



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

Recomendaciones para la obtención y análisis de muestras clínicas en pacientes sospechosos de enfermedad por virus de Ébola (EVE)

Autor: Plan de Laboratorios Clínicos del SSPA

Versión: 1.0

Fecha: 05/09/2014



Índice

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. PROPÓSITO.....	3
1.2. ÁMBITO	3
2. RESUMEN OPERATIVO	3
3. INSTRUCCIONES GENERALES	4
3.1. CONSIDERACIONES PRELIMINARES	4
3.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	5
3.3. ESPECÍMENES	5
3.4. ÁREA DE RECEPCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ESPECÍMENES.....	6
3.5. ÁREAS DE ANÁLISIS	6
4. GUÍA PARA LA OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE ESPECÍMENES.....	6
4.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS:	6
4.2. TRANSPORTE DE MUESTRAS:	7
5. MANIPULACIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO:	7
5.1. BIOQUÍMICA E INMUNOLOGÍA:	8
5.2. HEMATOLOGÍA:	8
5.3. MICROBIOLOGÍA:	8
6. REFERENCIAS:.....	8



1. Introducción

1.1. Propósito

El objetivo de este documento es establecer unas recomendaciones claras acerca de la obtención y la manipulación de muestras de pacientes con sospecha de EVE para la realización de estudios de laboratorio (Bioquímica, Hematología, Inmunología y Microbiología). Estas recomendaciones deben ser adaptadas por los diferentes laboratorios con arreglo a sus condiciones y procedimientos específicos. La propuesta está orientada a minimizar el riesgo potencial de manejo de especímenes de muestras de laboratorio en el tratamiento de pacientes en investigación o confirmados de infección por Virus Ébola.

1.2. Ámbito

El ámbito de aplicación de este documento son los laboratorios clínicos del SSPA de aquellos hospitales designados por la autoridad sanitaria como hospitales de referencia para el manejo de casos sospechosos del EVE. En el resto de hospitales de la red, se evitará la toma de muestras clínicas o la realización de determinaciones analíticas en el caso de pacientes con sospecha de EVE.

2. Resumen operativo

- El manejo de los casos sospechosos de EVE requiere la realización de diferentes pruebas de laboratorio para establecer el diagnóstico diferencial y, dependiendo de la gravedad del caso, para el manejo clínico asistencial del paciente. Por tanto, es preciso definir una serie de instrucciones concretas en relación a la obtención, transporte, manipulación y procesamiento de los especímenes procedentes de estos pacientes.
- Si bien de forma general y hasta que se confirme si se trata o no de un caso EVE, se limitarán al máximo posible la realización de determinaciones analíticas, debe tenerse en cuenta que la probabilidad de infección de los profesionales sanitarios que manejan muestras clínicas para la realización de pruebas de laboratorio en casos sospechosos de EVE es baja.
- Todos los laboratorios de los centros de referencia provincial del SSPA disponen de las medidas de seguridad necesarias para manejar estas muestras. En concreto los laboratorios destinados al manejo y cultivo de micobacterias disponen de nivel de bioseguridad tipo 3, superior al requerido para el manejo de las muestras de pacientes EVE. .
- El punto de mayor riesgo corresponde al momento de la manipulación de especímenes que impliquen la exposición a los fluidos (apertura de tubos, extensiones de sangre, etc.). Cada centro deberá designar un área específica para la recepción y manipulación de estas muestras y, siempre que sea posible, se utilizarán las instalaciones descritas en el apartado anterior con este cometido. En cualquier caso, la manipulación se realizará siempre en campana de seguridad tipo II o III y utilizando equipos de protección personal (EPP) completos.
- De forma general los tubos tapados (hemograma y coagulación) plantean un riesgo mínimo, pudiéndose procesar utilizando nivel de seguridad 2 con EPP.
- Los tubos destapados, extensiones u otros que impliquen riesgo de exposición sólo podrán ser manipulados fuera de la campana en caso de que hayan sido sometidos a tratamiento de inactivación del virus por calor.
- Para el procesamiento de las muestras, cada centro hospitalario, dependiendo de sus características, podrá habilitar diferentes soluciones entre las que se consideran:



- Sistemas POCT ubicados en la cabecera del enfermo.
- Sistemas POCT ubicados en el laboratorio de bioseguridad o similar (por ej. Laboratorio de micobacterias) con campana de seguridad tipo II.
- Sistemas analíticos habituales de acuerdo a las instrucciones establecidas en este documento.

