

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



1b

Recogida, transporte y procesamiento
general de las muestras en el laboratorio
de Microbiología

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinadora

María Isabel Sánchez Romero

Autores

Juan M. García-Lechuz Moya
Juan José González López
Nieves Orta Mira
María Isabel Sánchez Romero



ISBN: 978-84-697-4782-7

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:

García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

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"

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

1 b. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología.2017

Coordinadora:

María Isabel Sánchez Romero¹

Autores:

Juan Manuel García-Lechuz Moya²

Juan José González López³

Nieves Orta Mira⁴

María Isabel Sánchez Romero¹



¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid), ²Servicio de Microbiología, Hospital Miguel Servet (Zaragoza), ³Servicio de Microbiología, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Francesc de Borja, Gandía (Valencia)

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1	Introducción	6
2	Consideraciones generales.....	6
	2.1. Muestras clínicas recomendadas.....	6
	2.2. Envases utilizados.....	6
3	Recogida de muestras.....	8
	3.1 Recogida de muestras para estudio por métodos convencionales y automatizados.....	8
	3.2 Recogida de muestras para estudio mediante técnicas rápidas.....	8
4	Conservación de las muestras hasta su procesamiento.....	14
	4.1 Medios disponibles, temperatura y tiempo.....	14
5	Transporte.....	14
	5.1 Regulaciones para el transporte internacional de sustancias infecciosas.....	20
	5.2 Regulaciones locales y nacionales para el transporte de sustancias infecciosas.....	20
	5.3 Clasificación de las sustancias infecciosas para el transporte.....	21
	5.4 Preparación de envíos para su transporte.....	21
6	Recepción en el laboratorio/Servicio de Microbiología.....	26
	6.1 Requisitos para su registro.....	26
	6.2 Incidencias y criterios de rechazo.....	26
7	Aparatos y materiales.....	27
8	Medios de cultivo y reactivos.....	27
9	Procesamiento de las muestras.....	32
	9.1 Métodos convencionales: cultivo.....	33
	9.1.1 Fase de pretratamiento de la muestra.....	33
	9.1.2 Inoculación en los medios de cultivo.....	33
	9.1.3 Preparación de las extensiones.....	34
	9.1.4 Incubación.....	34
	9.2 Siembra automatizada. Automatización del laboratorio de Microbiología.....	35
	9.3 Técnicas rápidas.....	36
	9.3.1 Examen directo o tinciones.....	36
	9.3.2 Basadas en reacciones antígeno-anticuerpo.....	37
	9.3.2.1 Inmunocromatografía.....	37
	9.3.2.2 Enzimoimmunoanálisis.....	37
	9.3.3 Técnicas moleculares.....	38
10	Almacenamiento de las muestras tras su procesamiento.....	39
11	Recogida y transporte de muestras con sospecha de microorganismos con gran relevancia en salud pública	40
12	Bibliografía.....	42

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-RTPM-01. Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología
2. PNT-RTPM-02. Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública

DOCUMENTO TÉCNICO

1. INTRODUCCIÓN

El proceso diagnóstico en Microbiología se inicia con la toma de la muestra y finaliza con la emisión de los resultados. En la fase preanalítica se realizan las tareas de toma de muestras, transporte y registro en el sistema informático del laboratorio; en la fase analítica las muestras se procesan, analizan y se obtienen los resultados y por último, en la postanalítica, se realiza la validación de los resultados y la emisión de los informes.

Los facultativos peticionarios necesitan que los resultados proporcionados por el laboratorio de Microbiología sean precisos, significativos y clínicamente relevantes. Para proporcionar ese nivel de calidad, el laboratorio requiere que todas las muestras microbiológicas sean correctamente seleccionadas, recogidas y transportadas, ya que esto permite optimizar su análisis e interpretación.

La incorporación de métodos rápidos de diagnóstico y la automatización del laboratorio de Microbiología no ha sido una labor sencilla. Se han ido desarrollando equipos automatizados que siembran una amplia variedad de muestras en formato líquido. A esta automatización se han unido las técnicas de diagnóstico rápido de tipo inmunológico, de detección de antígenos víricos, bacterianos, fúngicos o parasitarios, la incorporación de las técnicas de biología molecular y la proteómica.

El presente procedimiento pretende servir de guía y ayuda en las actividades que comprenden la fase preanalítica y el comienzo de la fase analítica del diagnóstico microbiológico, actualizando y ampliando el anterior procedimiento de la SEIMC de recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (año 2003).

2. CONSIDERACIONES GENERALES

La Microbiología Clínica es una disciplina interpretativa cada día más compleja. A pesar de la automatización del laboratorio y de la incorporación de pruebas de diagnóstico rápido, la interpretación de los resultados microbiológicos depende, en gran medida, de la calidad de las muestras recibidas para su estudio. Por lo tanto, es necesaria una adecuada gestión de las muestras para conseguir un óptimo diagnóstico en Microbiología.

El síndrome clínico y los posibles agentes etiológicos implicados condicionan no sólo el tipo de muestra a enviar sino también su procedimiento de obtención, transporte, conservación y procesamiento. Igualmente, la información clínica, es la que permite al laboratorio aplicar las técnicas diagnósticas disponibles de manera más eficiente. Por ello, es fundamental que exista una estrecha comunicación entre los

microbiólogos y los clínicos responsables del paciente, participando activamente en el proceso diagnóstico.

2.1. MUESTRAS CLÍNICAS RECOMENDADAS

En la tabla 1 se resumen el tipo de muestras clínicas más adecuadas para el diagnóstico microbiológico de los procesos infecciosos más habituales.

En general, cada muestra debe ir acompañada de su correspondiente petición, ya sea en forma de volante de solicitud o mediante petición electrónica. Debe contener la información suficiente para que las muestras se procesen e interpreten sus resultados convenientemente. Toda solicitud analítica debería contener los siguientes puntos: filiación y datos administrativos/demográficos del paciente (nombre y apellidos, número de historia clínica y de identificación personal, fecha de nacimiento y sexo), nombre y apellidos del médico peticionario, servicio solicitante, datos clínicos relevantes, datos referentes a la muestra (tipo y localización anatómica), terapéutica seguida, tipos de pruebas a solicitar, así como el número de petición identificativo de la muestra o el localizador de la misma (solicitud electrónica). El empleo de sistemas informáticos adecuados es imprescindible para que todas las tareas diagnósticas puedan desarrollarse adecuadamente.

2.2. ENVASES UTILIZADOS

Hay una gran variedad de envases en los que se pueden recoger las muestras microbiológicas, siendo una característica común a todos ellos que sean estériles y con cierre a prueba de fugas. Los tubos empleados pueden no contener ningún medio (tubos secos), llevar una esponja impregnada en medio líquido en el fondo del tubo que mantiene la humedad, ir con medio de transporte en gel o en medio líquido (válido para estaciones de trabajo automatizadas).

Las torundas pueden ser de diferentes materiales: algodón (contiene ácidos grasos que son inhibidores), alginato cálcico (tóxico para virus y puede inhibir técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)), dacrón, rayón o nylon, y pueden tener la superficie de absorción lisa o ser flocadas (permiten una buena absorción de la muestra y elución en el medio de transporte). Además, el mango puede ser rígido de madera (puede interferir con las técnicas de microbiología molecular, inactivar a virus e interferir en pruebas de identificación de *Ureaplasma* spp.), de aluminio o de plástico (rígidos o flexibles).

Tabla 1. Muestras clínicas recomendadas para los estudios microbiológicos más habituales.

Proceso Infeccioso (sospecha o diagnóstico clínico)	Tipo de muestra para estudios microbiológicos	Comentarios
Abscesos	Aspirado del absceso	Cerebral, intraperitoneal o visceral, pulmonar
Artritis	Líquido sinovial	
Bacteriemia	Hemocultivos Sangre con EDTA	Posibilidad de detección directa mediante técnicas de Microbiología Molecular
Bronquiolitis	Aspirado/lavado nasofaríngeo	
Cervicitis	Exudado endocervical	
Colecistitis	Líquido biliar	
Conjuntivitis	Exudado conjuntival	Ambos ojos
Diarrea	Heces, aspirado duodenal	Torunda rectal, solo en casos seleccionados
Encefalitis	LCR	
Empiema pulmonar	Líquido pleural	
Endocarditis	Hemocultivos, válvula, verruga	
Endoftalmitis	Líquido intraocular	
Faringoamigdalitis	Exudado faríngeo o periamigdalares	
Gripe	Exudado nasofaríngeo Aspirado y lavado nasofaríngeo, broncoaspirado, lavado broncoalveolar y biopsias transbronquial, pulmonar o pleural	
Infección del catéter	Catéter, frotis pericatóter o conexión del catéter	Sospecha de bacteriemia asociada a catéter obtener hemocultivos
Infecciones asociadas al parto o puerperio (corioamnionitis)	Líquido amniótico, placenta	
Infecciones de piel y partes blandas (impetigo, foliculitis, erisipela, celulitis, úlceras, infecciones gangrenosas, abscesos cutáneos, heridas y quemaduras)	Aspirados, biopsias y exudados de las lesiones realizados preferiblemente con jeringa	Si es posible NO utilizar torunda
Infecciones protésicas (dispositivos varios)	Válvulas, marcapasos, prótesis y material de osteosíntesis	Contenedores estériles para sonicar
Infección respiratoria vírica (Virus respiratorio sincitial, Adenovirus)	Aspirado / lavado nasofaríngeo Exudado nasofaríngeo broncoaspirado, lavado broncoalveolar y biopsias transbronquial, pulmonar o pleural	
Infección urinaria	Orina (micción media) Punción suprapúbica Orina de sonda permanente (punción) Bolsas de orina o sondaje vesical (niños)	Inapropiadas: orina de la bolsa de sondaje y las puntas de sonda vesical Para anaerobios solo válida la punción suprapúbica
Infección por VPH	Cepillado de cérvix	
Meningitis	LCR Hemocultivos	
Neumonía	Espujo, aspirado traqueal, broncoaspirado, lavado broncoalveolar y biopsias transbronquial, pulmonar o pleural Hemocultivos	Inapropiadas: muestras de saliva o secreciones orofaríngeas
Otitis externa	Exudado ótico	(oído externo)
Otitis media	Muestra de timpanocentesis	
Osteomielitis	Biopsia ósea o exudado de la lesión	
Pericarditis	Líquido pericárdico	
Peritonitis	Líquido peritoneal	
Prostatitis	Secreción prostática y orina pre y post-masaje prostático	
Queratitis	Raspado corneal	
Sinusitis	Aspirado sinusal o biopsia	No válido el exudado nasal
Tosferina	Aspirado / lavado nasofaríngeo Exudado nasofaríngeo	
Úlceras genitales	Raspado/exudado de la úlcera	
Uretritis	Exudado uretral Orina	
Vulvovaginitis	Exudado vaginal	

LCR (líquido cefalorraquídeo), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), VPH (Virus del papiloma humano)

El tamaño y la forma de la torunda variará en función del tipo y localización de la muestra a tomar (para tomas uretrales o nasofaríngeas se empleará un torunda fina). Existen torundas con sistemas de transporte específicos para anaerobios. Por tanto, cada tipo de muestra va a requerir un contenedor diferente para una adecuada recogida y conservación hasta el momento de su procesamiento.

Respecto al medio de transporte, puede tratarse de medios generales para grupos de microorganismos (aerobios, anaerobios, dermatofitos) o específicos (Regan-Lowe para *Bordetella* spp.), medios de transporte de virus universal para cultivo y técnicas de detección de ácidos nucleicos o medios de transporte para conservación de células y medio para conservación de ácidos nucleicos (medios en base alcohol), entre otros. Se pueden emplear también frascos de hemocultivos, tubos y frascos con cierre de rosca, tubos de vacío (con o sin aditivos) y jeringas. En la tabla 2 se resumen los envases que más frecuentemente se pueden emplear para la recogida y transporte de las muestras.

3. RECOGIDA DE MUESTRAS

La idoneidad de las muestras enviadas depende del cumplimiento de una serie de medidas o reglas referentes al procedimiento de obtención, cantidad enviada y transporte rápido y adecuado al laboratorio. Las consecuencias de una muestra mal tomada, mal conservada o mal transportada, pueden suponer un fracaso en el aislamiento del agente etiológico o el aislamiento de posibles microorganismos contaminantes que pueden generar tratamientos innecesarios o inadecuados.

Puesto que una gran parte de las determinaciones en Microbiología se basan en la capacidad de crecimiento de los microorganismos, las condiciones de recogida y transporte han de asegurar en todo momento su viabilidad. El laboratorio de Microbiología debe elaborar un manual claro y conciso con las normas de recogida y transporte de muestras. Dicho manual debe distribuirse en controles de enfermería, consultas y demás dependencias hospitalarias y ambulatorias en las que se atiende a los pacientes. En caso de existir dudas sobre la idoneidad de las muestras o su recolección, se debe contactar siempre con el Servicio de Microbiología antes de proceder a su recogida.

De forma general, la toma de muestras para estudio de bacterias y de hongos (excepto líquidos estériles o muestras quirúrgicas) se puede realizar con torundas con medio de transporte en gel o líquido (para estudios automatizados) y la toma de muestras para estudio de virus se puede realizar con torundas de algodón, dacrón, rayón o nylon con bastón de aluminio o plástico (no se deben aceptar torundas

de alginato cálcico o con bastón de madera).

El empleo de medio de transporte para virus durante la recogida de las muestras depende en gran medida de la propia muestra; las muestras líquidas como sangre, LCR, orina y lavado broncoalveolar (LBA) no lo suelen requerir, por lo que deben ser transportadas y procesadas prestando especial atención a la temperatura óptima y los tiempos de almacenamiento. Para una mayor recuperación de los virus, se recomienda recoger las muestras durante los tres primeros días del cuadro infeccioso. En la tabla 3 se describe el tipo de envase, volumen y procedimiento de obtención, de los distintos tipos de muestras. Además de lo indicado en este procedimiento, en los diferentes procedimientos específicos de la SEIMC se puede encontrar información más detallada para cada tipo de muestra.

3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS PARA ESTUDIO POR MÉTODOS CONVENCIONALES Y AUTOMATIZADOS

La recogida de las muestras para estudios microbiológicos puede variar en función de si éstas van a procesarse mediante métodos convencionales o mediante métodos automatizados. En los últimos años se han ido incorporando nuevas estaciones de trabajo automatizadas que pueden mejorar la eficiencia del flujo de trabajo y la estandarización de la siembra. Estos sistemas automatizados pueden realizar el cultivo a partir de muestras líquidas directamente o en medios líquidos de transporte.

3.2. RECOGIDA DE MUESTRAS PARA ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS RÁPIDAS

Aunque el cultivo es uno de los métodos más empleados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, también se dispone de otras técnicas, cuya principal característica es la rapidez. Las técnicas de diagnóstico rápido permiten, entre otras, la detección de antígenos, de ácidos nucleicos y de la respuesta inmunológica. Las pruebas rápidas más empleadas son la inmunofluorescencia, la aglutinación, la inmunocromatografía, el enzimoimmunoensayo y las técnicas de microbiología molecular (PCR en tiempo real y PCR multiplex). Mediante estas últimas se puede detectar un agente infeccioso aislado o varios de forma simultánea (bacterias, virus, hongos, parásitos), incluso genes de resistencia a antibióticos, en un tiempo corto, con escasa manipulación y preparación de las muestras y con resultados precisos.

Los paneles que hay diseñados actualmente y comercializados basados en técnicas de PCR abarcan los agentes etiológicos más frecuentes de síndromes concretos. Estas técnicas pueden presentar unos requerimientos específicos (incluido

Tabla 2. Recipientes y sistemas de recogida y transporte de muestras microbiológicas.

Recipientes y sistemas de recogida y transporte	Comentarios
Bolsas de anaerobiosis	Bolsa impermeable en cuyo interior se introduce un catalizador y un generador de hidrógeno y CO ₂
Capilares estériles para microhematocrito	Útiles para visualizar parásitos (<i>Trypanosoma</i> spp.)
Cepillo en medio de transporte líquido para el Virus del papiloma o frasco de citología líquida	Evitar recoger muestras con sangre
Contenedores estériles de boca ancha	Para orina, esputos, broncoaspirados, lavados broncoalveolares, heces, biopsias grandes, tejidos, dispositivos (catéteres, prótesis, marcapasos), etc.
Contenedores estériles de boca estrecha	Líquidos estériles, catéter telescópico, biopsias pequeñas, aspirados de abscesos y heridas
Frascos de hemocultivos para sistemas de incubación automatizada	Para sangre y cultivo de otros líquidos estériles (peritoneal, articular, etc.) Tipos: aerobios, anaerobios, pediátricos, micobacterias y hongos
Frascos lisis-centrifugación	Empleados principalmente en bacteriemia/ fungemia
Jeringa para la obtención de aspirados	Para aspirado de absceso, vesícula, colecciones, etc. Se emplean cuando no se dispone de ninguno de los sistemas anteriores para estudio de bacterias anaerobias, o bien cuando la cantidad de muestra es mínima. Para ello hay que eliminar el aire y cerrar con un tapón estéril desechando la aguja
MTV y UTM (con o sin torunda)	Útil para virus El universal también para PCR de <i>Chlamydia</i> spp., <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>Mycoplasma</i> spp.
Placas de Petri estériles	Útil para escamas cutáneas, pelos y uñas
Torundas de alginato cálcico	En <i>Bordetella</i> spp. se pueden emplear para cultivo, pero no se recomiendan para PCR. Puede inhibir técnicas de PCR y ser tóxicas para virus
Torundas de algodón	No recomendables para <i>Chlamydia</i> spp., <i>Bordetella</i> spp. y <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Torundas en medio de Cary-Blair	Para enteropatógenos en heces. También disponibles con agar líquido (permite automatización)
Torundas de dacrón, rayon o nylon	No interfieren con las técnicas de PCR, útiles para virus
Torundas de mango flexible	Útil para tomas nasofaríngeas
Tubos estériles con conservante (de vacío o de rosca con esponja)	Contienen ácido bórico-formiato de sodio (estabilizante del crecimiento) Para cultivo bacteriológico de orina. Útil en automatización
Tubos estériles con fijador	Para búsqueda de parásitos en heces. Tipos de fijadores: SAF, PVA, MIF, fijadores ecológicos, etc.
Torundas con medio en gel de Stuart o Amies	Para bacterias aerobias y anaerobias facultativas
Torunda con medio Amies con carbón	Para transporte de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Torunda (flocada o no) con medio líquido de transporte (Amies)	Muestras de exudados. Se puede emplear en automatización. Para bacterias aerobias, microorganismos exigentes, bacterias anaerobias y PCR
Tubos estériles de vacío con aditivos	Con EDTA, citrato, heparina o con aditivos que impiden degradación de ARN
Tubos estériles de vacío con gel separador	Para la obtención de suero
Tubos con medio líquido con torundas especiales: uretral y nasal	Muestras nasofaríngeas (permite cultivo <i>Bordetella</i> spp.) o genitales. Se pueden emplear en automatización. Para bacterias aerobias, microorganismos exigentes, bacterias anaerobias y PCR
Viales y tubos con atmósfera anaerobia	Contienen un medio de transporte semisólido con un agente reductor y un indicador. Cualquier coloración azul de dicho medio indica exposición al aire

Abreviaturas: SAF (acetato sódico-formalina), PVA (polivinil-alcohol), MIF (mertiolato-ioduro-formalina), MTV (medio de transporte para virus), UTM (medio transporte de virus universal), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Tabla 3. Consideraciones sobre la toma de las muestras

