

## PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA INACTIVACIÓN DE MUESTRAS POTENCIALMENTE INFECCIOSAS CON EL VIRUS EBOLA Y OTROS AGENTES VIRALES ALTAMENTE PATÓGENOS<sup>1</sup>

### Propósito de la inactivación

Una vez tomadas y manipuladas de forma segura (ver documento: *Recomendaciones para la toma segura y manipulación apropiada de muestras potencialmente infecciosas con agentes altamente patógenos*. OPS/OMS, 2014), las muestras clínicas sospechosas de infección con agentes virales altamente patógenos, podrán ser utilizadas para realizar:

- Diagnóstico etiológico específico (diagnóstico virológico)
- Evaluación y seguimiento al paciente

Sin embargo, virus como Ébola, Marburg y Lassa entre otros, se clasifican como patógenos de riesgo grupo 4 **por lo que el aislamiento viral en células (ó cualquier ensayo con el virus viable) sólo debe realizarse en un nivel de bioseguridad equivalente (BSL-4).**

Por esta razón y para poder realizar ensayos preliminares (detección genómica por PCR), ó determinaciones bioquímicas y hematológicas (para seguimiento y manejo del paciente), se deberá proceder con un **proceso de inactivación de la muestra** en un laboratorio BSL-3 que permita posteriormente su manipulación segura inclusive en un ambiente BSL-2.

La inactivación se **debe** llevar a cabo en un ambiente de contención **BSL-3** del Laboratorio Nacional de Referencia, garantizando el uso adecuado de las medidas de protección personal y ambiental (gestión de riesgo biológico y buenas prácticas en el laboratorio) y según las indicaciones técnicas dadas a continuación.

Las recomendaciones abajo planteadas son generales y han sido consignadas en diversas publicaciones internacionales. Sin embargo, éstas pueden estar sujetas a modificaciones posteriores en función de los avances en el conocimiento sobre la enfermedad y el agente etiológico.

*Cada entidad de salud **debe** contar con sus propios manuales de bioseguridad, alineados con políticas de calidad y buenas prácticas de laboratorio. Además, se debe realizar una **evaluación del riesgo** antes de decidir e iniciar cualquier proceso.*

***Siempre se debe limitar el contacto con las muestras y evitar manipulación innecesaria.***

<sup>1</sup> Estas recomendaciones pueden estar sujetas a modificaciones posteriores en función de los avances en el conocimiento sobre la enfermedad y el agente etiológico.

## Consideraciones sobre la muestra

- Las muestras deben ser utilizadas sólo para analizar lo mínimo necesario para el diagnóstico etiológico y manejo del paciente.
- La muestra recomendada para el diagnóstico virológico es la de sangre total (5 mL, preferiblemente en tubo con EDTA); sin embargo suero ó plasma también pueden ser utilizados para el diagnóstico<sup>2</sup>.
- Para el seguimiento y monitoreo bioquímico y hematológico del paciente, se deberá tomar una segunda muestra de sangre total, suero o plasma, según el ensayo a realizar y el analito a determinar (tubo con EDTA, citrato de sodio, fluoruro de sodio, heparina o tubo seco).
- El hisopado bucal está indicado sólo para casos *post-mortem* ó en situaciones donde la muestra de sangre sea imposible de obtener. Debe ser colectado en medio de transporte viral universal, únicamente por personal entrenado. La sensibilidad de la detección por laboratorio en este tipo de muestra es baja.
- Una vez recogida la muestra, debe transportarse al laboratorio con las precauciones apropiadas: contenedor secundario dentro del hospital ó entidad de salud y triple empaque para transporte terrestre hacia laboratorios fuera del establecimiento (Ver documento *Recomendaciones para el embalaje y envío apropiado por vía terrestre, de muestras potencialmente infecciosas con agentes altamente patógenos*. OPS/OMS 2014).
- El personal de laboratorio debe ser notificado previamente sobre el envío de la muestra.
- La muestra **no debe quedar desatendida** en ningún momento.