3. Instrucciones generales

3.1. Consideraciones preliminares

- De acuerdo con el Real Decreto 664/97 Protección de los Trabajadores contra Riesgos Biológicos el Virus de Ébola es un virus tipo 4 y para el manejo en los laboratorios clínicos el RD establece: *“los laboratorios que manipulen materiales con respecto a los cuales exista incertidumbre acerca de la presencia de agentes biológicos que puedan causar una enfermedad en el hombre, pero que no tengan como objetivo trabajar con ellos como tales, cultivándolos o concentrándolos, deberían adoptar, al menos, el nivel 2 de contención. Deberán utilizarse los niveles 3 y 4 cuando proceda, siempre que se sepa o sospeche que son necesarios, salvo cuando las líneas directrices establecidas por las autoridades sanitarias indiquen que, en algunos casos, conviene un nivel de contención menor”.*
- De acuerdo con las recomendaciones de la Consejería de Igualdad, Salud y Bienestar Social, el riesgo de manipular muestras clínicas de pacientes sospechosos de EVE para realización de pruebas de laboratorio es muy bajo.
- De acuerdo con las directrices del RD 664/97 y las recomendaciones del CDC (*Interim Guidance for Specimen Collection, Transport, Testing, and Submission for Persons Under Investigation for Ebola Virus Disease in the United States. 2014 Centers for Disease Control and Prevention*) el manejo de muestras para realización de pruebas de laboratorio requiere nivel de contención 2 y necesariamente implicará el uso de cabinas de seguridad tipo II, equipo completo de protección personal para los profesionales implicados en la manipulación así como unas características específicas en relación a la circulación de personas y las instalaciones que se detallan en el RD 664/97.
- La manipulación de tubos cerrados en ese entorno de seguridad no implica riesgo para los profesionales sanitarios.
- La manipulación de especímenes y muestras que impliquen la exposición al fluido (destapado de tubos, extensiones de sangre periférica etc.) constituye el momento de mayor exposición y riesgo, por lo que cualquier manipulación que implique esta exposición deberá realizarse necesariamente en las cabinas de seguridad tipo II y aplicando las medidas de protección citadas anteriormente.
- Sólo se manipularán fuera de la cabina los especímenes o muestras en tubos cerrados o que hayan sido sometidos a tratamiento de inactivación del virus.
- Todos los laboratorios de los hospitales de referencia disponen del nivel de bioseguridad necesario para manipular muestras biológicas de pacientes sospechoso de EVE. Estos laboratorios disponen además, de instalaciones de bioseguridad nivel 3 que habitualmente se utilizan para la manipulación y cultivo de micobacterias.
- En la medida de lo posible se utilizarán estas instalaciones para la manipulación de los especímenes y muestras de los pacientes sospechosos de EVE.
- Cada hospital designará una comisión de especialistas de laboratorio que, coordinados por uno de ellos y en colaboración con los responsables de medicina preventiva y los responsables clínicos del área de infecciosos, adaptarán este protocolo a las características de los centros.



3.2. Determinaciones analíticas

- Sólo se realizarán aquellas determinaciones analíticas que sean imprescindibles para el diagnóstico diferencial y el manejo clínico del paciente.
- De forma general, se tomarán muestras para el diagnóstico de EVE y su diagnóstico diferencial (paludismo, fiebres tifoideas, etc.), que serán remitidos al Instituto Carlos III.
 - El virus de Ébola sólo se detecta en sangre después de 3 días del inicio de los síntomas; si la muestra se toma dentro de los tres primeros días, en caso de resultados negativo, es posible que sea necesaria una segunda muestra.
- En caso de que la situación clínica del paciente lo requiera, se podrán solicitar con carácter excepcional las siguientes determinaciones analíticas:
 - Bioquímica básica que se realizará en muestras inactivadas.
 - Hemograma y estudio de coagulación en tubo cerrado (TP, TPTA y Fibrinógeno).
 - Microbiología: estudios serológicos, gota gruesa y hemocultivo.
 - Banco de sangre: por el alto riesgo que supone la realización de pruebas cruzadas no se deben realizar en estos casos.

