN de la muestra para añadir a cada tubo.

Los tubos con las alícuotas se trasladarán a la zona del laboratorio habilitado para la extracción, donde se les añadirán las cantidades correspondientes de ADN.

Las gradillas que se utilizan en cada laboratorio no se deben pasar de uno a otro.

#### 7.2.4. Muestras y controles (Área 2 de manipulación de muestras y extracción de ADN)

Las muestras a analizar serán sangre (en EDTA o citrato), biopsia de ganglio y muestras respiratorias: aspirado o lavado bronquial y esputo.

#### 7.2.5. Reacción de PCR

Se incluirán en cada ensayo:

- Los ADNs de las muestras problema, puro y dilución 1/10, ambos por duplicado.

- 5 µL de agua como control negativo de PCR.

- El ADN de control positivo que contendrá 10000 y 1000 EG (Equivalentes de Genoma) por reacción. Estos se obtendrán añadiendo respectivamente 5 µL de las alícuotas de 104 EG/5 µL y 103 EG/5 µL de una cepa de *y. pestis* a cada tubo de reacción.

- Un control negativo de extracción: 5 µL de la elución de la columna que corresponde al procesamiento de los mismos reactivos utilizados en la extracción de las muestras en estudio pero que no llevan ninguna muestra, sirve para validar que todos los componentes del kit están libres de contaminantes de la PCR (este paso es muy conveniente, aunque no se realiza de forma generalizada).

#### 7.2.6. Desarrollo de la PCR

En cada tubo de la tira se añade la cantidad correspondiente de muestra o controles.

Una vez utilizados los ADN de las muestras se conservarán congelados a -20°C con el número de muestra correspondiente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

Una vez preparadas las reacciones se llevarán a la zona del laboratorio habilitada para la amplificación, donde se aplicará un *spin* en la microcentrifuga antes de colocarlas en el termociclador en tiempo real (Área 3 de amplificación y análisis post-PCR)

Para su uso se seguirá una instrucción técnica de procedimiento de uso específica para el manejo del termociclador en tiempo real (puede ser CFX96 de BioRad u otro similar).

La detección de los amplicones específicos de *Y. pestis* se realizará utilizando el canal FAM. La detección del CI se llevará a cabo en el canal Cy5.

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

CFX 96		
<b>Nombre del programa</b>	Ypestis	
<b>Desnaturalización</b>	95°C 2 min	1 ciclo
<b>Amplificación</b>	95°C 5 seg	50 ciclos
	60°C 10 seg	
	Lectura del tubo	

El experimento se guardará en el ordenador con datos (nombre y fecha) inequívocos para diferenciar cada uno de los ensayos.

Para la visualización de los resultados previamente se ajustará el umbral de detección a 100 RFUs (*Relative Fluorescence Units*). Los resultados del ensayo se considerarán como:

**POSITIVO:** si la fluorescencia de la sonda FAM observada durante la amplificación es superior a 100 RFUs y sigue una curva sigmoidea.

**NEGATIVO:** si la fluorescencia observada de FAM está por debajo de 100 RFUs o no sigue una curva sigmoidea.

**INHIBIDO:** si la fluorescencia observada de Cy5 está por debajo de 100 RFUs o no sigue una curva sigmoidea. Se ha observado experimentalmente que concentraciones elevadas de ADN de las dianas de *Y. pestis* ( $\geq 10^6$  EG/5) pueden salir inhibidas en el canal Cy5 y positivas en FAM. Este resultado sería considerado como POSITIVO y se procederá como tal.

A continuación, se registrarán los valores de ciclo umbral (CT, "*cycle threshold*") para cada resultado positivo y N/A (no aplicable) en el caso de las reacciones negativas. El resultado obtenido en cada reacción se transcribirá a un formulario de PCR para la detección de *Y. pestis* correspondiente a cada experimento.

## 7.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ENSAYO

### 7.3.1. Controles de calidad internos

En cada ensayo se incluirán dos controles positivos que contendrán 10.000 y 1.000 EG de *Y. pestis* por reacción y un control negativo de PCR (agua).