TIPO DE MUESTRA	ENVASE	VOLUMEN	PROCEDIMIENTO	COMENTARIOS
Abscesos	Contenedor estéril Jeringa de extracción con cambio de aguja	El que se pueda obtener	Punción-aspiración Cirugía	Cerebral, intraperitoneal o visceral, pulmonar
Catéteres, frotis pericatóter y de la conexión	Contenedor estéril (catéter) Torunda con MT (frotis)	2 a 4 cm distales (porción intravascular)	Extracción aséptica del catéter Frotando la piel o introduciendo la torunda en el orificio de la conexión	
Líquidos estériles (articular, biliar, amniótico, diálisis peritoneal)	Contenedor estéril MT para anaerobios Jeringa estéril Frasco hemocultivos	1-5 ml aerobios y anaerobios 10 ml hongos 10 ml micobacterias	Punción percutánea	Enviar un pequeño volumen en frasco estéril para Gram
Prótesis, válvulas cardíacas y otros dispositivos	Contenedor estéril		Cirugía abierta	
Tejidos y biopsias	Contenedor estéril MT para anaerobios MT para virus	Máximo tejido posible, evitando zonas necróticas	Punción-aspiración Punch o cirugía abierta	Para micobacterias y <i>Helicobacter pylori</i> añadir unas gotas de agua destilada No enviar las muestras envueltas en gasas
Muestras gastrointestinales				
Aspirado duodenal	Contenedor estéril		Sonda nasogástrica endoscopia o cápsula	<i>Giardia</i> spp. y <i>Strongyloides</i> spp.
Biopsia de esófago	Contenedor estéril		Técnica endoscópica	Sospecha de CMV y otros Virus herpes en MT para virus
Biopsia gástrica	Contenedor estéril	3-4 fragmentos	Técnica endoscópica	Añadir gotas de suero fisiológico para evitar desecación
Biopsia intestino delgado	Contenedor estéril		Técnica endoscópica	<i>Giardia</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Microsporidium</i> spp.
Biopsia rectal	Contenedor estéril		Técnica endoscópica	<i>Entamoeba histolytica</i>
Heces	Contenedor estéril Medio Cary-Blair Frascos con fijador parasitológico	Heces líquidas >5 ml Heces formes >2 g	Elegir la porción que presente sangre, moco o pus	No útil para cultivo de larvas
Jugo gástrico	Contenedor estéril		Sonda nasogástrica	Neutralizar con carbonato sódico
Muestras genitourinarias y de infecciones de transmisión sexual				
Orina	Contenedor estéril Tubo estéril con ácido bórico	1 ml bacterias 5-10 ml para antígenos urinarios y virus 10-20 ml hongos, micobacterias y PCR 100 ml u orina de 24 h para parásitos	Micción media Punción suprapúbica Orina de 24 h Punción a través de la sonda permanente pinzada Bolsa colectora (niños)	Antígenos urinarios (<i>Legionella</i> spp. y <i>S. pneumoniae</i>) PCR (<i>Chlamydia</i> spp. y <i>N. gonorrhoeae</i>) Parásitos (<i>Schistosoma haematobium</i>) Virus (Adenovirus, CMV, Virus BK)
Exudado vaginal	Torunda con MT en gel o líquido (siembra automatizada)		Fondo de saco vaginal posterior (usar espéculo)	Para cultivo bacteriano 2 torundas (una para estudio microscópico)
Exudado endocervical	Torunda con MT en gel o líquido (siembra automatizada y PCR) Torunda en MT con carbón (<i>N. gonorrhoeae</i>) Torunda con MT para virus (PCR, virus, <i>Chlamydia</i> spp., <i>Mycoplasma</i> spp. y <i>Ureaplasma</i> spp.)		Recoger la muestra con espéculo. Retirar el exceso de moco y rotar en endocervix	Para cultivo bacteriano 2 torundas (una para estudio microscópico)
Cepillado de cérvix	Cepillo en MT especial o citología líquida (Virus del papiloma humano)			

Tabla 3 Continuación

TIPO DE MUESTRA	ENVASE	VOLUMEN	PROCEDIMIENTO	COMENTARIOS
Exudado vagino-rectal (cribado embarazadas)	Torunda con MT o medio Todd-Hewit selectivo Caldo Granada		Recoger la muestra SIN espéculo en vagina Rotar contra las criptas rectales	Antes de cualquier manipulación vaginal
Endometrio y productos de la concepción	Contenedor estéril y MT para anaerobios	Fragmentos sospechosos de infección	Durante la cesárea o vía transcervical	
Exudado uretral	Torunda en MT en gel (bacterias y hongos) o líquido (PCR y siembra automatizada) Torunda en MT con carbón (<i>N. gonorrhoeae</i>) Torunda en MT para virus (PCR, virus, <i>Chlamydia</i> spp., <i>Mycoplasma</i> spp. y <i>Ureaplasma</i> spp.)		Recoger la muestra como mínimo 1-2 horas después de la última micción	Para cultivo bacteriano 2 torundas (una para estudio microscópico)
Exudado balano prepucial	Torunda con MT		Recoger del surco balanoprepucial	
Exudado rectal	Torunda en MT con carbón (<i>N. gonorrhoeae</i>)		Rotar repetidamente (criptas)	
Secreción prostática o en su defecto semen	Contenedor estéril	Más de 1 ml	Tras masaje prostático o eyaculación	Acompañar este estudio de orina pre y post masaje prostático
Úlcera genital, chancro, adenopatías	Torunda con MT en gel o MT para virus		Limpiar la lesión con suero salino y presionar la base para recoger fluido	
Muestras sistema nervioso central				
LCR	Contenedor estéril	El que se pueda obtener 1 ml para cultivo de bacterias, serología y biología molecular 2 ml para hongos, micobacterias virus y parásitos	Extracción aséptica tras punción lumbar Derivaciones externas Derivaciones internas	Aspecto más turbio o el extraído en segundo lugar
Muestras oculares				
Exudado conjuntival	Torunda con MT en gel o MT para virus		Frotar la conjuntiva tarsal y fórnix	Humedecer la torunda con suero fisiológico Ambos ojos
Raspado corneal	Envase estéril MT de virus	Inoculación directa de la muestra sobre los medios de cultivo	Oftalmólogo	Para detección de amebas emplear envase estéril
Humor vítreo	Frasco estéril Jeringa de aspiración MT para virus	Volumen de muestra muy limitado, priorizar los estudios	Oftalmólogo	
Aparato lagrimal	Torunda con MT MT para anaerobios Jeringa aspiración		Aspirar el exudado purulento o dacriocistotomía	
Muestras óticas				
Oído externo	Torundas con MT		Canal auditivo externo	
Oído interno	Frasco estéril MT para anaerobios Jeringa de aspiración		Timpanocentesis	Hacer la toma antes de instilación de anestésicos locales, colirios o antibióticos; o al menos 4 horas desde la última administración
Muestras de piel y tejidos blandos				
Abscesos abiertos, heridas y quemaduras	Contenedor estéril MT anaerobios Jeringa de aspiración		Extracción de la muestra con jeringa o en su defecto con torunda	Para cultivo bacteriano 2 torundas (una para estudio microscópico)
Úlceras cutáneas	Contenedor estéril MT anaerobios Jeringa de aspiración		Extracción de la muestra con jeringa o en su defecto con torunda	

Tabla 3 Continuación

TIPO DE MUESTRA	ENVASE	VOLUMEN	PROCEDIMIENTO	COMENTARIOS
Abscesos cerrados	Contenedor estéril MT anaerobios Jeringa de aspiración	1 ml	Punción aspiración	
Vesículas mucocutáneas	Torunda seca MT para virus		Aspirar líquido de las vesículas Romper la vesícula y frotar el fondo con torunda	
Raspado de piel, pelo y uñas	Contenedor estéril Placa de Petri estéril		Se puede inocular directamente en los medios de cultivo	
Muestras del tracto respiratorio superior				
Mucosa oral	Torunda con MT normal y/o virus		Enjuagarse previamente la boca con agua	
Exudado nasal	Torunda con MT gel o líquido (siembra automatizada) Tubo seco (PCR)			En las 2 fosas nasales
Exudado faríngeo	Torunda con MT gel (cultivo bacteriano) Torunda sin medio (detección antigénica) Torunda con MT virus		Utilizar depresor lingual	Evitar tocar la úvula, labios o lengua
Exudado / Aspirado nasofaríngeo	Torunda flexible con o sin MT (gel o líquido) Torunda con MT virus Contenedor estéril	0.5-1 ml	Introducir la torunda en la parte posterior de nasofaringe por vía nasal Aspirar las secreciones mediante un sistema de aspiración	No comer 2 horas antes Para <i>Bordetella</i> spp. inocular inmediatamente
Senos paranasales	Contenedor estéril con MT para anaerobios Jeringa de aspiración	1 y 10 ml	Punción aspirativa sinusal	
Muestras de tracto respiratorio inferior				
Espujo espontáneo	Contenedor estéril	3-5 ml hongos y bacterias 2 ml (<i>Pneumocystis jirovecii</i>) 5-10 ml para micobacterias 3-5 ml para parásitos	Primer espujo de la mañana previo enjuague de la boca con agua. Nebulización con aerosol	Parásitos (<i>Ascaris lumbricoides</i> y uncinarias o huevos de <i>Paragonimus westermani</i> , <i>Echinococcus</i> spp., <i>Strongyloides</i> spp.) Especificar cultivo de <i>Legionella</i> spp.
Espujo inducido				
Aspirado traqueal	Contenedor estéril		Aspiración a través del tubo endotraqueal	
BAS	Contenedor estéril		Fibrobroncoscopio	
LBA	Contenedor estéril	10-100 ml	Fibrobroncoscopio	
Cepillado bronquial	Contenedor estéril		Fibrobroncoscopio	Añadir 1 ml de suero fisiológico estéril
Biopsia transbronquial	Contenedor estéril		Fibrobroncoscopio	Añadir 1 ml de suero fisiológico estéril o agua estéril para micobacterias
Líquido pleural	Contenedor estéril MT para anaerobios Fracos hemocultivos	El que se pueda obtener	Toracocentesis	

Tabla 3 Continuación

TIPO DE MUESTRA	ENVASE	VOLUMEN	PROCEDIMIENTO	COMENTARIOS
Biopsia pulmonar y pleural	Contenedor estéril MT para anaerobios	La mayor cantidad posible de tejido	Punción transtorácica (PAAF)	Añadir agua estéril si se solicitan micobacterias
Sangre y médula ósea				
Hemocultivos	Frascos hemocultivos Tubos de lisis centrifugación	8-10 ml por frasco 1-3 ml pediátricos	Extracción forma aséptica, distintos lugares de venopunción Sin tiempo de espera	2-3 extracciones Endocarditis y FOD 3 extracciones BAC (1 dispositivo / 1 sangre periférica)
Extensiones sanguíneas (parásitos)	Tubo de vacío con anticoagulante (EDTA)	3-5 ml	Venopunción previa desinfección	
Serología	Tubo de vacío con gel separador de suero Tubo con EDTA para plasma	5 ml adultos 3-5 ml niños	Venopunción previa desinfección	
Pruebas de detección de antígenos	Tubo de vacío con gel separador de suero Tubo con EDTA para plasma	Dependerá de la determinación y la técnica empleada	Venopunción previa desinfección	Se puede realizar en sangre total (<i>Plasmodium</i> spp.) o en suero (<i>Cryptococcus neoformans</i>)
Pruebas de detección de ácidos nucleicos	Tubos de vacío con EDTA Con ácido cítrico especialmente formulados Tubos especializados	Dependerá de la determinación y la técnica empleada 5-10 ml	Venopunción previa desinfección	No emplear tubos con heparina
Medula ósea	Tubo con EDTA (para biología molecular) Frascos de hemocultivos (bacterias, hongos y micobacterias) Tubo con heparina (<i>Leishmania</i> spp.)	1 ml como mínimo	Punción-aspiración	

Abreviaturas: CMV (citomegalovirus), PAAF (punción aspiración con aguja fina), FOD (fiebre de origen desconocido), BAS (broncoaspirado), LBA (lavado broncoalveolar), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), LCR (líquido cefalorraquídeo), MT (medio de transporte), BAC (bacteriemia asociada a catéter)

el sistema de transporte y conservación de la muestra) que dependerán de la técnica disponible en cada laboratorio, además también pueden diferir en el número de microorganismos que detectan.

Se dispone, por ejemplo, de paneles comercializados para diagnóstico de infecciones respiratorias a partir de muestras de aspirado o exudado nasofaríngeo, infecciones gastrointestinales a partir de heces frescas o en medio Cary-Blair, bacteriemia a partir de sangre directa con EDTA o en medios especiales o de frasco de hemocultivo positivo, de infecciones meníngeas a partir de LCR, infecciones de transmisión sexual a partir de exudado uretral, cervical u orina, entre otros.

También están disponibles técnicas de PCR para el diagnóstico rápido del estado de portador, como puede ser la detección de *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus agalactiae* a partir de torunda seca o con medio líquido.

Cada prueba de detección molecular se podrá realizar en unas muestras concretas, presentando requerimientos específicos que diferirán en función de la técnica empleada, por lo que el sistema de recogida y las condiciones de conservación podrán variar dependiendo de las especificaciones del fabricante. En la tabla 4 se muestran las pruebas rápidas disponibles en función de la localización del proceso infeccioso y del tipo de muestra recomendable para su realización.

4. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS HASTA SU PROCESAMIENTO

4.1 MEDIOS DISPONIBLES, TEMPERATURA Y TIEMPO

De forma general, las muestras recogidas para estudios microbiológicos deben enviarse lo más rápidamente posible al laboratorio/Servicio de Microbiología. Se podrán transportar a temperatura ambiente si no se demora su envío tras su obtención, aunque algunas requerirán hielo para su transporte. En el caso de que no puedan transportarse inmediatamente, se podrán seguir las siguientes recomendaciones generales, aunque con excepciones:

- a) para estudios de microbiología molecular, virus o micobacterias, refrigerar las muestras (2-8°C);
- b) también pueden refrigerarse las muestras de orina, heces, las de origen respiratorio y algunos tipos de exudados y líquidos biológicos (según la petición); y
- c) se conservarán a temperatura ambiente las

muestras de hemocultivos, LCR, exudados y líquidos biológicos.

Existen bacterias que son especialmente sensibles a las condiciones ambientales: *Shigella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y las bacterias anaerobias. La detección fiable de estas especies requiere un procesamiento inmediato. Se deben entregar en el laboratorio pequeños volúmenes de líquido (1 ml) o tejido (1 cm) antes de 15-30 minutos tras su recogida, para evitar la evaporación, el secado y la exposición a las condiciones ambientales. Para el traslado de muestras que se van a procesar fuera del hospital o del centro sanitario donde se han recogido, independientemente de la distancia y el vehículo utilizado, se debe seguir la normativa sobre transporte de sustancias infecciosas que se desarrollará en el apartado 5 de este documento científico. En la tabla 5 se detallan, para las muestras más frecuentes, los envases aconsejados para la recogida de la muestra según la determinación solicitada, así como el tiempo y la temperatura más adecuados para su transporte y conservación hasta su procesamiento.

5. TRANSPORTE

El transporte de muestras de material biológico dentro de un hospital o centro, de un centro de salud a un hospital, de un laboratorio a otro, de un hospital a otro dentro de la misma ciudad o a otra ciudad, se deben gestionar por el propio hospital, por el servicio de salud o por cualquier organización de transportes o agencia que haya sido autorizada. En el caso de que una muestra, sea o no infecciosa, se deba transportar dentro o fuera de un determinado país, ésta debe remitirse correctamente empaquetada y etiquetada para preservar la integridad del material a transportar y para proteger a quienes intervengan en el transporte.

Cada país cuenta con su propia normativa para el transporte, la importación y exportación de muestras biológicas y es responsabilidad del remitente asegurar la correcta clasificación, empaquetado, etiquetado y documentación del transporte de sustancias infecciosas.

España ha adoptado las recomendaciones descritas por Naciones Unidas en lo relativo al transporte de sustancias infecciosas. Parte de la información que se incluye en este capítulo se reproduce de lo expuesto en las guías sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas de los años 2013-2014 y de los años 2015-2016 publicadas por la Organización Mundial de la Salud.

Estas guías se basan en las Recomendaciones relativas al Transporte de Mercancías Peligrosas de la Organización de las Naciones Unidas.

Tabla 4. Principales tipos de muestra empleadas para el diagnóstico con pruebas rápidas

Localización proceso infeccioso	Microorganismo/s implicado/s	Técnicas posibles	Tipo de muestra
Enfermedades sistema genitourinario e ITS	<i>Chlamydia trachomatis/ Neisseria gonorrhoeae</i>	TAAN	Uretral, endocervical, orina
	<i>Mycoplasma genitalium, Ureaplasma spp.</i>	TAAN	Uretral, endocervical
	Virus herpes simple	IF	Lesión cutánea
	Virus del papiloma humano	TAAN	Endocervical
	<i>Treponema pallidum</i>	Campo oscuro RPR / VDRL	Muestra directa lesión Suero / LCR
Enfermedades sistema respiratorio	<i>Haemophilus influenzae</i>	Aglutinación	Muestra respiratoria, líquido pleural
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	IC, Aglutinación, TAAN	Orina, líquido pleural Muestra respiratoria
	<i>Legionella pneumophila</i>	IC, EIA IF, TAAN	Orina, líquido pleural Muestra respiratoria
	<i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TAAN	Muestra respiratoria
	<i>Bordetella pertussis</i>	IF, TAAN	Exudado / aspirado nasofaríngeo
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	IC	Exudado faríngeo Lesiones cutáneas, líquidos estériles
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tinción AAR, TAAN	Muestra respiratoria
	Virus de la gripe	IF, IC, EIA, TAAN	Aspirado-Exudado nasofaríngeo
	Virus respiratorio sincitial	IF, IC, EIA, TAAN	Muestra respiratoria (aspirado-exudado nasofaríngeo)
	Adenovirus	IF, IC, TAAN	Muestra respiratoria (aspirado-exudado nasofaríngeo, faríngeo)
	Virus parainfluenza 1,2,3	IF, TAAN	Muestra respiratoria (aspirado-exudado nasofaríngeo)
	Virus varicela-zoster	IF, TAAN	Muestra respiratoria
	CMV	IF, TAAN	Muestra respiratoria
	<i>Aspergillus spp.</i>	Inmunodifusión, EIA, TAAN	Suero, galactomanano en muestra respiratoria (mejor LBA)
	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	IF, tinción, TAAN	Muestra respiratoria
Enfermedades Sistema Nervioso Central	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	Aglutinación, EIA, TAAN	LCR, orina LCR
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Aglutinación, EIA, TAAN	LCR, orina LCR
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Aglutinación, EIA, TAAN	LCR, orina LCR
	<i>Listeria spp.</i>	Aglutinación, EIA, TAAN	LCR, orina LCR
	<i>Escherichia coli</i>	Aglutinación, EIA, TAAN	LCR, orina LCR
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	IC, Aglutinación, EIA, PCR	LCR, orina LCR
	Enterovirus	TAAN	LCR
	<i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i>	Inmunodifusión, EIA, aglutinación. Tinta china	LCR, suero LCR
Infecciones sistema digestivo	<i>Clostridium difficile</i>	EIA, IC, TAAN	Heces
	<i>Salmonella spp., Shigella spp.</i>	TAAN	Heces
	<i>Helicobacter pylori</i>	IC, EIA, TAAN	Heces Biopsia gástrica
	Rotavirus/Adenovirus/ Norovirus/Astrovirus	Aglutinación, IC, EIA, TAAN	Heces
	Norovirus	IC, EIA, TAAN	Heces
	Astrovirus	EIA, TAAN	Heces
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	IF, IC, EIA, Tinción AAR, TAAN	Heces
	<i>Giardia lamblia</i>	IF, IC, EIA, TAAN	Heces
	<i>Entamoeba histolytica</i>	EIA, IC, TAAN	Heces, absceso
Infecciones en sangre o médula ósea	<i>Brucella spp.</i>	Aglutinación	Suero
	Bacteriemia	TAAN	Sangre con EDTA
	<i>Candida spp.</i>	Aglutinación, EIA	Suero
	<i>Leishmania spp.</i>	Tinción, TAAN Aglutinación	Sangre, médula ósea Orina
	<i>Plasmodium spp.</i>	Tinción, gota gruesa, IC, TAAN	Sangre con EDTA