3.3. Especímenes

- Todo personal que esté en contacto directo con las muestras o especímenes debe utilizar equipos completos de protección personal.
- La toma de especímenes debe realizarse por el personal encargado de la asistencia al paciente y de acuerdo a las medidas de protección establecidas en el protocolo de I Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales (CISPS)
- El transporte debe realizarse utilizando contenedor de seguridad para muestras biológicas. Una vez en el contenedor de seguridad los especímenes requieren de las medidas de protección habituales.
- No deben utilizarse sistemas automáticos de transporte (tubo neumático).
- Los especímenes no deben remitirse al área habitual de recepción de muestras del laboratorio sino a aquella que se haya establecido y que necesariamente tiene que estar dotada de campana de seguridad mínimo tipo II. En la medida de lo posible se utilizarán las instalaciones de bioseguridad ubicadas en las áreas de procesamiento y cultivo de micobacterias (nivel bioseguridad 3).
- De forma general las muestras que no requieran destaponado (EDTA y Citrato) pueden procesarse de acuerdo a un nivel de seguridad tipo 2.
- Las muestras de suero deben ser inactivadas antes de su procesamiento. Las muestras inactivadas pueden manipularse utilizando nivel de seguridad tipo 2. La inactivación del suero se realizará por calentamiento a 60°C durante una hora. La inactivación por calor no afecta significativamente a las determinaciones analíticas de sodio, potasio, magnesio, urea, creatinina, úrico, bilirrubina, glucosa y Proteína C reactiva. Otras determinaciones como fosfatasa alcalina, GPT, GGT o CK son inactivadas por calor. A esta temperatura la IgG puede agregarse por lo que para la realización de test serológicos se recomienda la inactivación a 57°C durante una hora.
- Una vez terminado el análisis, las muestras no inactivadas se mantendrán en la campana ubicada en el área de recepción de muestras hasta su eliminación definitiva.



3.4. Área de recepción y manipulación de especímenes

- Se designará un área específica del laboratorio para la recepción y manipulación de estos especímenes.
- Necesariamente deberá disponer como mínimo de una campana de seguridad tipo II.
- Para evitar duplicidades y para el mejor aprovechamiento de los recursos es altamente aconsejable aprovechar las instalaciones de los laboratorios dedicadas al estudio de micobacterias.

3.5. Áreas de análisis

- Cada área de laboratorio (microbiología, bioquímica, hematología o inmunología) designará a un FEA responsable en relación al procesamiento de estas muestras.
- Si las muestras son procesadas en los laboratorios generales, se tratará que ello se haga a horas concretas de baja carga de trabajo.
- Se tratará de reducir al máximo el número de personas implicadas en la manipulación de estas muestras. El personal que no sea imprescindible durante el procesamiento de las muestras deberá abandonar el área de procesamiento hasta su total desinfección de la misma.
- La puerta del laboratorio deberá permanecer cerrada durante el procesado de estas muestras con un cartel que indique "Prohibida la entrada; muestras de EVE en proceso".
- El personal implicado en la realización de determinaciones analíticas utilizará equipos completos de protección personal (EPP) de acuerdo a lo establecido en el protocolo de la CISPS.
- Una vez finalizado el procesamiento de las muestras, se procederá a la desinfección de todo el material y el equipamiento en contacto con las mismas.

4. Guía para la obtención y transporte de especímenes

4.1. Obtención de muestras:

- El personal que realice las extracciones de muestras será el personal encargado de la asistencia al paciente por lo que durante la extracción se deberán seguir las medidas de protección establecidas para los profesionales en contacto directo con el paciente.
- Antes de proceder a la extracción de muestras se cumplimentarán todas las solicitudes y documentos necesarios para su procesamiento o envío al Instituto Carlos III.
- Antes de proceder a la extracción hay que informar al laboratorio y al personal responsable del transporte para confirmar que estén preparados para recibir las muestras.
- Material necesario:
 - Tubo de EDTA de 10 mL (sin gel) para las muestras del Instituto Carlos III, identificado con nombre y apellidos.
 - Tubos de vacío necesarios para el resto de determinaciones de acuerdo con el protocolo específico de cada centro. No utilizar material de vidrio.
 - Agujas de seguridad.
 - Palometas.
 - Compresor.
 - Solución antiséptica (alcohol isopropílico 70%).
 - Gasas.
 - Esparadrapo.
 - Bandeja y/o gradillas desechables.