Al menos una vez al año se realizará una PCR utilizando los controles positivos y el control negativo para comprobar el correcto funcionamiento de la técnica.

Cada 5 años se recomienda llevar a cabo una extracción de ADN de una cepa de control de referencia validada de *Y. pestis* y realizar 5 verificaciones independientes analizando diluciones seriadas que contengan desde  $10^6$  EG hasta 10 EG por reacción siguiendo las indicaciones de la instrucción técnica para

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

la verificación y validación de controles positivos puestas a punto por cada laboratorio. Con los resultados obtenidos se determinará la media de los ciclos umbral (CT), las desviaciones estándar y los intervalos de confianza, así como el límite de detección.

### 7.3.2. Intercomparaciones

Se recomienda realizar intercomparaciones nacionales o internacionales que contemplen ejercicios de controles de calidad para la detección molecular de este patógeno.

## 8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Las acciones a llevar a cabo dependerán de los resultados obtenidos en las muestras y los controles que se han introducido en cada ensayo:

1. Los valores de CT de los controles positivos deben de ajustarse a lo especificado en un documento de Validación de controles positivos de PCR.
2. El control negativo de la amplificación debe resultar negativo.
3. El control negativo de extracción debe resultar negativo.
4. Todas muestras deben ser positivas en el canal de Cy5 lo que determina la ausencia de inhibidores de la polimerasa en el extracto de ácido nucleico analizado, con la excepción de muestras positivas con elevada carga bacteriana que pueden resultar inhibidas.

### 8.1. ACCIONES A EMPRENDER EN CASO DE CUMPLIMIENTO

Los resultados se validarán y se emitirá el correspondiente informe.

### 8.2. ACCIONES A EMPRENDER EN CASO DE INCUMPLIMIENTO

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados que se pueden obtener, las posibles causas y las acciones a realizar.

Resultado				Posible causa	Acción a realizar
Controles		Muestra (x2)			
Negativos	Positivos/CI	<i>Pla</i>	<i>Caf1</i>		
-	+/+	+/+	+/+	Resultado normal en muestras positivas	Informar como Positivo
-	+/+	+/+	-/-	Posible baja carga bacteriana	Repetir la PCR si se obtiene igual resultado solicitar otra muestra e informar
-	+/+	+/-	+/-	Posible baja carga bacteriana	Repetir la PCR si se obtiene igual resultado solicitar otra muestra e informar
-	+/+	-	-	Resultado normal en muestras negativas	Informar como Negativo
-	Todos por debajo del rango ó -/-	-	-	Pérdida de sensibilidad de la técnica	Repetir la PCR con nuevos reactivos y controles positivos
-	+/-	-	-	Presencia de inhibidores	Repetir PCR con ADN puro y dilución 1/10 y dilución 1/50, si se obtiene igual resultado repetir la extracción y la PCR. En caso de mismo resultado solicitar otra muestra
+	+/+	+	+	Posible contaminación	Repetir PCR, si se obtiene igual resultado repetir la extracción y la PCR

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Yersinia pestis</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-BT-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico y experiencia en un laboratorio con los requisitos de bioseguridad y de separación de áreas establecidos. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, el transporte y la conservación, se llevan a cabo por los servicios de Microbiología del hospital donde se encuentra ingresado el paciente, todo el proceso debe estar asesorado por los responsables del laboratorio de Microbiología.

## 10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida. Ocasionalmente, se pueden producir inhibiciones de la PCR que no permitirán obtener un resultado y que se detectarán por falta de amplificación de la diana de control interno. Si no se consigue amplificación del control interno el resultado deberá informarse como: "muestra inhibida". Otras limitaciones del procedimiento podrían deberse a la degradación de la muestra o a la baja carga bacteriana presente en la misma (muestras límite).

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Riehm JM, Rahalison L, Scholz HC, Thoma B, Pfeffer M, Razanakoto LM, Al Dahouk S, Neubauer H, Tomaso H. Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. *Mol Cell Probes*. 2011; 25:8-12.