Tabla 4 Continuación

Localización proceso infeccioso	Microorganismo/s implicado/s	Técnicas posibles	Tipo de muestra
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	IC, EIA	Suero
	VIH	IC, EIA	Suero, plasma
	Virus hepatitis B (AgHBs)	IC, EIA	Suero, plasma
	CMV	IF, TAAN	Suero, plasma, orina
	Virus Epstein Barr	Aglutinación, EIA, IC	Suero, plasma
Infecciones en piel y mucosas	Virus herpes simple	IF	Lesión cutánea, tejido
	Virus varicela zoster	IF	Lesiones cutáneas
	Dermatofitos	IC	Muestras ungueales
Estudio de portador	<i>S. agalactiae</i>	TAAN	Exudado vagino-rectal
	<i>S. aureus</i>	TAAN	Exudado nasal, faríngeo
	Bacterias productoras de carbapenemasas	TAAN	Exudado rectal

Abreviaturas: ITS (infección de transmisión sexual), IF (inmunofluorescencia), TAAN (técnicas de amplificación de ácidos nucleicos), IC (inmunocromatografía), EIA (enzimoinmunoensayo), LCR (líquido cefalorraquídeo), AAR (ácido alcohol resistencia), VIH (virus inmunodeficiencia humana), CMV (Citomegalovirus), AgHBs (Antígeno de superficie del Virus de la hepatitis B)

Tabla 5. Conservación de las principales muestras empleadas en el diagnóstico microbiológico

Muestra	Determinación	Envase	Transporte Tiempo, Temperatura	Conservación Tiempo, Temperatura
Sangre	Hemocultivo	Frascos de hemocultivos	≤ 2 h, TA	≤24 h, TA
	Serología	Tubo de suero Tubo de plasma (no válido si hay que inactivar)	≤2-4 h, TA	<24 h, 2-8°C >24 h, -20°C o -70°C
	Cargas virales	Tubo plasma (nunca heparina)	≤2 h, TA	≤72h, -20°C >72h, -70°C
	Virus	Tubo plasma	≤2 h, TA	
	Detección ácidos nucleicos	Tubo sangre con EDTA	≤2 h, TA	
	Parásitos	Sangre con EDTA	≤1h, TA	2-8°C
Médula ósea	Bacterias/Hongos/Micobacterias	Tubo estéril con anticoagulante, frascos hemocultivos	≤2 h, TA	≤24 h, TA
	Parásitos (<i>Leishmania</i> spp.)	Tubo estéril con anticoagulante (heparina)	≤2 h, TA	
	Detección ácidos nucleicos	Tubo sangre con EDTA	≤2 h, TA	
	Virus	Tubo estéril con anticoagulante	≤24 h, 2-8°C	>24h, -70°C
Catéter intravenoso	Bacterias/Hongos	Frasco estéril	≤15 min, TA	≤24 h, 2-8°C
Líquido cefalorraquídeo	Bacterias	Frasco estéril	≤15 min, TA	≤24 h, 35°C
	Micobacterias	Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
	Hongos	Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, 35°C
	Virus	Frasco estéril	≤15 min, TA o 2-8°C	≤24 h, 2-8°C
	Serología	Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
	Parásitos	Frasco estéril	≤15 min, TA	
	Detección ácidos nucleicos	Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
	Otros líquidos estériles: abdominal, amniótico, pleural, ascítico, biliar, articular, sinovial, pericárdico	Bacterias	Frasco estéril, tubo con medio anaerobios, frascos de hemocultivo, jeringa sin aire	≤15 min, TA
Hongos		Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, TA
Micobacterias		Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
Virus		Frasco estéril, tubo con MT para virus	≤15 min, TA o 2-8°C	≤24 h, 2-8°C
Parásitos		Frasco estéril	≤15 min, TA	≤24 h, TA
Detección ácidos nucleicos		Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
Abscesos abiertos / heridas / quemaduras	Bacterias	Frasco estéril, torunda con MT	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
	Hongos	Frasco estéril, torunda con MT	≤2 h, TA	≤24 h, TA
	Virus	Torunda seca o con MT de virus	≤24 h, 2-8°C. Transferir a MT de virus	>24 h, -70°C
Abscesos cerrados	Bacterias	Frasco con medio para anaerobios, jeringa aspiración (sin aguja)	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C muestra en frasco de hemocultivos TA
	Hongos	Frasco estéril, jeringa aspiración (sin aguja)	≤2 h, TA	≤24 h, TA
	Virus	Jeringa (sin aguja) o en MT de virus	≤24 h, 2-8°C. Transferir a MT de virus	>24 h, -70°C
Biopsias/tejidos	Bacterias / Hongos	Frasco estéril, frasco con MT para anaerobios	≤15 min, TA	≤24 h, 2-8°C
	Micobacterias	Frasco estéril	≤15 min, TA	≤24 h, 2-8°C
	Virus / ácidos nucleicos	Frasco estéril, frasco con MT de virus	≤24 h, 2-8°C. Transferir a MT de virus	>24 h, -70°C
Orina	Bacterias / Hongos	Frasco estéril Tubo con conservante	≤1 h, TA ≤24 h, TA (conservante)	≤24 h, 2-8°C
	Virus (cultivo o detección ácidos nucleicos)	Frasco estéril o con MT de virus	≤24 h, 2-8°C	
	Antígenos urinarios	Frasco estéril	≤2 h, TA	<24h, TA >24 h, 2-8°C >14 d, -20°C

Tabla 5 Continuación

Muestra	Determinación	Envase	Transporte Tiempo, Temperatura	Conservación Tiempo, Temperatura
	<i>Mycoplasma</i> spp. y <i>Ureaplasma</i> spp.	Frasco estéril	Inocular en MT específico	≤8 h, TA ≤36 h, 2-8°C
	<i>Leptospira</i> spp.	Frasco estéril	≤1 h, TA	
	Parásitos	Frasco estéril	≤2 h, TA	
Orina (primera micción)	Detección por PCR de: <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Frasco estéril o con MT específico	≤2 h, TA (hasta 2 días, dependiendo del medio)	<5 días, 2-8°C
Orina suprapúbica	Bacterias	Frasco estéril o con MT para anaerobios	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
Genital: secreción prostática	Bacterias / Hongos	Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, TA
Genital: cervical	Virus del papiloma humano	Cepillo con medio especial o citología líquida	Dependiendo del medio, hasta 2-3 semanas a TA	
Genital: cervical, uretral, rectal	Bacterias	Torunda con medio de transporte Inoculación directa en medios de cultivo (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	≤2 h, TA	≤24 h, TA
Genital: cervical, uretral	<i>Chlamydia trachomatis</i>	MT especial (cultivo, PCR) torunda seca (fluorescencia, PCR)	Cultivo: inoculación inmediata PCR: dependiendo del medio hasta 2 días, TA	
	<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>	Torunda dacrón o similar	Inocular en MT específico	≤8 h, TA ≤36 h, 2-8°C
Genital: vaginal	Bacterias / Hongos / Parásitos	Torunda con MT Torunda seca para Gram Medio especial para <i>Trichomonas vaginalis</i> y levaduras	≤2 h, TA	≤24 h, TA
Genital: vagino-rectal	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Torunda con MT	≤2 h, TA	<24h 2-8°C
Genital: úlcera	Virus	Torunda seca y transferir a MT de virus	≤24 h, 2-8°C	>24 h, -70°C
	<i>Treponema pallidum</i>	Campo oscuro	Visualización inmediata	
Genital: endometrio, productos concepción	Bacterias	MT para anaerobios	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
Heces	Bacterias	Frasco estéril MT Cary-Blair (gel o líquido)	≤2 h, TA ≤24 h, TA (Cary-Blair)	≤24 h, 2-8°C ≤48 h, 2-8°C o TA (Cary-Blair)
	<i>Clostridium difficile</i>	Frasco estéril	≤1 h, TA 1-24 h, 2-8°C >24 h, 2-8°C o -20°C	48 h, 2-8°C (cultivo) <72 h, 4-8°C (citotoxina) >72 h, -70°C (citotoxina)
	Parásitos	Tubo con fijador (SAF/MIF/PVA, ecológico, etc.)	Indefinido, TA	Indefinido, TA
	Virus	Frasco estéril (transferir a medio de virus)	≤24 h, 2-8°C	
	Pruebas rápidas detección antígenos	Frasco estéril o Cary-Blair	≤2 h, TA	>2 y <48 h, 2-8°C
Heces/Rectal	Virus	Torunda seca y transferir a MT de virus	≤24 h, 2-8°C	
	Bacterias	Torunda con medio Cary-Blair	≤24 h, TA	≤48 h, 2-8°C o TA
Aspirado gástrico	Bacterias / Hongos	Frasco estéril	≤2 h, 2-8°C	≤24 h, 2-8°C
	Micobacterias	Frasco estéril	≤15 min, TA o neutralizar en ≤1 h	≤24 h, 2-8°C

Tabla 5 Continuación

Muestra	Determinación	Envase	Transporte Tiempo, Temperatura	Conservación Tiempo, Temperatura
Portadores: Faringeo / nasal / rectal / axilar / inguinal / perineal	Bacterias / Hongos	Torunda con MT	≤2 h, TA	≤24 h, TA o 2-8°C
Conjuntival	Bacterias / Hongos	Torunda con MT Inoculación directa en medios de cultivo	≤2 h, TA ≤15 min, TA	≤24 h, TA
Raspado corneal	Bacterias / Hongos	Inoculación directa en medios de cultivo	≤15 min, TA	≤24 h, TA
Aspirado líquido vítreo	Bacterias / Hongos	Frasco estéril, inoculación directa en medios de cultivo	≤15 min, TA	≤24 h, TA
Ocular	Virus	Torunda sin medio o aspirado y transferir a MT de virus	≤24 h, 2-8°C	
Oído externo	Bacterias / Hongos	Torunda con MT	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
Oído interno	Bacterias / Hongos	Torunda con MT frasco estéril MT de anaerobios	≤2 h, TA	≤24 h, TA
TRS: Oral	Bacterias / Hongos	Torunda con MT	≤2 h, TA	≤24 h, TA
	Virus	Torunda seca y transferir a MT virus	≤24 h, 2-8°C	>24 h, -70°C
TRS: Nasal	Bacterias / Hongos	Torunda con MT	≤2 h, TA	≤24 h, TA
TRS: Exudado / Aspirado nasofaríngeo	Bacterias	Torunda con MT	≤2 h, TA	≤24 h, TA
	<i>Bordetella pertussis</i>	Aspirado en frasco estéril Torunda seca: Inocular inmediatamente en medios especiales	Inmediato, 2-8°C	
	Virus / detección ácidos nucleicos	Frasco estéril y transferir a MT de virus	≤2 h, 2-8°C o TA	>2 h y <5 días, 2-8°C >5 días, -70°C
TRS: Faringeo	Bacterias / Hongos	Torunda en MT	≤2 h, TA	≤24 h, TA
	Antígeno <i>S. pyogenes</i>	Torunda seca	≤2 h, TA	≤72 h, 2-8°C
	Virus / detección ácidos nucleicos	Torunda seca y transferir a MT virus inmediatamente	≤2 h, 2-8°C o TA	>2 h y <5 d, 2-8°C >5 días, -70°C
TRS: Sinusal	Bacterias / Hongos	Frasco estéril o en MT para anaerobios	≤15 min, TA	≤24 h, TA
Muestras del Tracto Respiratorio Inferior¹	Bacterias / Micobacterias / Hongos / Parásitos	Frasco estéril	≤2 h, TA	≤24 h, 2-8°C
	Virus / detección ácidos nucleicos	Frasco estéril y transferir a MT virus inmediatamente	≤2 h, TA	>2 h y <5 d, 2-8°C >5 días, -70°C
Piel, pelo y uñas	Hongos	Frasco estéril o inoculación directa en medios de cultivo	≤4 h, TA	≤24 h, TA
Oxiuros y parásitos macroscópicos	Parásitos	Test de Graham Frasco estéril o frasco con agua o suero o fijador	≤2 h, TA	

Abreviaturas: TA (temperatura ambiente), SAF (acetato sódico-formalina), PVA (polivinil-alcohol), MIF (mertiolato-ioduro-formalina), TRS: tracto respiratorio superior, TRI: tracto respiratorio inferior, MT (medio de transporte).

¹Tracto Respiratorio Inferior incluye: esputo, esputo inducido, aspirado traqueal, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar, cepillado telescópico y punción transtorácica aspirativa con aguja ultrafina

5.1 REGULACIONES PARA EL TRANSPORTE INTERNACIONAL DE SUSTANCIAS INFECCIOSAS

Las normas internacionales para el transporte de sustancias infecciosas a través de cualquier medio de transporte están basadas en las Recomendaciones del Comité de Expertos de las Naciones Unidas para el Transporte de Artículos Peligrosos (UNCETDG).

Estas recomendaciones se presentan en forma de «reglamentación modelo». La Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas queda reflejada en la legislación internacional por medio de los siguientes reglamentos internacionales de transporte.

- Para el transporte aéreo, la reglamentación internacional jurídicamente vinculante son las Instrucciones Técnicas para el Transporte sin riesgos de Mercancías Peligrosas por Vía Aérea publicadas por la Organización de Aviación Civil Internacional (OACI). La Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA) publica unas normas sobre artículos peligrosos (Dangerous Goods Regulations, DGR) que incorporan las disposiciones de la OACI y pueden añadir restricciones adicionales. Las normas de la OACI se aplican en todos los vuelos internacionales. En los vuelos nacionales, las autoridades de aviación civil de cada país aplican la normativa nacional pertinente, que normalmente se basa en las disposiciones de la OACI, pero puede presentar variaciones. Las variaciones de carácter estatal y las debidas al operador se publican en las instrucciones técnicas de la OACI y en las normas sobre artículos peligrosos de la IATA.

- Para el transporte por ferrocarril en países de Europa, Oriente Medio y Norte de África se aplica el Reglamento relativo al Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Ferrocarril (RID). El RID también se aplica en el transporte interior en la Unión Europea, según lo estipulado en la Directiva 2008/68/EC del Consejo Europeo.

- Para el transporte por carretera, el Acuerdo Europeo sobre Transporte Internacional de *Mercancías Peligrosas por Carretera* (ADR) se aplica en 48 países. Este acuerdo se aplica también en el transporte interior de la Unión Europea, según lo estipulado en la Directiva 2008/68/EC del Consejo Europeo.

- Para el transporte marítimo, el *Código Internacional Marítimo de Mercancías Peligrosas* publicado por la

Organización Marítima Internacional (OMI) es de cumplimiento obligado para todas las partes contratantes en el convenio internacional para la seguridad de la vida humana en el mar (SOLAS).

- Para el transporte por vía postal, el manual del correo postal (*Letter post manual*) publicado por la Unión Postal Universal (UPU) refleja las recomendaciones de las Naciones Unidas utilizando las disposiciones de la OACI como base para los envíos.

5.2 REGULACIONES LOCALES Y NACIONALES PARA EL TRANSPORTE DE SUSTANCIAS INFECCIOSAS

Los principios en los que se basa un transporte seguro a nivel nacional o local son los mismos que se aplican para el transporte internacional y la finalidad es que la muestra no tenga ninguna posibilidad de salir del embalaje en las circunstancias normales de transporte. En España el Real Decreto 65/2006, de 30 de enero, establece los requisitos para la importación y exportación de muestras biológicas y la Orden SAS/3166/2009, de 16 de noviembre, sustituye los anexos del Real Decreto de 2006. Para la importación/exportación de muestras biológicas dentro del Espacio Aduanero comunitario, la instrucción técnica de la Subdirección General de Sanidad Exterior de 10 de enero de 2012 pone de manifiesto que no es necesaria la autorización por parte del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Cuando el laboratorio requiera enviar muestras a un centro externo el cual se encuentre dentro de la Unión Europea (UE), la normativa actual establece que el envío solamente debe cumplir con la normativa reflejada para los procedimientos de recogida, embalaje, etiquetado y envío, no siendo necesario ningún documento para que el paquete pueda salir del país.

Si el laboratorio se encuentra fuera de la UE, el promotor tiene dos opciones entre las que elegir.

- Solicitar la inscripción voluntaria en el registro de importadores y exportadores de muestras biológicas aportando un documento firmado y sellado por el laboratorio de origen a la Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación, donde se identifique el envío, sus cualidades y los posibles riesgos para la salud en caso de que existieran, y la aprobación del ensayo por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Cuando toda la documentación ha sido validada, se emite un certificado vigente para 5 años que se incluirá junto con el envío de muestras y que permitirá que las muestras salgan de España y entren en el país de destino.

- Solicitar una licencia de importación y exportación ocasional de muestras biológicas. Para ello debe cumplimentarse un documento, firmarse y sellarse, donde se contemple el contenido del envío, sus características y

los riesgos que puedan existir para la salud. Además, el promotor debe enviar una declaración escrita en la que se realice una descripción de los objetivos del análisis de esas muestras biológicas, la responsabilidad de que serán usadas y destruidas correctamente y la especificación de que no se trata de muestras que posean fines comerciales. Por último, se incluirá también un modelo de despacho cumplimentado que deberá revisar y gestionar el inspector aduanero.

Una vez que se ha comprobado toda la documentación, se emitirá una autorización para aceptar o rechazar la importación o exportación de las muestras biológicas que será remitida al interesado y al punto fronterizo que se haya solicitado. Únicamente podrán autorizarse despachos aduaneros en los recintos aduaneros y puntos fronterizos. Para poder autorizar la salida de las muestras el interesado debe presentar la autorización firmada del titular de la Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación, además del despacho previamente firmado por el inspector en el servicio de Sanidad Exterior que corresponda.

5.3 CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS INFECCIOSAS PARA EL TRANSPORTE

A las mercancías peligrosas se les asignan los números UN y en función de su clasificación de peligrosidad y de su composición se les atribuye las designaciones oficiales de transporte que les corresponden. Las designaciones oficiales de transporte se utilizan por tanto para identificar claramente al artículo o sustancia peligrosos. Las sustancias infecciosas se clasifican con arreglo a la división 6.2 y se asignan a los números UN 2814, UN 2900, UN 3291 o UN 3373, según corresponda. Así, las sustancias infecciosas se dividen en las siguientes categorías:

Categoría A: Sustancia infecciosa que se transporta en una forma que, al exponerse a ella, es capaz de causar una incapacidad permanente, poner en peligro la vida o constituir una enfermedad mortal para seres humanos o animales previamente sanos. Corresponden por tanto a esta categoría los patógenos pertenecientes al grupo de riesgo 4, incluyendo los agentes identificados como patógenos nuevos o emergentes o las sustancias sobre las que haya dudas acerca de si cumplen o no los criterios de inclusión en esta categoría. Todas aquellas sustancias que pertenezcan a la categoría A y puedan causar enfermedad en seres humanos y en animales se asignarán al UN 2814. Aquellas que solo causen enfermedad a animales se les asignará al UN 2900.

Categoría B: Sustancia infecciosa que no cumple los criterios para su inclusión en la categoría A. Las sustancias infecciosas de la categoría B se asignarán al UN 3373.