Contenido

- Papel o toallas absorbentes.
- Contenedor de objetos punzantes.
- Bolsa de plástico para otros residuos.
- Guantes de repuesto
- Después de la extracción es muy importante la desinfección externa del tubo, eliminado cualquier resto de sangre o fluidos.
- Es recomendable que una segunda persona con bata, guantes y mascarilla permanezca en la zona próxima a la habitación para facilitar el material que pudiera requerirse (tubos, guantes,...) y recoja las muestras en los envases secundarios. Para ello la persona que ha efectuado la extracción depositará las muestras envueltas en toallas absorbentes, cuidando de no tocar el envase secundario con los guantes contaminados. La segunda persona cerrará herméticamente el envase secundario y lo introducirá en el envase terciario.
- Se utilizará un envase por cada tubo de muestra.
- Los especímenes se enviarán, una vez introducido en el envase terciario, junto con toda la documentación que debe acompañarlos.
- Si no se van a remitir de forma inmediata, es conveniente conservarlos a 4°C hasta el momento de su envío.

4.2. Transporte de muestras:

- **Instituto Carlos III:**
 - El transporte se realizará mediante un transportista homologado advirtiéndole que corresponde al transporte de una sospecha de infección por Virus de Ebola.
- **Laboratorios del hospital:**
 - Antes de remitir ningún espécimen al laboratorio, se contactará con el personal del mismo para garantizar que están preparados para la recepción y el procesado de las muestras.
 - Los especímenes se remitirán al centro de recepción de muestras establecido en el hospital utilizando el contenedor de seguridad.
 - Los especímenes en envase de seguridad pueden ser transportados utilizando medidas estándares de seguridad bata y guantes.
 - No se utilizará el tubo neumático para el envío de estos especímenes.
 - Los documentos en el que se soliciten las pruebas se transportarán en una bolsa fuera del contenedor de muestras. Las solicitudes deberán informar claramente de que se trata de muestras de pacientes sospechosos de EVE:

5. Manipulación y procesamiento de muestras en el laboratorio:

- Todo profesional implicado en la manipulación o el procesado de especímenes de muestras de pacientes sospechosos de EVE debe disponer de EPP completo.
- La manipulación de especímenes y muestras debe realizarse en cabina de seguridad de nivel II.
- Se deben extremar las precauciones durante la manipulación de las muestras para evitar la formación de aerosoles o el salpicado de muestras.
- Se desecharán aquellos especímenes que tengan manchas o restos de fluido en su superficie.
- Una vez finalizado el procesamiento de muestras se procederá a la desinfección de las superficies y a la descontaminación de los analizadores de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes.
- Los tubos se desecharán en los contenedores habilitados a tal efecto.



5.1. Bioquímica e inmunología:

- Si los analizadores de bioquímica no pueden trabajar con tubo cerrado se procederá a la inactivación del suero antes de su procesamiento de acuerdo al procedimiento establecido.
- Si es necesario realizar pruebas que sean incompatibles con la inactivación por calor no deben utilizarse analizadores automáticos. En este caso se utilizarán técnicas manuales en campana de seguridad. Esta práctica deberá mantenerse hasta tener la confirmación de si el paciente es Ébola negativo.
- Los estudios de ácidos nucleicos se podrían realizar en muestras inactivadas.
- Los estudios de inmunofluorescencia se podrían realizar en muestras fijadas con acetona 85%-100%.
- Las muestras de suero inactivado se pueden manipular como cualquier otra muestra.