## Consideraciones sobre el laboratorio

- Mantener al mínimo el número de personas involucradas con el manejo de la muestra. Todo el personal no esencial debe desocupar el área dónde se trabajará la muestra.
- La inactivación y manipulación de la muestra debe ser realizada en un ambiente de contención BLS-3 para lo cual el laboratorio deberá contar con al menos una cabina de bioseguridad clase II ó, preferiblemente de clase III, verificada ó certificada anualmente (ver *Manual de Mantenimiento para Equipo de Laboratorio*, OPS/OMS, 2005). Además, las instalaciones deberán disponer de un vertedero con suministro de agua, un refrigerador y un baño maría o bloque de calentamiento (para la inactivación de la muestra por calor; ver adelante).
- Las muestras **sólo deben abrirse dentro de cabinas de bioseguridad** (clase II ó III) del laboratorio de contención BSL-3. Si se requiere un proceso de centrifugación, debe hacerse en un equipo con contenedores (*buckets*) cerrados<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup> La muestra para diagnóstico virológico (**detección viral en laboratorio del Centro Colaborador de la OMS**) debe enviarse **sin** inactivar. Sin embargo en casos especiales se podrá considerar el envío de muestras inactivadas (categoría B ó exentas), **previa** consulta con la oficina regional de OPS y el centro colaborador.

<sup>3</sup> Los procedimientos que tienen probabilidad de producir aerosoles ó salpicaduras (por ejemplo centrifugación) deben evitarse y sólo llevarse a cabo **si son estrictamente necesarios**. Nunca deben realizarse fuera de una cabina de bioseguridad.

- El personal de laboratorio que trata las muestras deberá usar los elementos de protección personal (EPP) recomendados para la toma de muestra incluyendo gafas con protección lateral, gorro de laboratorio, mascarar N95 (para procesos que generen aerosoles), cubierta impermeable de zapatos y batas (mandiles) anti fluidos (desechables, en lo posible)<sup>4</sup>.
- La muestra debe ser inactivada y manipulada **únicamente** por profesionales debidamente entrenados y capacitados para el manejo de especímenes potencialmente infecciosos con agentes patógenos de alto riesgo.
- Para los ensayos bioquímicos y hematológicos, se recomienda el uso de equipos con sistemas analíticos cerrados (que minimicen contacto con la muestra).
- Al dejar el laboratorio, asegúrese de retirar todos los EPP y colocarlos en bolsa de riesgo biológico para continuar los procesos de esterilización regulares.
- **NO REALIZAR AISLAMIENTO VIRAL EN CÉLULAS.**

## INACTIVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los siguientes métodos son apropiados para reducir la infectividad viral **bajo contención BSL-3** y permitir así el procesamiento de las muestras incluso en BSL-2, **únicamente para detección molecular y para ensayos limitados de monitoreo al paciente**, usando precauciones adecuadas y elementos de bioseguridad completos<sup>5</sup>.

Para el diagnóstico diferencial con otros microorganismos, se recomienda realizar únicamente técnicas moleculares (detección genómica por PCR) con la muestra inactivada, SOLO si éstas técnicas se encuentran **YA estandarizadas** en los Laboratorios Nacionales de Salud (centrales ó de referencia). De lo contrario, **no intente manipular la muestra**. En cualquier caso, la muestra deberá ser enviada (categoría A, triple empaque) a un centro colaborador de la OMS (por favor ver los lineamientos OPS/OMS).

### Inactivación para el diagnóstico etiológico por ensayos moleculares (PCR)

- Para el diagnóstico molecular de cualquier agente patógeno, los procesos de inactivación deben asegurar una pérdida total de la infectividad mientras conservan la integridad de los ácidos nucleicos.

---

<sup>4</sup> Si el personal de laboratorio se expone accidentalmente al material infeccioso (por ejemplo, a través de punción, cortes o abrasiones en las manos) de inmediato debe lavar la parte afectada con abundante jabón y agua y aplicar una solución desinfectante.

<sup>5</sup> La confirmación virológica (definitiva) de infección en los primeros casos, **debe** ser realizada en uno de los Centros Colaboradores de la OMS, por al menos dos plataformas diagnósticas diferentes y con muestras sin inactivar.