Exenciones: Las muestras que no están sujetas a la reglamentación sobre transporte de mercancías peligrosas son las siguientes:

- Las muestras que no contengan sustancias infecciosas o que no sea probable que causen enfermedades en seres humanos o animales a menos que cumplan los criterios para su inclusión en otra clase.
- Las sustancias que contengan microorganismos que no sean patógenos en seres humanos o animales, a menos que cumplan los criterios para su inclusión en otra clase.
- Aquellas sustancias en las que los patógenos presentes se hayan neutralizado o inactivado de tal manera que no supongan riesgos para la salud.
- Las muestras ambientales (incluidas las muestras de alimentos y de agua) que se considere que no presenten riesgos apreciables de infección.
- Las gotas de sangre seca, tomadas depositando una de ellas sobre un material absorbente, o las muestras para detección de sangre en materias fecales.
- La sangre recogida para transfusiones o para preparación de productos sanguíneos, y los productos sanguíneos y los tejidos y órganos destinados a trasplante.
- Las muestras de pacientes que presenten un riesgo mínimo de contener agentes patógenos si se transportan en un embalaje/ensado diseñado para evitar cualquier fuga y en el que figure la indicación «Exempt human specimen» (muestra humana exenta). El embalaje/ensado de este tipo de muestras deberá cumplir el sistema básico de envasado triple que se muestra en el apartado 5.4.1

5.4 PREPARACIÓN DE ENVÍOS PARA SU TRANSPORTE

Los requisitos de envasado, etiquetado y documentación de muestras infecciosas actualmente vigentes, están determinados por el UNCETDG y se recogen en las instrucciones de embalaje/ensado P620 y P650. Estos requisitos están establecidos en función de si la muestra infecciosa pertenece a la categoría A (UN 2814 y UN2900) o a la categoría B (UN 3373), respectivamente. Es importante tener además en cuenta que las líneas aéreas internacionales prohíben estrictamente que los pasajeros lleven sustancias infecciosas de las categorías A o B como equipaje de mano y que transporten estos materiales en valijas diplomáticas.

5.4.1. Sistema básico de envasado triple:

El sistema básico de envasado triple se deberá utilizar para transportar todas las sustancias infecciosas. Este sistema de transporte comprende tres capas (Figura 1):

Recipiente primario. Se trata del recipiente primario a prueba de filtraciones y estanco que contiene la muestra. Este recipiente se debe envolver en material absorbente con capacidad para absorber todo el fluido en caso de rotura o fuga.

Recipiente secundario. Recipiente resistente, estanco, a prueba de filtraciones que encierra y protege el recipiente primario. Se pueden colocar varios recipientes primarios envueltos en un recipiente secundario, pero se deberá usar suficiente material absorbente para absorber todo el fluido en caso de rotura o fuga.

Recipiente exterior. Los recipientes secundarios se colocan en envases exteriores de transporte provistos con un material amortiguador adecuado. Los recipientes exteriores protegen el contenido de los elementos exteriores, como daños físicos, mientras el bulto se encuentra en tránsito. Ninguna de las caras del recipiente exterior tendrá dimensiones inferiores a 10 × 10 cm.

Cada envase preparado para su transporte deberá estar correctamente marcado y etiquetado e ir acompañado de los documentos de envío pertinentes. A continuación, se describen los requisitos relativos a estos aspectos.

5.4.2. Requisitos de envasado, marcado, etiquetado y documentación correspondiente a las sustancias infecciosas de categoría A.

Envasado: Las sustancias infecciosas de la categoría A solamente pueden ser transportadas en envases que cumplan las especificaciones correspondientes a la clase 6.2 de Naciones Unidas y la Instrucción de envasado P620 (figura 1 y ver transporte en el documento técnico PNT-RTPM-02). Esto asegura que se han superado pruebas estrictas de resistencia. El embalaje exterior debe llevar la marca de embalaje tipificada de Naciones Unidas, que certifica la superación por el envasado de las pruebas de resistencia a satisfacción de la autoridad competente. La marca de las Naciones Unidas en sí misma no indica que el envase haya sido sometido a pruebas, y los usuarios del mismo deberían consultar a sus proveedores si el envase preparado para su expedición cumple este requisito.

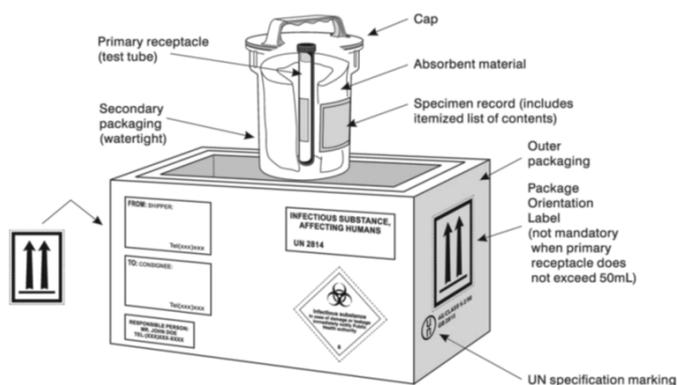


Figura 1. Ejemplo de sistema de embalaje triple para el embalaje y etiquetado de sustancias infecciosas de categoría A (tomado de la Guía OMS 2015)

Para el transporte por superficie no se establece una cantidad máxima por paquete. Los límites por paquete para el transporte aéreo 50 ml o 50 g en aviones de pasajeros y 4 litros o 4 kg en aviones de carga.

Todo recipiente primario cuya capacidad supere los 50 ml deberá contar con una indicación de la orientación correcta en el embalaje exterior que permita mantener las tapas en la parte superior. Se fijarán sendas etiquetas de orientación (flechas acompañadas de la indicación «UP») (ARRIBA) en dos lados opuestos del embalaje exterior.

- **Marcado:** En los paquetes que contengan el material a transportar se representan marcas que proporcionan información acerca de su contenido, la naturaleza del peligro que suponen, así como las normas de embalaje aplicadas. Las marcas de los envases se ubicarán de tal forma que sean claramente visibles y que no las cubra ninguna otra etiqueta o marca. Cada paquete mostrará la siguiente información en el embalaje exterior:

- el nombre y la dirección del expedidor (remite, consignador)
- el número de teléfono de una persona responsable e informada acerca del envío
- el nombre y la dirección del destinatario (consignatario)
- el número UN seguido de la designación oficial de transporte [UN 2814 «INFECTIOUS SUBSTANCES AFFECTING HUMANS» (SUSTANCIAS INFECCIOSAS QUE AFECTAN AL SER HUMANO) o UN 2900 «INFECTIOUS SUBSTANCES AFFECTING ANIMALS» (SUSTANCIAS INFECCIOSAS QUE AFECTAN A LOS ANIMALES), según proceda]. No es necesario mostrar los nombres técnicos en el embalaje.

- requisitos relativos a la temperatura de almacenamiento (optativo)
- cuando se utilice hielo seco o nitrógeno líquido: el nombre técnico del refrigerante, el número UN pertinente y la cantidad neta.

● **Etiquetado:** Existen dos tipos de etiquetas: a) etiquetas de peligro, con forma de cuadrado orientado en un ángulo de 45° (romboides), requeridas para la mayoría de las mercancías peligrosas de todas las clases; b) etiquetas de manipulación, de diversas formas, requeridas, ya sea aisladas o junto con las etiquetas de peligro, para algunas mercancías peligrosas. Se fijarán al exterior de todos los paquetes destinados a la expedición de mercancías peligrosas (excepto los sujetos a exenciones específicas) una o más etiquetas de peligros específicos. Las etiquetas de peligro mostradas en las figuras 2 a 6 se utilizan para sustancias infecciosas de categoría A:

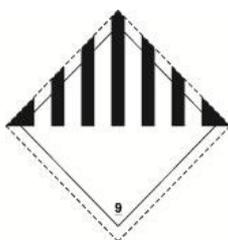


Nombre: sustancia infecciosa
Dimensiones mínimas: 100 × 100 mm (embalajes pequeños: 50x50 mm)
N.º de etiquetas por paquete: 1

Color: blanco y negro

Se mostrará la expresión «INFECTIOUS SUBSTANCE» (SUSTANCIA INFECCIOSA). En algunos países se exige incluir la siguiente declaración: «Si el paquete sufre daños o fugas, notifíquelo inmediatamente a las autoridades de salud pública».

Figura 2. Etiqueta de peligro para sustancias infecciosas de categoría A y para microorganismos y organismos modificados genéticamente que se ajustan a la definición de sustancia infecciosa de categoría A



Nombre: sustancias peligrosas misceláneas

Dimensiones mínimas: 100 × 100 mm (embalajes pequeños: 50x50 mm)

N.º de etiquetas por paquete: 1

Color: blanco y negro

Figura 3. Etiqueta de peligro para determinados microorganismos y organismos modificados genéticamente no infecciosos (UN 3245) y para dióxido de carbono sólido (hielo seco) (UN 1845); las sustancias empaquetadas en hielo seco deberán llevar esta etiqueta además de la etiqueta de peligro principal (por ejemplo, la etiqueta que se muestra en la figura 2

para sustancias infecciosas de categoría A o la marca mostrada en la figura 9 para sustancias infecciosas de categoría B).



Nombre: gas no inflamable ni tóxico

Dimensiones mínimas: 100 × 100 mm (embalajes pequeños: 50 × 50 mm)

N.º de etiquetas por paquete: 1

Color: verde y blanco o verde y negro

Figura 4. Etiqueta de peligro para nitrógeno líquido; las sustancias empaquetadas en nitrógeno líquido deberán llevar esta etiqueta además de la etiqueta de peligro principal (por ejemplo, la etiqueta que se muestra en la figura 2 para sustancias infecciosas de categoría A o la marca mostrada en la figura 9 para sustancias infecciosas de categoría B).



Nombre: líquido criogénico

Dimensiones mínimas: Standard A7: 74 × 105 mm

n.º de etiquetas por paquete: 1

Color: verde y blanco

Figura 5. Etiqueta de manipulación para líquidos criogénicos; en el transporte aéreo, cuando se utilicen líquidos criogénicos (gases licuados a temperaturas muy bajas), deberá adherirse esta etiqueta a los recipientes o frascos termoaislados utilizados como embalaje/envase exterior además de las etiquetas o marcas mostradas en las figuras 3, y 10, según proceda.

Nombre: Etiqueta de orientación

Dimensiones mínimas: Norma A7: 74 × 105 mm

N.º por paquete: 2, en lados opuestos

Color: blanco y negro o blanco y rojo

Pueden también mostrarse en la tapa superior del paquete las expresiones «THIS SIDE UP» (ESTE LADO HACIA ARRIBA) o «THIS END UP» (ESTE EXTREMO HACIA ARRIBA).

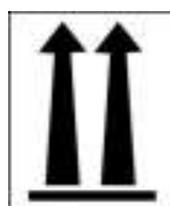


Figura 6. Etiqueta de orientación para indicar la posición de los cierres de los recipientes primarios; para el transporte aéreo de sustancias infecciosas líquidas de la categoría A en cantidades que superen los 50 ml por recipiente primario, se deberá adherir esta etiqueta en dos lados opuestos del paquete con las flechas indicando la orientación correcta, además de la etiqueta que se muestra en la figura 3.

- Documentación: Para el envío de embalajes que contengan sustancias infecciosas de categoría A se requieren los siguientes documentos de expedición:

- Elaborados y firmados por el remitente:
 - para transporte aéreo habrá que adjuntar una declaración de mercancías peligrosas del expedidor (véase el ejemplo de la figura 7)
 - una lista de empaque (o de embarque) o factura proforma en la que se indique la dirección del destinatario, el número de paquetes y una descripción de su contenido, indicando su peso y valor (Nota: para el transporte internacional, si el contenido se proporciona gratis deberá indicarse un valor mínimo, para fines aduaneros).
 - un permiso o declaración (o ambos) de importación o exportación, o ambos, si fuera preciso

- Documentos que debe cumplimentar el remitente o su agente:
 - un conocimiento de embarque aéreo, para el transporte aéreo, o documentos equivalentes, para los envíos por carretera, tren y mar.

Además de los documentos señalados, en las mercancías asignadas a los números UN 2814 y UN 2900 se incluirá una relación del contenido entre el envase secundario y el envase exterior. También, a efectos de la documentación, la designación oficial de transporte se complementará con el nombre técnico. No es necesario que el nombre técnico aparezca en el embalaje. Cuando no se conozca la sustancia infecciosa que va a transportarse, pero se sospeche que cumple los criterios para su inclusión en la categoría A y la asignación a los números UN 2814 o UN 2900, la indicación «sustancia infecciosa de la que se sospecha que pertenece a la categoría A», deberá figurar en el documento de transporte entre paréntesis, a continuación de la designación oficial de transporte en el documento de transporte, pero no en envase exterior.

Figura 7. Ejemplo de declaración de mercancías peligrosas cumplimentada por el remitente.

SHIPPER'S DECLARATION FOR DANGEROUS GOODS

Shipper: Dr XY Orange, tel 0789 456 123
Children's Hospital
6 Splendid Street
12345 Beachcity
Newcountry

Consignee: Dr. All Normal, tel 03210 887 456
Victroland Laboratories
6 Mary Way
12345 Newtown
Newcountry

For completed and signed copies of this declaration must be handed to the carrier.

SHIPPER'S REFERENCE NUMBER: 543 7654 9876
Page 1 of 1 Pages

Transport Details: Airfreight
Airport of Departure: Airfreight
 PASSENGER AND CARGO AIRCRAFT
Airport of Destination: Willgetthere

WARNING: Failure to comply in all aspects with the applicable Dangerous Goods Regulations may be in breach of the applicable law, subject to legal penalties.

SHIPMENT TYPE (Make non-applicable): NON-RADIOACTIVE RADIOACTIVE

NATURE AND QUANTITY OF DANGEROUS GOODS						
Dangerous Goods Identification						
UN No.	Proper Shipping Name	Class or Division (Preliminary)	Packing Group	Quantity and Type of Package	Packing Code	Authorization
UN 2814	Infectious substance, affecting humans (Excludes virus)	6.2		50ml	630	
UN 1845	Dry ice	9		DRG All packed in one fibreglass box	654	

Additional Handling Information: Emergency contact: Dr Orange tel 0789 456 123

I hereby declare that the contents of this consignment are fully and accurately described above by the proper shipping name, and are classified, packaged, marked and labelled/placarded, and are in all respects in proper condition for transport according to applicable international and national governmental regulations.

Name/Title of Signatory: Dr XY Orange
Goods Dispatch
Place and Date: Beachcity
18 June 2015
Signature (see warning above)

5.4.3 Requisitos de envasado, marcado, etiquetado y documentación correspondiente a las sustancias infecciosas de categoría B.

- **Envasado:** se aplica el sistema de envasado básico triple, incluso para el transporte local por superficie. No obstante, no es necesario aportar documentos relativos a los análisis. El envasado debe cumplir plenamente los requisitos de la Instrucción P650 (figura 8 y ver transporte en documento técnico RTPM 01).

Para el transporte por superficie no se establece una cantidad máxima por paquete. Para el transporte aéreo:

- ningún recipiente primario tendrá un contenido mayor que 1 litro y el envase exterior no debe contener más de 4 litros (para líquidos)
- excepto si contiene partes del cuerpo, órganos o cuerpos enteros, el envase exterior no debe contener más de 4kg

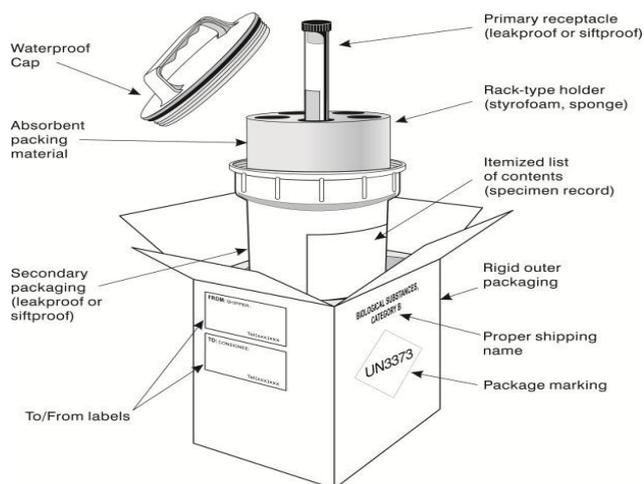


Figura 8. Ejemplo de sistema de envasado triple para el embalaje y etiquetado de sustancias infecciosas de categoría B (tomado de las guías OMS 2015-2016).

Si se cumplen todos los requisitos establecidos en la Instrucción de envasado P650, no se establecen requisitos de transporte adicionales. La Instrucción P650 comprende todos los requisitos necesarios para el envío de sustancias infecciosas de categoría B.

- **Marcado:** En los paquetes que contengan sustancias infecciosas de categoría B deberá exponerse la siguiente información:
 - para transporte aéreo: el nombre, la dirección y el número de teléfono del expedidor (remitente, consignador)
 - para transporte aéreo: el número de teléfono de una persona responsable e informada acerca del envío
 - el nombre, la dirección y el número de teléfono del destinatario (consignatario)
 - la designación oficial de transporte («BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B» o SUSTANCIA BIOLÓGICA, CATEGORÍA B) junto a la marca romboide mostrada en la figura 9
 - requisitos relativos a la temperatura de almacenamiento (optativo).

Para los envíos de sustancias infecciosas de categoría B se utiliza la marca que se muestra en la figura 9.

- Dimensiones mínimas: la anchura de la línea que delimita el cuadrado será al menos 2 mm y la altura de las letras y números será

al menos 6 mm. Para el transporte aéreo, los lados del cuadrado medirán al menos 50 mm.

- **Color:** no se especifica, siempre que la marca esté expuesta sobre la superficie exterior del embalaje exterior sobre un fondo de color que contraste con el de la marca y que sea claramente visible y legible.



- Se mostrarán junto a la marca las palabras «BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B» (SUSTANCIA BIOLÓGICA, CATEGORÍA B) en letras con una altura de por lo menos 6 mm.

Figura 9. Marca para sustancias infecciosas de categoría B (tomado de OMS 2015-2016).

Para el transporte aéreo:

- Cuando se utiliza hielo seco (dióxido de carbono sólido), se aplicará la etiqueta de la figura 3.
- Para líquidos criogénos se añadirán también las etiquetas de las figuras 4 y 5.
- **Documentación:** Para el transporte de material infeccioso perteneciente a la categoría B no se requieren documentos de mercancías peligrosas. El remitente debe incluir los siguientes documentos:
 - para envíos internacionales: una lista de empaque (o de embarque) o factura proforma en la que se indiquen las direcciones del expedidor y del destinatario, el número de paquetes y la descripción de su contenido, indicando su peso y valor (si los productos enviados son gratuitos, deberá aparecer la declaración «sin valor comercial»)
 - un permiso o declaración de importación o exportación, o ambos, si fuera preciso.

El expedidor o agente deberá cumplimentar la siguiente información:

- un conocimiento de embarque aéreo, para el transporte aéreo, o documentos equivalentes, para los envíos por carretera, tren y mar.

6. RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

6.1 REQUISITOS PARA SU REGISTRO

En el proceso de recepción de las muestras en el laboratorio, se deben comprobar una serie de aspectos que permitan determinar si la muestra cumple los requisitos de calidad necesarios para ser procesada. De no ser así, los resultados de los estudios microbiológicos realizados pueden verse afectados negativamente, lo que puede conllevar a la no detección del agente etiológico o a la detección de microorganismos contaminantes, es decir, que no sean los responsables de la enfermedad, lo que podría conllevar a la instauración de tratamientos inadecuados o innecesarios.

Así, en el proceso de recepción de la muestra clínica se requiere:

- Una correcta identificación de la muestra: este hecho es indispensable para poder establecer una correspondencia inequívoca entre el contenedor en el que se encuentra la muestra recibida, la muestra que contiene y el paciente al cual pertenece.
- Que el tipo de muestra recibido sea adecuado para los estudios solicitados.
- Que el volumen o cantidad de muestra sea el necesario para poder llevar a cabo los estudios microbiológicos previstos.
- Que la muestra se haya transportado en el contenedor adecuado y en las condiciones de transporte y conservación necesarios para que su viabilidad no se vea afectada.