5.2. Hematología:

- Las muestras para hemograma se procesarán en analizadores que no requieran destaponado de los tubos.
- Muestras con insuficiente cantidad de muestra serán rechazadas y no se analizarán.
- En caso de que sea necesaria la realización de extensiones, se realizarán en la campana de seguridad del área de recepción y manipulación de especímenes. Las extensiones serán fijadas con metanol al 5% y 15 minutos en buffer con formalina al 10% para garantizar la inactivación del virus. Una vez fijadas se remitirán de nuevo al área de procesamiento.
- Los estudios de coagulación se procesarán en analizadores que soporten el uso de tubos cerrados.
- Por el riesgo que suponen, no se realizarán pruebas cruzadas. En caso que el paciente requiera transfusión se utilizara sangre de donante 0 negativo, plaquetas del grupo 0 o plasma A/B. Si es necesario se puede utilizar suero inactivado por calor para determinaciones de inmuno hematología.

5.3. Microbiología:

- **Bacteriología:**
 - Los hemocultivos deben procesarse en sistemas automáticos totalmente cerrados. Los subcultivos deberán ser realizados en cabina de seguridad tipo II. Los cultivos secundarios pueden ser manipulados siguiendo las condiciones habituales de seguridad.
 - Los cultivos de muestras de pacientes sospechosos de EVE se realizarán siempre en campana de seguridad. Los cultivos primarios deberán incubarse en estufas separadas del resto de muestras.
- **Serología infecciosa:**
 - Se deben utilizar sueros inactivados de acuerdo al método antes descrito.
 - Si es necesario realizar pruebas que no sean compatibles con la inactivación por calor, no deben utilizarse analizadores automáticos. En este caso se utilizarán procedimientos manuales en campana de seguridad tipo II. Esta circunstancia se debe evitar hasta tener la confirmación de si el paciente es Ébola positivo o no.

6. Referencias:

- Interim Guidance for Specimen Collection, Transport, Testing, and Submission for Persons Under Investigation for Ebola Virus Disease in the United States. 2014 Centers for Disease Control and Prevention.



- Ebola Virus Disease (EVD) Interim Sample Collection and Submission Guide August 22, 2014 Public Health Ontario's.
- Amorosa V, et al.,. Imported Lassa fever, Pennsylvania, USA, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2010 Oct;16(10):1598-600.
- Imported case of Marburg hemorrhagic fever - Colorado, 2008. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009 Dec 18;58(49):1377-81.
- Timen A, et. al., Response to imported case of Marburg hemorrhagic fever, in the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2009 Aug;15(8):1171-5.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Imported Lassa fever—New Jersey, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004 Oct 1;53(38):894-7.
- EPA Where You Live – State Medical Waste Programs and Regulations (see: <http://www.epa.gov/epawaste/nonhaz/industrial/medical/programs.htm>).
- Bhagat CI, Lewer M, Prins A, Beilby JP. Effects of heating plasma at 56oC for 30 min and 60oC for 60 min on routine biochemistry analytes. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 802-804.
- Centers for Disease Control, National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. in Fleming DO, Richardson JH, Tulis JJ, Vesley D (eds) *Laboratory Safety* (2nd ed) ASM Press, Washington, D.C. 1995; 293-354.
- Management and control of viral haemorrhagic fevers. Advisory Committee on Dangerous Pathogens, Department of Health, UK, 1997.
- Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Update - management of patients with suspected viral hemorrhagic fever – United States. *Morb Mort Weekly Report* 1995; 44: 475-479.
- Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Management of patients with suspected viral hemorrhagic fever. *Morb Mort Weely Report* 1988; 37 (S-3); 1-16.
- Peters CJ, Johnson KM. Lymphocytic choriomeningitis, Lassa virus, and other arenaviruses.
- In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases* (4th ed) Churchill Livingstone, Melbourne, 1996, 1572-1579.
- Saluzzo JF, Leguenno B, Van der Groen G. Use of heat inactivated viral haemorrhagic fever antigens in serological assays. *J Virol Methods* 1998; 22: 165-172.
- WHO Weekly Epidemiological Record. Viral haemorrhagic fever: management of suspected cases. *Weekly Epidemiological Record* 1995; 70; 249-252.
- World Health Organization. WHO recommended guidelines for epidemic preparedness and response: Ebola haemorrhagic fever (EHF). World Health Organization, 1997.