- En general, el uso de condiciones altamente denaturantes desestabiliza la envoltura viral, elimina nucleasas celulares y mantiene la estructura del RNA para análisis posteriores. Así, el uso de soluciones de lisis compuestas con sales de guanidina (tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina) han demostrado ser eficientes para la inactivación de virus RNA envueltos. Existen diferentes reactivos comerciales ampliamente utilizados en los laboratorios familiarizados con técnicas moleculares (por ejemplo *Tripure*®, *Trizol*®) que presentan un muy buen desempeño. Asimismo, la mayoría de estuches para extracción de RNA (viral ó total), proveen soluciones de lisis con las características denaturantes requeridas. En cualquier caso, se deberán seguir las instrucciones del fabricante y los protocolos estandarizados de cada laboratorio, así como las medidas de protección personal establecidas.
- La autopsia completa en casos fatales con sospecha de infección por virus Ébola, está **contraindicada** para evitar cualquier contacto con órganos. Sin embargo, una muestra de piel para la confirmación *post mortem* del caso puede ser tomada y fijada inmediatamente en formol amortiguado al 10% (ó glutaraldehído al 2,5%) por el tiempo suficiente que permita penetrar por completo la muestra. Esta muestra será útil para detección molecular con los protocolos adecuados para extracción a partir de productos embebidos en parafina.
- El medio de transporte viral dónde se ha conservado el hisopado bucal, puede ser inactivado y procesado para detección molecular con los métodos ya descritos. Por favor asegúrese de eliminar el hisopo en una bolsa para residuos infecciosos para su posterior eliminación (incineración).
- Finalmente, las muestras para amplificación por PCR pueden también inactivarse mediante tratamiento de calor a 60°C durante 60 min. Sin embargo y para incrementar la bioseguridad, se recomienda utilizar una solución denaturante combinada con la inactivación por calor.

### Inactivación para ensayos clínicos

- Se recomienda la inactivación por calor a 60°C durante 60 min para las muestras séricas u otros fluidos orgánicos; el calentamiento no afecta significativamente las estimaciones de electrolitos (sodio, potasio, magnesio) así como de urea, uratos, creatinina, bilirrubinas, glucosa y proteína C reactiva. Sin embargo, estudios han demostrado que enzimas como la fosfatasa alcalina y las transaminasas se inactivan ó en cualquier caso se altera su determinación. Esta temperatura puede alterar también los ensayos serológicos (determinación de anticuerpos).
- El tratamiento del suero ú otros fluidos orgánicos con 10 ml de Tritón X-100 al 10% por ml de líquido durante 1 hora, es recomendado para reducir títulos virales. Sin embargo, y ya que se trata de un detergente, se pueden alterar aquellas pruebas donde la preservación celular es necesaria.
- Las láminas para **gota gruesa** deben fijarse en formol amortiguado al 10% durante 15 min y posteriormente ser lavadas (al menos 3 veces) con agua destilada pH 7.0 antes de realizar la coloración.
- Los frotis sanguíneos deberán ser fijados por 5 min inicialmente en metanol y posteriormente 15 min en formol amortiguado al 10%, seguido de 3 lavados con agua destilada pH 7.0 antes de

realizar la coloración. Opcionalmente, se puede extender a 30 min la fijación con metanol, seguido de calor seco (95°C) durante 1 hora.

- Las muestras de suero para determinaciones basadas en la técnica de ELISA, pueden ser inactivadas con concentraciones finales de 0,2% de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) / 0,1% de Tween 20 y tratamiento por calor a 60°C 15 min.

**Si la muestra fue tomada y procesada bajo una orientación clínica diferente, y posteriormente se sospecha enfermedad por virus Ébola (EVE), la muestra debe ser enviada inmediatamente y bajo las condiciones de empaque apropiadas (IATA, categoría A) al centro colaborador de la OMS.**

**Todas las superficies (cabinas de bioseguridad, mesones de laboratorio, equipos, etc.) donde se haya trabajado la muestra deberán ser desinfectadas con hipoclorito al 0,5%.**