Tras evaluar la idoneidad y adecuación de la muestra a la petición recibida (en tipo y volumen suficiente para las peticiones de pruebas solicitadas), esta es etiquetada y se introducen los datos en el sistema informático del laboratorio junto con la información proporcionada en el volante o se activa la petición electrónica, estableciendo un emparejamiento muestra-solicitud de pruebas con los datos de etiquetado del propio laboratorio. Es un hecho conocido que de un mismo paciente se pueden enviar varias muestras y que de una misma muestra se pueden solicitar varias pruebas y todas deben ser caracterizadas por separado (con fecha y número).

6.2 INCIDENCIAS Y CRITERIOS DE RECHAZO

Cualquier incidencia aparecida en relación al incumplimiento de alguno de los requisitos necesarios para la aceptación de una muestra deberá ser registrada. En ese registro de incidencias deberá figurar la fecha en la se recibe la muestra, su identificación, el tipo de muestra, el servicio solicitante, la persona que la detecta, la descripción del tipo de incidencia, si se ha podido resolver o no, y en caso afirmativo, la forma en la que se ha resuelto. Las incidencias más frecuentes en la llegada de una muestra al laboratorio de Microbiología, las acciones a realizar y los criterios de rechazo ante cada caso son las siguientes:

- Identificación incorrecta: no se aceptará una muestra sin identificar, mal identificada o en la que no coincidan el número de petición con la de la muestra. En cualquier caso, se contactará con el médico peticionario haciéndole conocer la necesidad de que procedan a la correcta identificación de la muestra. Si se puede recoger otra muestra, se solicitará nuevamente. Dependiendo de la importancia de la muestra, se puede optar a llevar a cabo su procesamiento antes de la correcta identificación, con el objeto de que no se deteriore la misma.

- Muestras derramadas: no se aceptarán muestras claramente derramadas y se procederá como en el caso anterior solicitando una nueva muestra. En el caso de no ser posible la recogida de una nueva muestra, se debe desinfectar externamente el envase o trasvasar la muestra a un contenedor estéril. En este caso, se indicará en el informe de resultados que la muestra estaba derramada y que los resultados deben ser interpretados con la debida precaución.

- Transporte/conservación inadecuados: si no se cumplen los requisitos para el transporte de muestras en el contenedor adecuado y en las condiciones necesarias (tabla 5), se solicitará una nueva muestra. En el caso de muestras que no se puedan volver a recoger (por ejemplo, muestras quirúrgicas), se puede optar por procesarlas informando por escrito al servicio solicitante de la incidencia en la recogida/transporte de la muestra y alertando de que los resultados obtenidos deben ser interpretados con la precaución correspondiente. En el caso de que el transporte deficiente invalide totalmente el estudio microbiológico (por ejemplo, muestras en formol), no se aceptarán estas muestras y se informará al servicio solicitante de la inadecuación de la misma.

- **Tipo de muestra no adecuada para el estudio solicitado:** si la muestra remitida no es adecuada para el estudio solicitado, no se aceptará y se informará al servicio solicitante de la inadecuación de la misma, aclarando el tipo de muestra que se requiere.

7. APARATOS Y MATERIALES

Los equipos habituales convencionales necesarios en el procesamiento de una muestra para estudio microbiológico son: cabinas de bioseguridad (varios niveles según tipo de laboratorio), estufas (distintas temperaturas y atmósferas), congeladores, neveras y centrifugas. De manera periódica (preferiblemente a diario) debe controlarse la temperatura (y humedad/ presión de CO₂ si fuera necesario) de cada estufa/ nevera/congelador al inicio de la jornada de trabajo con un termómetro situado permanentemente en el centro de cada equipo. El termómetro debe permitir la medida de las temperaturas máxima y mínima alcanzadas. Se anotará en la hoja de registro de temperatura de cada aparato y en el caso de temperaturas mínima o máxima fuera del rango de aceptación, se debe anotar la incidencia y realizar las acciones oportunas frente a esa variación. Estas acciones, por un lado, deben asegurar los resultados derivados de los cultivos y por otro, corregir esa desviación.

De una manera genérica se sugieren los siguientes intervalos de aceptación:

- estufas de 35-37°C se acepta una mínima superior o igual a 34°C y máxima inferior o igual a 37,5°C
- estufas de 42°C se aceptan variaciones entre 40-43°C
- estufas de 30°C se aceptan variaciones entre 28-32°C
- estufas de CO₂ (5-7%)
- neveras el intervalo de tolerancia que se acepta es generalmente de 2°-8°C
- congeladores -20°C y -80°C

Todos los termómetros utilizados en la medida de temperaturas de los aparatos se han de verificar mediante un termómetro de referencia calibrado. Se introducirá el termómetro utilizado para la medición de la temperatura y el termómetro calibrado en el equipo correspondiente (nevera, congelador o estufa) durante un mínimo de 15 minutos. Se aceptarán aquellos termómetros cuyos desvíos no sobrepasen los límites establecidos para cada uso concreto.

La periodicidad de la verificación de los termómetros con el termómetro calibrado debe ser establecida por el propio laboratorio.

Existen sistemas automáticos para el control de la temperatura, humedad, presión de CO₂, etc., que controlan de una manera permanente (en intervalos de 15-20 minutos) los anteriores parámetros con gran fiabilidad y que utilizan sondas de referencia verificadas por organismos certificados. Estos sistemas alertan de las desviaciones que se producen de una manera más rápida.

Tras la automatización del procesamiento serológico, surgieron nuevos instrumentos de automatización parcial (inoculación y siembra) entre los años 1970 y 1990 (tipo Isoplater o Inoculab) de alguna forma restringido inicialmente a muestras líquidas (orinas o suspensiones bacterianas preparadas a mano previamente), sistema de procesamiento de hemocultivos y sistemas semi-automatizados para el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) con plataformas tipo Phoenix (Becton-Dickinson), Vitek (bioMérieux) o MicroScan (Beckman-Coulter) y plataformas de diagnóstico molecular. Recientemente se han comercializado los procesadores automáticos de trabajo "todo en uno" (etiquetado, agitación, apertura y cierre del contenedor, inoculación, siembra, identificación y antibiograma) que pueden conectar con incubadoras en diversas condiciones, trabajar en estaciones conectadas con un procesador central y ofrecer identificación por imagen de alta resolución. Actualmente existen tres plataformas automatizadas: WASP (Walk-Away Specimen Processor) de Copan, Full Microbiology Lab Automation (FMLA) de bioMérieux y Kiestra de BD Diagnostics. Las características específicas de cada una se resumen en la tabla 6 junto con las características de los procesadores "core" de cada sistema.

8. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

8.1 MEDIOS DE CULTIVOS

Al sembrar una muestra clínica en un medio de cultivo, las bacterias existentes en la muestra empiezan a multiplicarse y eso permite su detección. Los medios de cultivos deben contener los elementos nutritivos necesarios para permitir la multiplicación de las bacterias y según su consistencia pueden clasificarse en medios sólidos (la mayoría de los utilizados) y medios líquidos (como caldo tioglicolato (TG), caldo cerebro corazón o *Brain Heart infusión* (BHI), caldo selenito, Roiron o medio Middlebrook). Los medios de cultivo

convencionales y cromogénicos recomendados para el procesamiento de las muestras más habituales en bacteriología se detallan en las tablas 7 y 8.

En general, la mayoría de las muestras se inoculan en medio agar sangre de cordero (AS). Además, para las muestras de líquidos normalmente estériles, del tracto respiratorio y del tracto genital, se añade una placa de agar chocolate (ACH) o agar sangre de caballo. Normalmente, las muestras de orígenes no estériles se siembran en una placa de agar MacConkey (MCK) para seleccionar microorganismos que no forman parte de la microbiota habitual. Existen medios específicos para determinados patógenos nosocomiales como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y además se pueden utilizar medios selectivos, especialmente útiles para aislar determinados patógenos del resto de la microbiota como el agar Columbia CNA (colistina-nalidíxico) que selecciona microorganismos Gram positivos inhibiendo la microbiota Gram negativa, o los medios selectivos para el coprocultivo que contienen compuestos inhibitorios para la microbiota normal no patógena. La mayoría de estos medios selectivos utilizan compuestos orgánicos (sales biliares, selenito, tetrionato, lauril sulfato de sodio, telurito) y tinturas (violeta cristal, eosina, azul de metileno) como tóxicos químicos selectivos sobre determinadas bacterias. Asimismo, el uso de antibióticos incluidos en el medio (colistina, cloranfenicol, gentamicina, etc.), solos o en combinaciones, facilitan la supresión del crecimiento de un tipo de bacterias o varias (ejemplo: medio Sabourea cloranfenicol con cicloheximida para hongos).

Algunos componentes permiten la diferenciación de los patógenos de forma específica según reacciones metabólicas que se expresan como cambios de pH, y en otros casos estas reacciones producen cambios de color en las colonias crecidas en medios cromogénicos.

Cada laboratorio debe realizar una vigilancia de la calidad de los medios de cultivo que utiliza, tanto de los preparados en el propio laboratorio (apariencia, crecimiento/inhibición, esterilidad) como de los que se adquieran comercialmente. El laboratorio debe solicitar al proveedor de medios de cultivo los certificados de los controles de calidad donde deben estar incluidas las características físicas y químicas que definen al medio de cultivo. Esos certificados deben conservarse en el laboratorio. Asimismo, se deberán realizar controles de calidad a los medios adquiridos comercialmente. Con este control no sólo se evalúa la conformidad del laboratorio con los medios que adquiere ya preparados, sino que también se evalúan las condiciones de procesamiento, estufas y atmósferas utilizadas. Para el control de los medios se deben utilizar preferentemente cepas de colección (ATCC, CECT u otras colecciones)

pero en el caso de no tener acceso a estas cepas se podrán utilizar cepas aisladas en el propio laboratorio con características perfectamente definidas.

8.2 REACTIVOS

Los reactivos utilizados en la fase de siembra de las muestras, comprenden aquellos que son necesarios para realizar los distintos pasos del procesamiento como el agua destilada, la solución salina, la tinta china, los sistemas generadores de distintas atmósferas de incubación, los reactivos comerciales necesarios para la realización de las técnicas rápidas usadas en el laboratorio o los empleados en las diferentes tinciones realizadas sobre las muestras.

Los reactivos empleados en la tinción de Gram se detallan a continuación:

1. Metanol absoluto, guardar en botella de cristal ámbar o contenedores de plástico
2. Violeta cristal
3. Solución de Iodo lugol
4. Decolorantes lentos: etanol 95% o intermedios: alcohol-acetona produce resultados más consistentes, pero se prefiere el etanol para estudiantes y personal menos experto mientras que la acetona es más rápida pero restringida a personal experto.
 - (1) Mezcla alcohol-acetona 50:50 en botella ámbar de cristal, etiquetar con caducidad de 1 año y conservar a temperatura ambiente. Ambos son inflamables.
5. Contratinción: safranina, carbol fuchina o fuchina básica (0.8, 0.1, o 0.2%)

Los reactivos pueden prepararse de forma casera o adquirirlos ya preparados comerciales. Deben usarse botes más pequeños para decantar los reactivos de las tinciones manuales diarias tanto del cristal violeta como de la safranina, pero deben reponerse mensualmente para evitar la formación de precipitados en los portaobjetos.

Existen teñidores automatizados disponibles en el mercado como el RAL stainer (bioMerieux), el Multistainer de Soria Melguizo o el PolyStainer de Direct Industry que permiten teñir entre 20 y 30 portas a un tiempo de forma eficiente y segura.

Tabla 6. Características de los sistemas totalmente automatizados del laboratorio de microbiología

Característica	Copan WASP Lab	BD Kiestra Total Lab	bioMérieux FMLA
Módulo central inoculación	WASP	InoqulA	Previ-Isola (*)
Inoculación integrada en cabina bioseguridad	No	Sí	Sí
Capacidad contenedor placas	378	720	270
Apertura y cierre automatizado del contenedor de muestra	Sí	Si	No
Agitación/vórtex muestra	Sí	Sí	No
Centrifugación muestra	Sí	No	No
Medios diferentes a usar en 1 m	9-18 (con 2 WASP)	12 (48 con 2 InoqulA)	5
Nº muestras máximo a cargar	72	288	114
Método de inoculación	Automático, asa metálica calibrada (1, 10 ó 30 ul) reutilizable /	Automático y manual Pipeta	Automático Pipeta
Nº placas inoculadas a la vez	1 sola placa biplaca con 2 asas	5 placas a la vez	1 sola placa y biplaca
Realiza extensiones para Gram	Sí	Sí	No
Inocula caldo en tubo	Sí (tubo Copan)	Sí	No
Rendimiento inoculaciones/hora	180	400	180
Inoculación manual de muestras especiales	No	Sí	Sí
Siembra/patrón siembra	Asa metálica reutilizable. Patrón estría central y zigzag de izquierda a derecha	Bola magnética en patrón circular por toda la placa	Peine con 16 asas plástico desechable patrón en espiral
Ordena placas según incubación	Sí	Sí	Sí
Colocación de discos automatizado	Sí de antibiograma o identificación (optoquina...)	No	No
Preparación de placa de MALDITOF	SI	SI	En desarrollo
Consumibles	Asas reutilizables	Puntas pipeta, bolas siembra	Peine siembra, puntas pipeta, apertura/cierre extra

* Ha cesado su distribución en España

Tabla 7. Recomendaciones de medios de cultivo y realización de Gram para muestras microbiológicas

Muestras		Gram	AS	ACH	MCK	TG/BHI	Otros
Abscesos		X	X	X	X	X	Medios anaerobios ¹
Biopsias		X	X	X	X	X	Medios anaerobios ¹
Biopsia gástrica		X	X				Agar <i>Helicobacter</i>
Catéter vascular			X				
Conexiones/piel pericatéter			X				
Genitales	Vaginal	X	X	X			Medios hongos ² Examen en fresco o Roiron Embarazadas ver <i>S. agalactiae</i>
	Endocervical	X	X	X			Thayer Martin
	Uretral	X	X	X	X		Thayer Martin
	Secreción prostática		X	X	X		Thayer Martin
	Rectal						Thayer Martin Embarazadas ver <i>S. agalactiae</i>
Heces							Caldo selenito <i>Salmonella-Shigella</i> o similar Campylobacter Sangre ampicilina
Heridas profundas, mordeduras, quemaduras, úlceras		X	X	X	X	X	Medios anaerobios ¹
Heridas superficiales		X	X	X	X	X	Medios anaerobios ¹
Líquidos estériles	LCR	X	X	X		X	
	Líquido pleural	X	X	X		X	BCYE Medios anaerobios ¹
	Líquidos: ascítico, peritoneal, pericárdico, sinovial	X	X	X	X*	X	Medios anaerobios ¹ *para ascítico y peritoneal
Ocular	Conjuntival		X	X			
	Líquido intraocular	X	X	X	X	X	Medios anaerobios ¹
Oído externo			X	X	X		
Timpanocentesis		X	X	X	X	X	
Orina (micción, sondaje)			X		X		Agar Cled
Orina (punción suprapúbica)		X	X	X	X		Medios anaerobios ¹
Tracto respiratorio inferior	Espuito	X	X	X	X		
	Traqueal	X	X	X	X		
	Broncoaspirado	X	X	X	X		BCYE
	Lavado broncoalveolar	X	X	X	X		BCYE
	Cepillado con telescopado	X	X	X	X		BCYE Medios anaerobios ¹
Tracto respiratorio superior	Aspirado sinusal	X	X	X	X	X	Medios anaerobios ¹
	Faringeo		X				Alternativa CNA
	Nasal		X				Agar manitol sal
Microorganismo							
<i>Bordetella pertussis</i>							
<i>Burkholderia cepacia complex</i>							
<i>Clostridium difficile</i>							
<i>Escherichia coli</i> O157H7							
<i>Helicobacter pylori</i>							
<i>Legionella</i> spp							
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>							
<i>Streptococcus agalactiae</i>							
<i>Vibrio</i> spp							
<i>Yersinia</i> spp							

1: medios para anaerobios: agar sangre para anaerobios (*Brucella agar*), agar feniletanol para anaerobios, agar sangre lacada-vancomicina-kanamicina (ASKVL), agar *Bacteroides bilis* esculina (BBE)

2: Agar Sabouread cloranfenicol, CHROM agar *Candida*

Abreviaturas: AS: Agar sangre; ACH: Agar chocolate; MCK: Agar MacConkey; TG/BHI: Caldo tioglicolato ó infusión cerebro-corazón de buey; BCYE: agar enriquecido para cultivo de *Legionella*; CNA: agar sangre colistina-ácido nalidíxico; CCFA: agar cicloserina-cefoxitina-fructosa-yema de huevo; TCBS: agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa; CIN: agar cefsulodina-irgasán; BCSA: agar selectivo *Burkholderia cepacia*

Tabla 8. Medios cromogénicos comercializados para aislamiento de diferentes microorganismos

Microorganismo	Medio	Casa comercial
<i>Acinetobacter</i> spp.	CHROMagar <i>Acinetobacter</i>	CHROMagar
<i>Candida</i> spp.	BD BBL™ CHROMagar™ <i>Candida</i> Medium	BD
	chromID <i>Candida</i>	bioMérieux
	CandiSelect	BioRad
<i>Clostridium difficile</i>	chromID <i>C. difficile</i>	bioMérieux
<i>Escherichia coli</i>	CHROMagar <i>E. coli</i>	CHROMagar
	BBL CHROMagar <i>E. coli</i>	CHROMagar
	Chromocult coliform agar ES	Merck
	Brilliance UTI Agar	Oxoid
	CHROMagar STEC	CHROMagar
	chromID CPS	bioMérieux
	HiCrome UTI Agar	Sigma-Aldrich
	UriSelect	Biorad
<i>E. coli</i> O157:H7	BBL CHROMagar O157	BD
	O157:H7 ID agar	bioMérieux
	Rainbow Agar O157	Biolog
	Colorex O157	Colorex
Enterobacterias productoras de BLEE y algunas especies de <i>Pseudomonas</i>	Brilliance ESBL Agar	Oxoid
	CHROMagar CTX	CHROMagar
	CHROMagar ESBL	CHROMagar
	chromID ESBL	bioMérieux
	Colorex ESBL	Colorex
Enterobacterias resistentes a carbapenemas	CHROMagar KPC	CHROMagar
	chromID CARBA agar	bioMérieux
	Colorex SuperCarba	Colorex
	Colorex KPX	Colorex
	chromID CARBA SMART	biomerieux
Enterococos resistentes a la vancomicina	CHROMagar VRE	CHROMagar
	Brilliance VRE Agar	Oxoid
	chromID VRE	bioMérieux
	VRESelect Medium	BioRad
	Colorex VRE	Colorex
<i>Listeria</i> spp.	CHROMagar <i>Listeria</i>	CHROMagar
	<i>Listeria monocytogenes</i>	International
	HiCrome <i>Listeria</i> Agar Base modified	Sigma-Aldrich
<i>Pseudomonas</i> spp.	CHROMagar <i>Pseudomonas</i>	CHROMagar
	chromID <i>P. aeruginosa</i>	bioMérieux
<i>Salmonella</i> spp.	CHROMagar <i>Salmonella</i>	CHROMagar
	Rainbow Agar <i>Salmonella</i>	Biolog
	CHROMagar <i>Salmonella</i> Plus	CHROMagar
	Brilliance <i>Salmonella</i> Agar	Oxoid
	chromID <i>Salmonella</i>	bioMérieux
	HiCrome RajiHans Medium	Sigma-Aldrich
	ChromID <i>Salmonella</i> / Hektoen	bioMérieux
<i>Staphylococcus</i> spp.	CHROMagar <i>Staphylococcus</i>	CHROMagar
	Brilliance Staph 24 Agar	Oxoid
	chromID <i>S. aureus</i>	bioMérieux
	<i>Staphylococcus aureus</i> agar, HiCrome	Sigma-Aldrich
	<i>S. aureus</i> ID	bioMérieux
<i>S. agalactiae</i>	CHROMagar StrepB	CHROMagar
	chromID Strepto B	bioMérieux
	STREP B SELECT	BioRad
	BD Group B <i>Streptococcus</i> Differential Agar (Granada) no cromogénico	BD
	Brilliance GBS agar	Oxoid
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	CHROMagar MRSA	CHROMagar
	Brilliance MRSA Agar	Oxoid
	chromID MRSA	bioMérieux
	HiCrome MeReSa Agar with methicillin	Sigma-Aldrich
	MRSASELECT II	BioRad
<i>Vibrio</i> spp.	chromID <i>Vibrio</i>	bioMérieux
	CHROMagar <i>Vibrio</i>	CHROMagar

9. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El laboratorio debe establecer un sistema de priorización en el procesamiento de las muestras, en función de criterios previamente definidos (demanda del clínico, carga asistencial y asistencia continuada). Esta prioridad se puede establecer en función del tipo de muestra y del criterio facultativo, aunque en general siempre se deben procesar primero los LCR, las muestras de líquidos y cavidades estériles, las muestras quirúrgicas y los tests rápidos de detección antigénica, en este orden. A este grupo le siguen muestras con un tiempo limitado de procesamiento como son el cultivo de micobacterias o las pruebas para detección de ácidos nucleicos y las muestras de tejidos o aspirados recientes. Las muestras de heces deben enviarse en medio de transporte si el procesamiento no puede realizarse en un periodo de tiempo entre 30 minutos y una hora. La lista de procesamiento prioritario puede ajustarse a las necesidades de los servicios médicos y quirúrgicos asistenciales y también en función del tipo de laboratorio.

Tabla 9. Ejemplo de lista de priorización del procesamiento de muestras

1. Cualquier muestra requerida de forma urgente por personal médico (urgencias, UCIs...)
2. Cultivo de LCR y tinción de Gram
3. Muestras quirúrgicas (intraoperatorias)
4. Pruebas rápidas de detección antigénica o de ácidos nucleicos
5. Muestras que requieren tiempos de procesamiento especial adicionales
6. Muestras respiratorias tomadas por procedimiento invasivo o despistaje con tinción de Gram
7. Hemocultivos
8. Muestras de tejido y aspirados
9. Heces frescas sin medio de transporte (deben transferirse a un medio transporte)
10. Muestras de orina
11. Torundas en medio de transporte
12. Heces en medio de transporte

El procedimiento de siembra ha tenido muchas variantes realizadas en función del objetivo primordial del cultivo que es aislar e identificar con la mayor rapidez y certeza la presencia de un agente patógeno. No todas las muestras se siembran de igual forma, para la mayoría se realiza el tipo de siembra en "aislamiento", pero para las muestras respiratorias invasivas o la orina consideradas especiales por la necesidad de cuantificar la carga microbiana, se realiza una siembra en "recuento". Además, en la orina se pueden realizar técnicas de despistaje de infección (manuales o automáticas basadas en citometría de flujo y/o análisis de imagen) que permiten reducir el número de muestras para cultivar con una buena sensibilidad (>95%).

En el laboratorio se debe someter a la muestra a un procesamiento en función de sus protocolos de trabajo y de la información que aporta el servicio solicitante sobre la muestra y el paciente. Así el procesamiento dependerá de varios factores:

1. Petición del servicio solicitante
2. Tipo de muestra y su origen anatómico
3. Técnica de obtención
4. Diagnóstico del paciente/enfermedad de base
4. Motivo de petición
5. Cualquier otra información aportada en el volante de la petición o petición electrónica

Como se ha indicado anteriormente, algunas muestras se deben procesar inmediatamente a su llegada al laboratorio e inocular en los medios de cultivo sin demora, ya que un retraso en estos procedimientos puede afectar a la calidad de la misma y al grado de recuperación de microorganismos.

Las muestras urgentes, especialmente líquidos estériles, LCR y muestras de quirófano deben procesarse en 20 minutos tras su recepción. Las muestras de exudados para cultivo de *N. gonorrhoeae* sobre todo si se reciben sin medio de transporte requieren un procesamiento rápido, antes de 20 minutos, al igual que las muestras de lavados broncoalveolares. A continuación, tienen preferencia las muestras de biopsias de tejido, abscesos y fluidos que se deben procesar en 1 hora tras su recepción. Las muestras de heces frescas (para *Shigella* spp.) si no se inoculan en medio de transporte, deben sembrarse antes de 30 minutos tras su recepción. Los esputos y otras muestras respiratorias pueden permanecer 1 hora

a temperatura ambiente y 2 horas si se conservan a 4°C sin que pierdan viabilidad los microorganismos. Los hemocultivos pueden mantenerse hasta 4 horas a temperatura ambiente tras su recepción. Las torundas con medio se deben procesar antes de 8 horas tras su recogida y conservarse la mayoría a 4°C, de igual modo que los exudados para cultivo de estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A y B; finalmente, las muestras de orina pueden conservarse hasta 8 horas a 4°C tras su recepción antes de sembrarse. Todas las muestras deben procesarse en cabinas de bioseguridad, según el nivel de bioseguridad del laboratorio.

9.1 MÉTODOS CONVENCIONALES: CULTIVO

La selección de los medios para aislamientos primarios se convierte en un paso crucial del procesamiento de una muestra y de ello depende que se puedan recuperar todos los agentes etiológicos posibles en la muestra estudiada. Los más usados son el agar sangre y el agar chocolate que son medios no selectivos, el agar MacConkey y el Levine o agar EMB (Eosin-methylene blue) como medios selectivos de bacilos Gram negativos y el agar CNA (con colistina y ácido nalidíxico) como medio selectivo de cocos Gram positivos. Entre los medios líquidos destacamos el caldo de tioglicolato y el BHI (Brain Heart Infusion). Tanto si se realizan medios preparados en el laboratorio o comerciales, hay que realizar controles con cepas de referencia para asegurar su eficiencia en la recuperación de los diferentes patógenos. Los medios de cultivo recomendados para el procesamiento de las principales muestras se detallan en las tablas 7 y 8 del presente documento.

Se deben establecer, controlar y revisar las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, etc.) de los medios de cultivo. El laboratorio debe establecer la periodicidad (semanal, mensual, trimestral, etc.) con la que debe revisar los materiales almacenados (cantidad, caducidades, estado general) con el fin de comprobar el estado de los mismos, verificando su correcta ubicación en los espacios identificados y definidos para ellos en el almacén, así como su aptitud para el uso.

Para muestras que deban seguir un procesamiento habitual hacia el cultivo (más allá de las técnicas rápidas y de las técnicas de biología molecular), el procesamiento automatizado y la siembra, acompañados de la mejora del examen microscópico, ha reducido tiempo y mejorado la eficiencia de los laboratorios, asociado al uso de la espectrometría de masas que permite hoy en día una

identificación más rápida y precisa.

Dentro del procesamiento de las muestras que llegan al laboratorio de Microbiología, podemos establecer 4 fases bien diferenciadas: fase de pretratamiento, inoculación de los medios de cultivo, preparación de las extensiones y finalmente la incubación, que se deben llevar a cabo en este orden y que se desarrollarán en profundidad en el documento técnico PNT-RTPM 01 de este procedimiento.

9.1.1. Fase de pretratamiento de la muestra

No todas las muestras que se procesan necesitan esta fase. En muestras como orinas o exudados faríngeos, su siembra se hace de manera inmediata sobre los medios de cultivo sin tener que realizar ninguna preparación previa. Cuando esta es necesaria, existen distintas técnicas como la centrifugación o la homogenización, entre otras, que se aplicarán dependiendo del tipo de muestra y de la solicitud realizada. Los detalles de este proceso se incluyen en el documento técnico PNT-RTPM- 01 de este procedimiento.

9.1.2. Inoculación en los medios de cultivo

La calidad de una buena inoculación y siembra de la muestra es de suma importancia para conseguir un óptimo aislamiento de colonias en muestras monomicrobianas y sobre todo en muestras polimicrobianas, para facilitar la rápida identificación del patógeno y su perfil de sensibilidad antibiótica.

Se aconseja inocular primero los medios menos selectivos para evitar que se arrastre alguna sustancia inhibitoria a otro medio. Los medios se seleccionarán según el tipo de muestra (tabla 7) y la sospecha diagnóstica del posible agente causal a detectar (bacterias, anaerobios, hongos...). Es necesario procesar primero las muestras para anaerobios (mejor en campana de anaerobios si se dispone). No se deben homogeneizar las muestras que se procesen para hongos, ya que este procedimiento altera la viabilidad en el cultivo de determinados hongos no septados, sino cortar en pequeños trozos con la ayuda de un bisturí e inocular directamente sobre los medios de cultivo.

La siembra manual se realizará utilizando la técnica de aislamiento para la mayoría de las muestras y la técnica de recuento para aquellas que necesitan un conteo de colonias (por ejemplo, orina). Opcionalmente en caso de inocular placas de exudados faríngeos para detectar beta-hemólisis, se puede hundir el asa levemente en el agar para dejar al microorganismo en condiciones anaeróbicas.

Existen otras estrategias de siembra específicas para recuperar determinados patógenos inoculando estrías de otros (estafilococos para *Haemophilus* spp. o *Listeria* spp).

9.1.3 Preparación de las extensiones

Los portaobjetos deberán estar limpios y desengrasados antes de su uso (se puede utilizar una solución de lavado con etanol al 95%). Son preferibles los que tienen un extremo rugoso para poder identificar o etiquetar la información de la muestra. Las extensiones, así como la siembra, se realizarán en cabina de bioseguridad.

Para las extensiones en fresco, se debe preparar una monocapa densa, pero a la vez extendida, de forma que se pueda ver un texto a través de ella. Es necesario realizar extensiones para tinción de Gram de la mayoría de las muestras respiratorias y exudados de heridas, de muestras de orígenes normalmente estériles y de muestras de orina y genitales según petición. La tinción de Gram no se debe realizar en muestras nasales, faringo-amigdalares, heces ni puntas de catéter.

En caso de muestra insuficiente se priorizará el cultivo sobre la tinción. Se recomienda utilizar portas estériles siempre que sea posible, de lo contrario, el cultivo debe inocularse siempre primero para evitar contaminaciones de las placas si previamente se ha utilizado la misma asa sobre un portaobjetos no estéril. También se pueden utilizar pipetas o asas estériles desechables para realizar las extensiones sobre el portaobjetos y poder dar una información rápida y precisa. En el caso de líquidos estériles, en especial el LCR, se recomienda citocentrifugar la muestra para preparar las extensiones.

9.1.4. Incubación

La incubación de las muestras se realiza en estufas o jarra de incubación que mantendremos a distintas temperaturas y/o atmósferas según los microorganismos que pretendemos recuperar.

9.1.4.1. Temperatura

- La mayoría de los cultivos bacterianos se incuban a 35°C-37°C. Excepciones a estos, son los cultivos de piel y tejidos blandos, con sospecha de contener *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae* y *M. haemophilum*, que crecen a temperaturas óptimas más bajas. Para estas muestras, es necesario cultivar por duplicado en los medios necesarios e incubar a 25°C-33°C. Los nuevos sistemas de cultivo en medio líquido automatizados no permiten la incubación a temperaturas inferiores a 36±1° C.

- El aislamiento de *Campylobacter* spp. en heces requiere una temperatura de incubación de 42°C y 35°C (*Campylobacter fetus*).

- La temperatura de incubación de los cultivos para estudio de hongos puede variar desde 28°C a 37°C, pero generalmente se incuban a 30°C. Sin embargo, cuando se sospecha una micosis por hongos dimórficos se sugiere incubar 2 conjuntos de placas o tubos, uno a temperatura ambiente (25-28°C) y otro a 35-37°C.

9.1.4.2. Atmósferas de incubación

- Aerobiosis, atmósfera rica en oxígeno.

-Atmósfera enriquecida con 5-7% de CO₂: esta atmósfera habitualmente se consigue con estufas o incubadores que tienen una bandeja de humidificación y controlan la presión de CO₂ con un dispositivo de monitorización que extrae el aire de la incubadora en una cámara de muestra, determina la concentración de CO₂ e inyecta CO₂ puro en la estufa para mantenerlo en los niveles programados. También se puede obtener esta atmósfera a través de reactivos comercializados que se incuban con las placas Petri en jarras de incubación.

- Atmósfera microaerofílica para el aislamiento de *Campylobacter* spp. y *Helicobacter pylori*: 5% de O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂. Utilizamos habitualmente los reactivos comercializados que generan esta atmósfera para incluir en las jarras de incubación.

- Atmósfera de anaerobiosis: esta atmósfera se obtiene colocando las placas de Petri en jarras de incubación en las que se logra una atmósfera libre de oxígeno por medios químicos a través de unos sobres preparados y comercializados. Existen también bolsas de plástico en las que caben 1-2 placas y la atmósfera de anaerobiosis también se consigue de la misma manera. En algunos casos existen estufas semejantes a las convencionales que cierran herméticamente, en las que puede efectuarse la anaerobiosis con facilidad mediante dispositivos automáticos que extraen el aire y lo sustituyen por mezclas gaseosas.

9.1.4.3. Duración de la incubación

El tiempo de incubación dependerá en gran parte de las diferentes solicitudes (bacterias, micobacterias, hongos, virus) ya que los tiempos de recuperación de los distintos microorganismos pueden ser diferentes. De manera general para el cultivo bacteriológico ordinario la mayoría de las muestras en el laboratorio se deben mantener al menos durante 48 h excepto las muestras de orina que se incuban habitualmente durante 24 h.

Algunas muestras de heridas, líquidos estériles o material protésico hay que mantenerlas en incubación hasta 7-10 días para recuperar microorganismos de lento crecimiento como *Propionibacterium* spp., e incluso 12 semanas si se sospecha *M. ulcerans*. En el caso de los cultivos de hongos la duración variará en función de la sospecha clínica, cuando ésta es para los más habituales como *Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Cryptococcus* spp o *Fusarium* spp, se mantienen durante 7 días, pero algunos hongos dermatofitos y dimórficos (*Histoplasma* spp) requieren periodos más prolongados y se incuban hasta 3-4 semanas.

9.2. SIEMBRA AUTOMATIZADA. AUTOMATIZACIÓN DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

El trabajo del laboratorio de Microbiología es laborioso y muchas veces se realiza de forma manual casi por completo, lo que hace que la calidad dependa de la experiencia y habilidad de los técnicos en cada uno de los momentos y etapas del procesamiento microbiológico de las muestras. Se ha calculado que un 24% del tiempo de los técnicos en el proceso de preanalítica se invierte en la inoculación de las muestras en los medios de cultivo. La propia diversidad de muestras y las distintas pruebas que se pueden solicitar sobre ellas, ha complicado la posibilidad de ensamblar un mismo proceso donde todo encaje y hasta ahora había imposibilitado los intentos de automatización en microbiología. Desde la aparición en los años 1970 de los autoinoculadores, actualmente existen varios modelos de sembradores automáticos capaces de inocular la muestra y sembrarla, de destapar y tapar los contenedores, de etiquetar las placas a inocular, de inocular medios de enriquecimiento y de preparar las extensiones a teñir. Las ventajas de utilizar estos procesadores radican en la mejora de la trazabilidad, la reducción de errores humanos en el etiquetado, menos riesgo de accidentes al manipular las muestras, ahorro de tiempo de los técnicos de laboratorio que pueden dedicarse a otras actividades, ahorro de tiempo análisis-resultado, ahorro económico y ventajas al obtener una mayor rapidez en el diagnóstico etiológico y en el informe de sensibilidad antibiótica para los pacientes. Sin embargo, también hay que contemplar algunas desventajas de estos sistemas automatizados, como son la dependencia de servicios técnicos, la necesidad de un mantenimiento generalmente caro, la posibilidad de contaminaciones no deseadas en varias fases del sistema, la limitación sobre especies microbianas inusuales o de difícil identificación y la necesidad de compromiso de todo el personal técnico y facultativo del laboratorio en su funcionamiento.

En el terreno estricto de los procesadores automáticos, se analizan a continuación los siguientes: 1) InoqulA, que forma parte de la plataforma BD Kiestra; 2) WASP, que forma parte del sistema Copan WASP lab; 3) PREVI Isola,

que forma parte de la plataforma FMLA de BioMerieux.

- El sembrador InoqulABD (4 m ancho x 1 m alto) tiene la mayor capacidad, 612 placas y puede cargar 12 tipos de medios diferentes. Es capaz de procesar diferentes tipos de envases de muestras con apertura y cierre automatizado. Inocula la muestra utilizando una pipeta calibrada (con sistema de extracción de burbujas) pero dispone de un modo manual interactivo para inocular muestras de tejido, puntas de catéter y otras muestras no líquidas o que no se puedan sembrar utilizando el sistema automatizado. El sistema de siembra por bola magnética permite sembrar hasta 400 placas en 1 hora en un patrón circular que aprovecha mejor el espacio. Este sistema permite sembrar 5 placas simultáneamente. El inconveniente es que las bolas se deben esterilizar antes de reutilizarlas, pero dispone de un dispensador automático de bolas y un contenedor de bolas extraíble y autoclavable, lo cual requiere un mantenimiento manual de rutina algo más laborioso. Es capaz de incubar placas en anaerobiosis y posee filtro Hepa interno para eliminar las partículas del aire que puedan contaminar las placas y las muestras.

- El sembrador WASP (Copan) ocupa poco espacio (2 m ancho x 1,1 m fondo x 2 m alto) y consta de dos robots que funcionan de forma independiente para recibir la muestra, seleccionar los medios a sembrar cada muestra, agitar, abrir el contenedor e inocular y volver a cerrar y transferir la muestra y el medio inoculado a una fila de muestras "procesadas". También posee un filtro Hepa interno. El sistema lee la etiqueta de la muestra y reconoce de qué tipo es y etiqueta las placas de Petri inoculadas, también reconoce el protocolo a utilizar y selecciona el asa conveniente. Utiliza dos asas metálicas, que mientras una inocula y siembra, la otra es incinerada para ser reutilizada, y de este modo reduce costes sin riesgo de contaminaciones cruzadas. Las asas pueden sembrar hasta 15.000 placas antes de tener que cambiarse. La presencia de un carrusel donde almacena los medios líquidos inoculados y de 4 dispensadores para antibiograma proporciona un plus de versatilidad y funcionalidad. Su rendimiento se evaluó de forma positiva por primera vez en el año 2009 comparándolo con la siembra manual e igualándose al Inoculab (predecesor del InoqulA).