**Todo el personal de laboratorio que haya tenido contacto con la muestra deberá ser considerado como contacto.**

#### **Limpieza y descontaminación de ambiente, equipos de laboratorio y EPP**

- Se debe garantizar abundante suministro de desinfectantes, incluyendo hipoclorito de sodio al 0,5%, alcohol 70% (p/v) y/o glutaraldehído al 1%.
- Los derrames accidentales del material potencialmente contaminado deben ser cubiertos de inmediato y por al menos 30 min con una almohadilla (o toalla) absorbente saturada con hipoclorito de sodio al 0,5%, y luego limpiar con material absorbente impregnado en solución de hipoclorito de 0,5%. Los desechos deben colocarse en una bolsa del peligro biológico
- Los contenedores de la centrifuga (*buckets*) y los rotores deben esterilizarse en autoclave o por inmersión en glutaraldehído 1% (en un envase sellado) durante 10 minutos.
- Cualquier equipo automatizado debe descontaminarse con hipoclorito de 0,5% (repetidos ciclos de limpieza). Si los fabricantes recomiendan un procedimiento alternativo de descontaminación, entonces debe comprobarse que es adecuado para inactivar agentes como el Ébola; si se sabe que el proceso es suficiente para la inactivación de virus hepatitis C o virus hepatitis B, entonces será adecuado para los filovirus.
- El equipo de protección personal reusable deberá ser lavado inicialmente con solución de agua con detergente y posteriormente sumergido en solución de hipoclorito 0,5% (mínimo 30 mins aunque se recomienda dejarlo toda la noche) para descontaminación. El equipo desechable debe ser dispuesto en bolsas de residuos a prueba de filtración y dentro de contenedores cubiertos para posterior incineración (ver documento *Interim Infection Prevention and Control Guidance*, OMS 2014).

## Eliminación de residuos biológicos

**Los residuos deben ser separados en un lugar designado únicamente para tal fin, y que permita una manipulación adecuada y segura.**

- Los objetos afilados (por ejemplo, agujas, jeringas, artículos de vidrio) y los tubos que han estado en contacto con sangre o fluidos corporales debe ser descartados en contenedores resistentes a punción para su incineración.
- Recopilar los residuos sólidos infectantes, no corto-punzantes, en bolsas de residuos a prueba de filtración y dentro de contenedores cubiertos.
- Los desechos sólidos deberán ser esterilizados por calor húmedo (en autoclave de tamaño suficiente que permita la circulación adecuada del vapor y con indicadores físicos ó biológicos que aseguren eficacia del proceso) ó directamente incinerados (incinerador convencional de doble cámara).
- Desechos tales como heces, orina y vómito ó líquidos provenientes del lavado, pueden ser descartados directamente en el drenaje, sanitario ó letrina<sup>6</sup>.
- El área designada para el tratamiento y disposición final de los residuos debe tener un acceso controlado para evitar la entrada de animales, personal no capacitado o niños.
- **NO ALMACENE MUESTRAS BIOLÓGICAS SIN INACTIVAR, BAJO CONDICIONES BSL2**

**Para la disposición final, los residuos generados previamente esterilizados o incinerados deberán ser enterrados ó llevados a rellenos sanitarios autorizados por la autoridad competente de acuerdo a las normas legales vigente.**

---

<sup>6</sup> Ver documento *Interim Infection Prevention and Control Guidance* (sección: *waste management*). OMS 2014

## Documentos de referencia

- Recomendaciones para la toma segura y manipulación apropiada de muestras potencialmente infecciosas con agentes altamente patógenos. OPS/OMS, 2014
- Recomendaciones para el embalaje y envío apropiado por vía terrestre, de muestras potencialmente infecciosas con agentes altamente patógenos. OPS/OMS, 2014
- Interim infection prevention and control guidance. OMS 2014
- Interim guidance for specimen collection, transport, testing and submission for patients with suspected infection with Ebola Virus Disease. Centers for Disease Control and Prevention. USA, 2014
- Laboratory precautions for samples collected from patients with suspected viral haemorrhagic fevers. Commonwealth Department of Health and Aged Care. ISBN 06427356X Canberra, Australia 2001
- Grolla A, Lucht A, Dick D, Strong JE, Feldmann H. Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. Bull Soc Pathol Exot, 2005. 98(3): 205-9
- Bhagat CI, Lewer M, Prins A, Beilby JP. Effects of heating plasma at 56 degrees C for 30 min and at 60 degrees C for 60 min on routine biochemistry analytes. Ann Clin Biochem, 2000. 37 (Pt 6):802-4.