Merece destacar que existen estudios comparativos recientes de estos dos procesadores entre sí y con la siembra manual. En estos trabajos, el sistema WASP (con siembra de 1 µL y de 10 µL) produjo mayores recuentos de colonias que el InoqulA pero el patrón de siembra del InoqulA resultó mejor cuando se sembraban orinas con recuentos superiores o iguales a 10⁵ UFC/ml, ya que dejaba las colonias más separadas y facilitaba el aislamiento de colonias sin necesidad de realizar subcultivos en ninguna de las muestras procesadas (ahorro de 5,8 euros por reaislamiento). Las diferencias

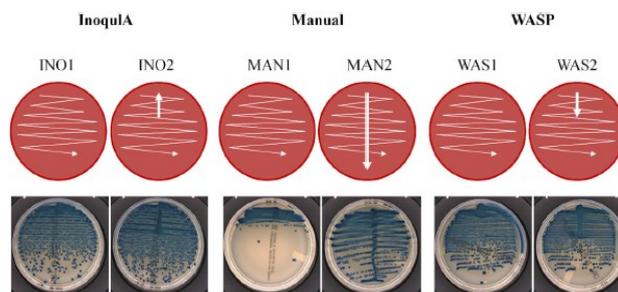
entre ambos sistemas pueden estar relacionadas con el modo de inoculación de ambos: el WASP con asa 1 μL penetra a una profundidad fija en el tubo de transporte dependiendo de su volumen (4-10 ml) y en el InoquIA la punta de pipeta profundiza 15 mm en la muestra gracias a un sensor que detecta el menisco de la muestra. En el trabajo de Croxato y cols. (JCM 2015), inoculando el mismo volumen (10 μL) de orina en medio cromogénico y mediante análisis de imagen, se confirmó la superioridad de los dos sistemas automatizados respecto a la siembra manual de muestras de orina con recuentos altos 10^7 - 10^8 , pero no cuando los recuentos eran bajos. Con el InoquIA se obtuvo un mayor número de colonias aisladas que con el WASP y hubo que realizar menos subcultivos. Ningún sistema consiguió buenos aislamientos en muestras polimicrobianas para especies bacterianas con recuentos 10 veces inferiores a los de la población más concentrada.

También se han evaluado y confirmado las ventajas de la siembra del urocultivo por WASP respecto a la siembra manual convencional. En un trabajo de Quiblier y cols. (JCM 2016), la mejor diferenciación de colonias en muestras con recuentos superiores o iguales a 10^4 o 10^5 ufc/ml se obtenía con el patrón de siembra de 27 líneas en zig-zag en vez de con el patrón de 11 líneas.

En este sistema, el procesador puede unirse al sistema WASP-FLO capaz de introducir y ordenar las muestras en lotes según el tipo, y tras la siembra, distribuir las placas sembradas en diferentes incubadoras con su correcta temperatura y atmósfera de incubación según el protocolo. Además, del mismo modo que el Kiestra BD, este sistema incorpora un sistema ID de identificación presuntiva por análisis de imagen con video y cámara que realiza una fotografía en tiempo 0 y otra tras la incubación permitiendo un trabajo sobre las colonias mucho más rápido, seguro y eficaz.

- El sistema PREVI Isola (bioMérieux) (1,7 m ancho x 1,5 m fondo x 0,9 m de alto) acomoda 150 placas y 5 tipos de medios diferentes. Siembra mediante un peine aplicador de un solo uso en un patrón único, abarcando la mayor superficie del agar gracias a sus 16 asas simultáneas que permiten una gran separación de las colonias en las placas de cultivo. Una gran desventaja es la necesidad de abrir y cerrar los envases de las muestras manualmente. Actualmente está en desarrollo la solución a este problema, del mismo modo que la posibilidad de inocular la placa de MALDI-TOF directamente y trabajar incorporando el módulo Vitek2 de identificación dentro del sistema FMLA totalmente automatizado. No obstante, este sistema ya no se comercializa en España.

Figura 10. Ejemplos de técnica de siembra manual y automatizada (InoquIA BD, WASP Copan)



Modificada de Croxato A. et al. JCM 2015; 53(7):2298-2307

9.3 TÉCNICAS RÁPIDAS

El desarrollo de las técnicas rápidas en Microbiología se inició con el propósito de poder acelerar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, tratando de superar algunos de los inconvenientes, especialmente la lentitud, de las técnicas convencionales como el cultivo. Eso ha hecho que se desarrollen distintos métodos diagnósticos que nos permiten ofrecer una información rápida y precisa, con implicación clínica en la evolución del paciente.

9.3.1. Examen directo o tinciones

Las tinciones en Microbiología son las primeras herramientas que se utilizan en el laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Algunas de estas técnicas existen en realidad desde el siglo XIX y hoy en día, siguen siendo una parte esencial en el diagnóstico microbiológico en la práctica totalidad de los laboratorios de Microbiología. La tinción de Gram es probablemente la más utilizada, es un procedimiento rápido (minutos) pero plantea problemas de sensibilidad y especificidad, aunque sigue siendo una herramienta muy valiosa sobre todo realizada por profesionales expertos y en determinadas muestras (LCR).

Otras tinciones utilizadas son: la tinción de Zhiel-Neelsen y la auramina para visualizar bacilos ácido alcohol resistentes, Giemsa o Field para teñir parásitos, o blanco de calcoflúor y plata-metenamina para estudio de hongos. Destacar la utilidad del examen en fresco para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*, el estudio con KOH para visualizar estructuras fúngicas, y el estudio mediante campo oscuro para el diagnóstico de *Treponema pallidum*.

9.3.2. Basadas en reacciones antígeno-anticuerpo.

Las técnicas inmunológicas de detección de antígenos se fundamentan en la afinidad antígeno-anticuerpo y permiten detectar la presencia de microorganismos o fragmentos de los mismos en las muestras clínicas. Son técnicas especialmente útiles en aquellos casos en los que el microorganismo causal crece lentamente o no crece en los medios de cultivo. Además, los resultados de los mismos no se ven alterados por la administración previa de antimicrobianos. Como inconvenientes principales de las mismas cabe destacar que no ofrecen información sobre la sensibilidad del microorganismo detectado a los antimicrobianos, y que en algunos casos no han alcanzado los niveles de sensibilidad y especificidad deseados.

9.3.2.1. Inmunocromatografía.

Sobre una membrana de nitrocelulosa o nylon se encuentran absorbidos en la línea de reacción anticuerpos frente al antígeno que buscamos y sobre la línea control están absorbidos anticuerpos anticonjugado, de forma que cuando la muestra contiene antígeno, este fluye por la membrana quedando retenido en la línea de reacción. El conjugado, que también es un anticuerpo específico frente al antígeno que se busca, está marcado con una molécula de oro coloidal, que también fluye por la membrana, y queda retenido por el antígeno en la línea de reacción y por el anticuerpo en la línea control. En el caso de muestras negativas que no contienen antígeno, el conjugado queda retenido únicamente en la línea control. Estas técnicas son rápidas, obteniéndose resultados en 10-30 minutos. Buen ejemplo de tests inmunocromatográficos (ICT) son: la detección del antígeno (Ag) polisacárido capsular de *S. pneumoniae* y del antígeno soluble del serogrupo 1 de *Legionella pneumophila* en orina, las técnicas de detección cualitativa simultánea de Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus y Norovirus en un mismo test sobre muestras de heces semilíquidas (125 mg) o líquidas (125 µL), las técnicas para la detección de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. igualmente en heces, las de detección de antígeno de grupo A de *Streptococcus pyogenes*, el test de detección de la proteína F de fusión del Virus respiratorio sincitial (VRS), el de detección de *Helicobacter pylori* (aunque no distingue colonización de infección), la prueba de detección cualitativa de antígenos de *Plasmodium* spp. circulantes en sangre venosa, centrada en el antígeno de la proteína rica en histidina II (HRPII) específica de *Plasmodium falciparum* y un antígeno panmalárico común a *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. (no detecta *P. knowlesii*), entre otros. En el caso de los sistemas de detección de *Plasmodium* spp., los diferentes sistemas presentan porcentajes de detección variable según el grado de parasitemia y la especie, y es importante definir cuál elegir en función de la ausencia

de falsos positivos: una cifra lo más cercana al 95% con parasitemias bajas (200/µL) o al 100% con parasitemia alta (2.000-5.000/ µL) y el precio.

En enero de 2016 se ha publicado la mejora definitiva de un test inmunocromatográfico en tira para detección de dermatofitos en muestras ungueales: el Dermatophyte test strip que utiliza anticuerpos monoclonales específicos frente al polisacárido de la pared celular de los dermatofitos (frente a siete especies de dermatofitos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis* y *Epidermophytum floccosum*). Este test desarrollado en Japón a partir de 2008, presenta una sensibilidad del 98% y una especificidad del 78%. Los primeros trabajos publicados se realizaron sobre muestras ungueales, comparando este test con la microscopia directa y la PCR para resolver discrepancias, y se obtuvo una concordancia global del 89% (99% concordancia positiva / 78,9% concordancia negativa). El test utiliza *Trichophyton rubrum* como control positivo, se puede realizar sobre muestras tratadas con antifúngicos, requiere un mínimo de 1 mg de muestra de uña, un pretratamiento en 250-500 µL de buffer de extracción, y los resultados están disponibles entre 5 y 30 minutos del procesamiento (positivo: raya color púrpura). El test no es válido para tinea pedis por los resultados falsos negativos y falsos positivos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.) obtenidos previamente.

9.3.2.2 Enzimoinmunoanálisis (EIA)

Normalmente la detección tiene lugar en placas de poliestireno, donde los anticuerpos específicos están inmovilizados sobre la superficie de los pocillos. Estos anticuerpos retienen a los antígenos presentes en la muestra y su presencia se revela posteriormente mediante la utilización de anticuerpos también específicos del antígeno conjugados con enzimas. Estas enzimas provocan un cambio de color al interaccionar con el sustrato específico. Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa que actúan sobre el p-nitrofenil fosfato y el agua oxigenada, respectivamente, de forma que en este tipo de EIA, a mayor intensidad de color mayor cantidad de antígeno fijado al pocillo. Las técnicas de EIA que tienen como conjugado un anticuerpo marcado con un isótopo radioactivo están en desuso.

La técnica de referencia para la detección de antígenos víricos en muestras respiratorias sigue siendo la inmuno-fluorescencia ya sea directa o indirecta. En la actualidad existen técnicas de EIA y de ICT para los Virus de la gripe A y B, para el Virus respiratorio sincitial y para Adenovirus. Los resultados obtenidos mediante ICT son equiparables con los obtenidos con las técnicas de EIA en sensibilidad y especificidad,

sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas con respecto a la inmunofluorescencia, es menor. Hoy en día se dispone de EIA rápidos de membrana (tipo “jaboneras”) para el diagnóstico de las infecciones producidas por *Clostridium difficile*, detectando el antígeno GDH (glutamato deshidrogenasa) solamente o simultáneamente con las toxinas A y B en muestras fecales. En este último caso se trata de un EIA tipo sándwich (anticuerpos-biotina forman complejo con el antígeno), con detección por fluorescencia que emite el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina. Presenta una sensibilidad 88% y una especificidad del 99,5%.

9.3.3 Basadas en detección de ácidos nucleicos

Las técnicas moleculares (PCR, microarrays y secuenciación de ácidos nucleicos) están jugando actualmente un papel principal en la detección e identificación de microorganismos patógenos y como ayuda en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas. Algunas de las primeras técnicas desarrolladas (detección directa por sondas de ácidos nucleicos) están siendo sustituidas por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos y se están comercializando en formatos cerrados, automatizados, de fácil manejo, cercanos al paciente (tipo *point of care*) y de emisión muy rápida de resultados. Cada vez se amplían más los menús de estas plataformas que abarcan la detección de múltiples agentes y que conducen a una mejora en el rendimiento, en los tiempos de respuesta y en el coste-efectividad de la aplicación de esta tecnología en los laboratorios de Microbiología.

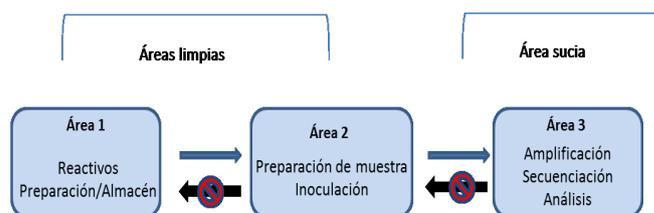
Al mismo tiempo, otros métodos moleculares adicionales como los secuenciadores de nueva generación y las pruebas basadas en la proteómica se han introducido en el diagnóstico microbiológico y están acelerando la transición entre el diagnóstico convencional al diagnóstico molecular. La detección molecular de patógenos gastrointestinales o la identificación por secuenciación o la epidemiología por tipado molecular, son ejemplos de la aceleración que se está llevando a cabo en este campo.

Como en todo laboratorio de diagnóstico molecular es importante asegurar un flujo de trabajo correcto, libre de amplicones y de contaminaciones cruzadas que puedan paralizar la emisión de resultados fidedignos (figura 11). Un buen diseño de los espacios y las áreas de preparación de reactivos y almacén (área 1), preparación de muestras (área 2), amplificación (área 3), cuidado en el flujo de trabajo unidireccional (nunca pasar material de la zona de amplificación a las zonas limpias 1 y 2) y la atención a las medidas para evitar y detectar las contaminaciones, asegura unos resultados de alta calidad.

El uso de cabinas de luz ultravioleta, el uso de

guantes, bata y frecuencia de cambio de los mismos, disponer de pipetas en cada área, puntas con filtro, sistemas automatizados de inoculación, sistemas cerrados de amplificación y en cada prueba introducir controles negativos y controles de contaminación, son los requisitos mínimos para realizar un diagnóstico molecular con garantías.

Figura 11. Esquema del flujo de trabajo unidireccional en el laboratorio de Microbiología Molecular



Modificado de Leber AL. 2016. Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 1-3. American Society for Microbiology Washington, D.C

Entre las técnicas de microbiología molecular, se han desarrollado técnicas rápidas de detección de los principales patógenos causantes de infecciones graves como bacteriemia o meningitis. Así, existen pruebas de hibridación de ácidos nucleicos que mediante sondas identifican los microorganismos presentes en los hemocultivos como el panel del sistema Nanosphere Verigene que es capaz de detectar 12 bacterias y 3 mecanismos de resistencia (incluyendo SAMR) con un 90-95% de concordancia con los hemocultivos pero 40 horas antes. De gran aceptación en los laboratorios de Microbiología son los sistemas de PCR a tiempo real (RT-PCR) que utilizan cebadores específicos y secuencias en sondas para amplificar el ADN diana de múltiples microorganismos.

Entre ellos se incluyen:

- el sistema GeneXpert (Cepheid) para detección de *M. tuberculosis* en muestra respiratoria, diferenciación de *S. aureus* sensibles y resistentes a la metilicina en hemocultivos y heridas, detección de cepas de *C. difficile* toxigénico/O27 en heces, o de la presencia de enterobacterias productoras de diferentes tipos de carbapenemasas.
- el sistema FilmArray (Biofire) que presenta paneles de diagnóstico cualitativo de ácidos nucleicos para múltiples bacterias, virus y levaduras capaces de producir bacteriemia como *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y otros *Staphylococcus* spp., *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, otros estreptococos, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter*

Tabla 10. Resumen de las principales características de algunos de los sistemas de microbiología molecular.

Comercial	Plataforma	Tecnología	Capacidad	Sistema	Nivel automatización	Carga trabajo	Tiempo/manual
Cepheid	GeneXpert	PCR tiempo real sondas de detección fluorescentes	Hasta 6 canales de detección fluorescencia	Cerrado	A demanda, acceso aleatorio Dilución previa de la muestra antes de cargar	Variable hasta 16 módulos. Infinity 48 u 80 módulos	1 hora <1' por muestra
BD diagnostics	BD Max	PCR tiempo real sondas de detección fluorescentes	Hasta 6 canales de detección fluorescencia	Abierto	Trabajo por lote inocular muestra, cargar tiras reactivo y cartucho	Procesa 24 muestras simultáneamente	2-5 horas 15-30' las 24 muestras
Nanosphere	Verigene	PCR múltiple más detección microarrays son sondas en nanopartículas	Microarray 400 sondas de captura	Cerrado	A demanda, acceso aleatorio	Variable, un solo lector puede acomodar 32 procesos	2-2,5 horas 1-2' por muestra
BioFire	FilmArray	Nested PCR en dos etapas	100 micropocillos	Cerrado	A demanda acceso aleatorio Dilución previa	Variable según nº analizadores cada uno-1 CPU	1 hora 5' de premanual
Roche	Cobas Amp	PCR múltiple más detección por sondas fluorescentes	Hasta 4 canales de detección fluorescencia	Abierto	Totalmente automatizado muestra-resultado	Lote de 96 muestras simultáneas	4-5 horas Lote completo 96 muestras
Abbot	M2000	PCR múltiple más detección por sondas fluorescentes	Hasta 4 canales de detección fluorescencia	Abierto	Totalmente automatizado muestra-resultado	Lote de 96 muestras simultáneas	3-4 horas 1 h las 96 muestras

cloacae complex, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Proteus spp., Serratia marcescens, H. influenzae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis complex, y C. tropicalis, así como las dianas que codifican mecanismos de resistencia *mecA, vanA/vanB, y blaKPC*, y un panel para diagnóstico (detección e identificación simultánea) de agentes específicos de meningitis o encefalitis en LCR como *E. coli K1, H. influenzae, L. monocytogenes, S. agalactiae, S. pneumoniae, N. meningitidis, Citomegalovirus, Enterovirus, Virus del herpes simple 1 y 2, Herpesvirus 6, Parechovirus, Virus varicella-zóster y Cryptococcus neoformans*. Por último, otro sistema basado en la caracterización de ácidos nucleicos que está mejorando los resultados del uso racional y optimización del tratamiento de las bacteriemias en los hospitales es el PNA-FISH (AdvanDX), técnica de hibridación de ARN ribosómico de microorganismos específicos con sondas péptidos de ácidos nucleicos (PNA) con detección *in situ* con microscopio de fluorescencia (FISH). La duración para la realización

de la técnicas es inferior a dos horas, se puede utilizar sobre hemocultivos y líquidos peritoneales y detecta y diferencia diferentes microorganismos según la fluorescencia (roja, verde, amarilla), entre ellos *S. aureus* de estafilococos coagulasa-negativa, *E. faecalis* de *E. faecium, C. albicans / C. parapsilosis complex* de *C. tropicalis* y *C. glabrata/krusei*, y *E. coli* de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. En la tabla 10 se resumen las principales características de los sistemas de microbiología molecular.

10. ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS TRAS SU PROCESAMIENTO

De forma general, el almacenaje de las muestras procesadas debe incluir el tiempo suficiente para resolver cualquier tipo de reclamación o poder ampliar alguna petición por parte del clínico responsable o del microbiólogo que está procesando la muestra. La orinas y muestras de heces pueden guardarse entre 2 y 4 días a 4°C, al igual que las muestras no estériles. Sin embargo, las muestras procedentes de sitios estériles deben guardarse un mínimo de 7 días a 4°C, colocando siempre

Tabla 11. Nivel de seguridad requerido para trabajar distintos microorganismos

Nivel de bioseguridad	Microorganismos	Comentarios
Nivel de bioseguridad 2	<i>Bacillus anthracis</i> * <i>Brucella</i> spp. <i>Yersinia pestis</i> * <i>Francisella tularensis</i> * <i>Burkholderia pseudomallei</i> *	*Manejo de las muestras nivel de bioseguridad 2, manejo de los cultivos nivel 3
Nivel de bioseguridad 3	Virus de la gripe aviar de alta patogenicidad <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides immitis</i>	*Manejo de las muestras nivel de bioseguridad 2, manejo de los cultivos nivel 3
Nivel de bioseguridad 4	Virus Ebola Virus Marburg Virus Crimea-Congo Otros virus de fiebres hemorrágicas	

las más antiguas en la gradilla de eliminación próxima. Las biopsias para determinación de *Helicobacter pylori* deben guardarse a -80°C y las muestras destinadas a PCR o cultivo de virus se deben almacenar de manera preferente a -70 u 80°C y en segunda opción a -20°C, teniendo en cuenta que se produce una degradación importante de los ácidos nucleicos sobre todo para el RNA. La mayoría de virus RNA son monocatenarios y puede afectar de forma importante los resultados.

11. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS CON SOSPECHA DE MICROORGANISMOS CON GRAN RELEVANCIA EN SALUD PÚBLICA

El fenómeno de la globalización representa un problema especial para la diseminación de las enfermedades infecciosas y el control de las mismas, constituyendo además un marco idóneo que fomenta la introducción de nuevas amenazas. No debemos olvidar que los agentes infecciosos pueden trasladarse a cualquier parte de la tierra, de forma natural o intencionada, y que las consecuencias no se limitan a la posibilidad de producir una elevada morbimortalidad, sino en algunos casos, una alarma social que repercuten en la actividad normal de la sociedad.

En algunas de ellas, la elevada mortalidad asociada a la infección y la ausencia, por lo general, de medidas terapéuticas y profilácticas eficaces clasifican a algunos de estos microorganismos en la máxima categoría de peligrosidad (grupo 4), ante los que deben adoptarse medidas de contención del máximo nivel a la hora de manejar a los pacientes y a las muestras biológicas (laboratorios de seguridad biológica nivel 4), en los que se trabajarían patógenos como el Virus de la viruela y los de

las fiebres hemorrágicas (ver tabla 11). Existen otro grupo de microorganismos con potencial uso para propósitos terroristas que, aunque se trabajarían en laboratorios de seguridad biológica nivel 3 (*Francisella tularensis*) o de nivel 2 (*Bacillus anthracis* y *Yersinia pestis*), constituyen una amenaza para la sociedad por su repercusión a nivel de salud pública y un reto diagnóstico para los Servicios de Microbiología.

Para responder a estos eventos biológicos el microbiólogo clínico debería estar entrenado y conocer las siguientes áreas:

- Nivel de bioseguridad de su propio laboratorio (ver procedimiento SEIMC nº 10a (2014): Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica).
- Principios de recogida de muestras, conservación y transporte de estos patógenos
- Criterios para reconocer o sospechar las enfermedades emergentes o los intentos de bioterrorismo
- Niveles de seguridad para los distintos patógenos
- Conocimiento de los protocolos de consenso
- Tiempo, precisión de las pruebas y resultados
- Conocimiento de la cadena de custodia de estas muestras en su propia institución

Como las instalaciones de este tipo en nuestro país en el ámbito sanitario son excepcionales (sólo existe 1 de nivel de bioseguridad tipo 3), las condiciones de bioseguridad deben ser las más altas de las que disponga el laboratorio o el hospital y que, como mínimo, debe incluir instalaciones con presión negativa, habitaciones o cabinas de seguridad biológica de clase

II y equipos de protección individual (EPIs) adecuados (bata de apertura posterior y capucha o mono con capucha, calzas, pantalla facial, mascarilla FFP3 o FFP2 y dobles guantes), que corresponderían a laboratorios de nivel de bioseguridad tipo 2 a los que pertenecen la mayoría de los laboratorios de Microbiología Clínica de los hospitales de nuestro país.

En estos casos, además de la información habitual sobre el paciente registrada al obtener la muestra (nombre completo, fecha de nacimiento, dirección, fecha y hora de obtención de la muestra, etc.), también se debe registrar la información siguiente: síntomas, con su duración y fecha de inicio, contacto con casos conocidos de infección por el patógeno del que se sospecha y tipo de contacto (por ejemplo, lactancia materna, pareja sexual); antecedentes completos de viaje (fechas, lugares, duración de la estancia) y antecedentes de vacunación.

Previamente a la extracción de las muestras, se debe preparar todo el material necesario (recomendable una lista de comprobación) y rotular el tubo primario con los datos del paciente. Se debe avisar con anterioridad al microbiólogo de su envío al laboratorio. Una vez extraídas, se introducirán en un contenedor a prueba de fugas (una bolsa de plástico autosellable y un tubo rígido de mayor tamaño provisto de material que absorba golpes) y remitidas directamente a la zona de manipulación de muestras de laboratorio. No se debe utilizar nunca el tubo neumático. Con el fin de evitar el transporte de la muestra dentro del hospital, el microbiólogo se encontrará en las inmediaciones del área habilitada y de acceso restringido y será el garante de comprobar que el tubo primario se introduce asépticamente en el envase secundario y terciario.

Las pruebas a realizar en el laboratorio deben limitarse al mínimo imprescindible y las muestras deben permanecer, en todo momento, perfectamente identificadas y custodiadas por el personal designado del laboratorio en un lugar de acceso restringido. La técnica microbiológica a emplear será escrupulosa, evitando riesgos de aerosolización, derrames o salpicaduras. En caso de centrifugación manual se deberá disponer de cubetas o rotores herméticamente cerrados, los cuales, una vez finalizada la centrifugación, se abrirán en el interior de la cabina de bioseguridad. El manipulador deberá estar tranquilo, sin presión, y supervisado por una persona con conocimientos técnicos. Las muestras de los casos confirmados de este tipo de infecciones, en el momento de su eliminación se deben considerar como residuos sanitarios del grupo III que son aquellos que requieren unas medidas especiales de prevención, recogida, almacenamiento, transporte y eliminación dentro y fuera del centro sanitario. Para su eliminación

se utilizarán los contenedores correspondientes del grupo III.

Dentro de las bacterias incluidas en este grupo hay que destacar:

- ***Bacillus anthracis***: es uno de los principales microorganismos con uso potencial para fines bioterroristas y aunque se pueden procesar las muestras en laboratorios de bioseguridad tipo 2 se recomienda especialmente evitar procedimientos que generen aerosoles y efectuar con frecuencia la higiene de manos. Dependiendo del tipo de infección que produzca puede presentar diversas manifestaciones clínicas y por ello las muestras remitidas al laboratorio pueden ser muy variadas, incluyendo muestras respiratorias, heces, LCR, sangre o lesiones cutáneas. No existe transmisión persona a persona y la forma más eficaz de dispersión de las esporas parece ser la aerosolización; su adquisición actual es casi exclusivamente por actos de bioterrorismo.

- ***Francisella tularensis***: es un microorganismo muy lábil, con alta infectividad y la dispersión por aerosoles parece la forma más probable de propagación. Se puede recuperar el microorganismo de múltiples muestras clínicas y también es posible el diagnóstico serológico (demostrando títulos elevados de anticuerpos específicos en suero), aunque se han descrito reacciones cruzadas con *Brucella* spp, *Proteus* spp. y *Yersinia* spp. Se debe realizar una determinación serológica en fase aguda tan pronto como sea posible al comienzo de la enfermedad y obtener el segundo suero de la fase de convaleciente después de 14 días.

- ***Yersinia pestis***: la peste neumónica es una entidad potencialmente devastadora si se utiliza con fines bioterroristas. La transmisión persona a persona a través del aire es posible, siendo extremadamente contagiosa.

- ***Burkholderia pseudomallei***: causante de la melioidosis es otro potencial agente terrorista por la alta mortalidad que causa, la frecuencia de recidivas y la dificultad de su tratamiento.

Otras enfermedades de etiología vírica que se han incorporado a la lista de patógenos emergentes o agentes bioterroristas potenciales son el Coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), la gripe por el Virus de la gripe A o la gripe aviar y los virus que causan fiebres hemorrágicas, un grupo de virus ARN miembros de las familias *Filoviridae* (Virus Ebola y Marburg), *Arenaviridae* (Virus hemorrágico de la fiebre de Lassa), Hantavirus y Virus Crimea-congo y *Flaviviridae* (dengue y fiebre amarilla). El diagnóstico requiere instalaciones de alta seguridad biológica, se

realiza mediante técnicas serológicas y moleculares, así como con microscopía electrónica y cultivos celulares. En este grupo conviene destacar dos virus:

- **Virus Ebola:** es un agente biológico del grupo 4 y las muestras se deberían manejar en instalaciones de nivel de bioseguridad 4. Lo mejor es minimizar la manipulación de la muestra, por lo cual lo aconsejable es enviarla al laboratorio de referencia directamente desde la habitación del paciente, embalaje incluido. La muestra diagnóstica fundamental es la sangre anticoagulada con EDTA, aunque también se puede utilizar suero o plasma. Conforme la enfermedad avanza se puede detectar el virus en muchas otras muestras biológicas, como vómitos, orina, heces, saliva, conjuntiva, semen, exudado vaginal, etc., pero no deben ser consideradas como muestras primarias para el diagnóstico. El microbiólogo debe formar parte del equipo de profesionales que participarán en la obtención, recepción, embalaje y transporte de la muestra que se remita al Centro de Referencia como garante de la ausencia de contaminación externa de los embalajes secundario y exterior. Deberá participar llevando un doble guante, protector facial completo (o gafas protectoras), bata impermeable de apertura trasera y calzas.

- **Virus Zika:** este virus se ha detectado en sangre entera (también en suero y plasma), orina, líquidos cefalorraquídeo y amniótico, semen y saliva. Cada vez hay más pruebas de que el virus está presente en la orina y el semen durante más tiempo que en la sangre entera o la saliva. Aunque todavía se están recogiendo datos sobre la duración de la persistencia del virus en la saliva, el líquido cefalorraquídeo, el semen y los productos de la concepción, en este momento se recomienda que a los pacientes se les extraigan muestras de sangre entera o suero y/u orina. En situaciones donde hay un aumento del riesgo de virus Zika, Dengue y Chikungunya el uso de técnicas de RT-PCR permite la detección simultánea y la diferenciación del ARN de esos virus.

12. BIBLIOGRAFIA

- Alonso C, Bartolomé R, Domínguez J, Matas L, Rabella N. Procedimientos en Microbiología Clínica 19: Técnicas rápidas de detección de antígeno. Ed: Cercenado E, Cantón R. Sociedad Española de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas 2005.
- Batista N, Bordes A, Díez O, Lecuona M, Lara M. Procedimientos en Microbiología Clínica 23: Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. Ed: Cercenado E, Cantón R. Sociedad Española de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas 2006.
- Bourbeau PP, Swartz BL. First evaluation of the WASP, a new automated microbiology plating instrument. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1101–1106.
- Buchan BW, Ledebor NA. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:783–822.
- Croxatto A, Dijkstra K, Prod'hom G, Greub G. Comparison of inoculation with the InoqulA and WASP automated systems with manual inoculation. *J Clin Microbiol* 2015; 53:2298–2307
- Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon S, Rochais Y, Greub G. 2016. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 2016;22: 217–235.
- Dauwalder O, Landrieu L, Laurent F, de Montclos M, Vandenesch F, Lina G. Does bacteriology laboratory automation reduce time to results and increase quality management? *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 236–243.
- Ellen Jo Baron J, Michael Miller Melvin P, Weinstein Sandra S, Richter Peter H, Gilligan, Paul Bourbeau Karen C, Carroll Sue C, Kehl W, Michael Dunne. A guide to utilization of the Microbiology Laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013. Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* (2013); 57(4):e22-e121
- Glasson JH, Guthrie LH, Nielsen DJ, Bethell FA. Evaluation of an automated instrument for inoculating and spreading samples onto agar plates. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1281–1284.
- Greub G, Prod'hom G. 2011. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 17: 655–660.
- Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2015–2016. World Health Organization 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149288/1/WHO_HSE_GCR_2015.2_eng.pdf
- Iversen J, Stendal G, Gerdes CM, Meyer CH, Andersen CO, Frimodt-Møller N. Comparative evaluation of inoculation of urine samples with the Copan WASP and BD Kiestra InoqulA instruments. *J Clin Microbiol* 2016; 54:328 –332.
- Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. 2015. Manual of Clinical Microbiology, 11th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

14. Leber AL. 2016. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol. 1-3. American Society for Microbiology Washington, D.C
15. Lloret A, Canós M, Gimeno C, González D, López P, et al. Garantía de Calidad en los laboratorios de Microbiología Clínica. Manual de toma de muestras. Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat. 1ª Ed. Año 2004.
16. Mischnik A, Mieth M, Busch CJ, Hofer S, Zimmerman S. First evaluation of specimen inoculation for wound swab samples by use of Previ Isola System compared to manual inoculation in a routine laboratory: finding a cost-effective and accurate approach. *J Clin Microbiol* 2012; 58:2732–2736.
17. Novak SM, Marlowe EM. Automation in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Lab Med* 2013; 33:567–588.
18. Quiblier Ch, Jetter M, Rominski M, Mouttet F, Böttger EC, Keller PM, Hombach M. Performance of Copan WASP for Routine Urine Microbiology. *J Clin Microbiol* 2016; 54:585–592.
19. Sánchez-Carrillo C, Guerrero-Gómez C. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. Ed: Cercenado E, Cantón R. Sociedad Española de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas 2003.
20. Sentinel level clinical laboratory protocols for suspected biological threat agents and emerging infectious diseases En: www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines.
21. Tsunemi Y, Hiruma M. Clinical study of Dermatophyte Test Strip, an immunochromatographic method, to detect tinea unguium dermatophytes. *Journal of Dermatology* 2016; 43: 1417–1423.
22. Wakamoto H, Miyamoto M. Development of a new dermatophyte-detection device using immunochromatography. *J Med Diagn Meth* 2016; 5(2):216.
23. World Health Organization 2014. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 5 (2013).WHO Ginebra. Suiza.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 17

PNT-RTPM-01

Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología

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.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 17

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describen los pasos a seguir de manera general, en la recogida, transporte y posterior procesamiento de las muestras que se reciben en un laboratorio de Microbiología, con el fin de descartar o determinar el agente infeccioso responsable del cuadro clínico que originó la solicitud de determinaciones en dicha muestra.

El alcance incluye a todo el personal de enfermería y/o médico encargado de la toma de muestras en departamentos hospitalarios, incluyendo servicios de urgencias, bloques médicos y quirúrgicos y consultas externas, así como a los centros de salud u otras entidades sanitarias en los que desarrolle el diagnóstico microbiológico.

2. FUNDAMENTO

La elección de la muestra que se debe enviar para el estudio microbiológico se basa en 2 premisas fundamentales: el lugar de la infección y la naturaleza del agente infeccioso sospechoso de ser responsable del cuadro clínico que determina la petición o el estudio microbiológico. Para proporcionar el nivel de calidad necesario, el laboratorio requiere que todas las muestras microbiológicas sean correctamente seleccionadas, recogidas y transportadas, ya que esto permite optimizar su análisis e interpretación.

Todo el trabajo del laboratorio de Microbiología se convierte en inútil, si las muestras clínicas que le llegan para el diagnóstico no son de calidad, es decir, no están correctamente recogidas y enviadas al laboratorio; por ello el laboratorio de Microbiología debe poner a disposición de todos los médicos/personal sanitario solicitantes un manual de toma de muestras que facilite este proceso de recogida y transporte.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Amy L. Leber. 2016. Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 1-3, 4th edition. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
2. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2015–2016. World Health Organization 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149288/1/WHO_HSE_GCR_2015.2_eng.pdf
3. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. 2015. Manual of Clinical Microbiology, 11th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
4. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la SEIMC. Año 2003. Disponible en www.seimc.org/documentos/microbiología
5. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones SEIMC. Año 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/microbiología>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 17

4. MUESTRAS

4.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

Es necesario para la recogida de muestras microbiológicas tener en cuenta que:

1. Antes de recoger la muestra, considerar el riesgo / beneficio de la recogida de ésta para el paciente.
2. La toma de la muestra se debe hacer de forma aséptica, evitando contaminaciones del personal, ambientales o del enfermo. Evitar, siempre que sea posible, el contacto de la muestra con microbiota normal del paciente.
3. Debe recogerse una cantidad suficiente de muestra para asegurar el proceso diagnóstico. Enviar tejido o líquido siempre que sea posible en lugar de una muestra recogida con torunda.
4. Las muestras se deben recoger en contenedores adecuados y herméticos. Cada tipo de muestra requiere un contenedor diferente, (ver tabla 2 del documento científico de este procedimiento SEIMC).
5. Todas las muestras deben ser transportadas lo más pronto posible al laboratorio de Microbiología, preferentemente antes de dos horas.
6. La muestra debe ser representativa del proceso infeccioso, se ha de recoger del sitio exacto y siguiendo las medidas de precaución universales.
7. La muestra no debe estar en contacto con antisépticos o desinfectantes que pueden alterar la viabilidad de los microorganismos.
8. Todas las muestras deben ir adecuadamente identificadas con los datos del paciente (nombre y número historia clínica o fecha de nacimiento), tipo de muestra, fecha y hora de recogida.
9. Se debe comprobar que en la solicitud, ya sea en volante o electrónica, se incluyen detalles sobre origen de la muestra, sospecha clínica y terapia antimicrobiana previa, de modo que el laboratorio pueda determinar el método más apropiado para procesarla.
10. De ser posible, la toma de la muestra se realizará antes del inicio de la antibioterapia o 48 horas tras su finalización. En el caso de detección de anticuerpos, antígenos o ácidos nucleicos el tratamiento antibiótico previo es menos definitivo que para el cultivo.
11. Notificar al laboratorio por adelantado si se solicitan pruebas especiales o si se sospecha que existen patógenos inusuales, incluidos los potenciales agentes de bioterrorismo.
12. Todas las muestras microbiológicas pueden ser potencialmente peligrosas.

4.2. MOMENTO DE LA TOMA

Habitualmente la muestra para estudio microbiológico debe obtenerse lo más pronto posible en relación al comienzo de la enfermedad infecciosa, excepto en aquellas en las que se busca detectar la huella de la infección en el sistema inmune y es necesario un tiempo determinado para confirmar el diagnóstico. En algunos casos es necesario cumplir unos requisitos fundamentalmente de tiempo, sobre todo si han existido tratamientos previos (por ejemplo, onicomicosis), para no disminuir la sensibilidad del cultivo. La explicación sobre la toma de cada una de las muestras se encuentra detallada en los correspondientes procedimientos de la SEIMC.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 17

4.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Respecto a la obtención de algunos tipos de muestras conviene señalar lo siguiente:

- Muestras recogidas con torundas: son apropiadas cuando el volumen de muestra es limitado (por ejemplo, heridas de superficie o muestras orofaríngeas), cuando no sea posible obtenerlas por otro medio y cuando el número de medios a inocular sea limitado. Se deben recoger cuidadosamente para evitar tocar superficies que contengan bacterias contaminantes, y se deben rodar o frotar vigorosamente sobre la superficie infectada para maximizar la adsorción. Las torundas no se recomiendan para los cultivos anaerobios (poco material, susceptible de ser aireado y en posible contacto con contaminantes) o cultivos de hongos filamentosos.

Para la detección de micobacterias, como *Mycobacterium marinum*, se pueden utilizar, aunque es preferible el aspirado de fluidos o el tejido. En las úlceras de decúbito no son muy aconsejables, ya que son más propensos a recuperar bacterias colonizantes pudiendo enmascarar al verdadero patógeno. Los torundas flocadas se han convertido en una valiosa herramienta en la recolección de las muestras, permitiendo una liberación de la misma de manera más efectiva.

- Aspirados y fluidos: para los contenidos de abscesos, fluidos corporales y otras colecciones de líquidos por debajo de la piel, se prefieren los aspirados obtenidos a través de piel intacta y desinfectada sobre las torundas. La piel debe limpiarse a fondo con alcohol al 70% seguida de la desinfección con povidona yodada o clorhexidina y debe estar completamente seca antes de insertarse la aguja. Si la muestra se recoge con jeringa, se ha de retirar la utilizada para la extracción y cambiarla por un tapón estéril antes de iniciar su transporte. Si se sospechan anaerobios, el contenedor de transporte debe ser adecuado.

- Tejidos: el tejido biopsiado se ha de obtener por un especialista usando una técnica aséptica. La piel de la superficie debe desinfectarse con clorhexidina antes de realizar la incisión. Una vez realizada ésta (primera incisión que puede contener pequeñas cantidades de bacterias superficiales), se debe cambiar a un nuevo bisturí. El tejido debe colocarse en un vial de transporte anaeróbico, en un frasco estéril si no se consideran anaerobios, o en medio de virus si la sospecha es de infección vírica.

- Muestras respiratorias: para la obtención de muestras no invasivas (esputo), el enfermo previamente se lavará los dientes con pasta y cepillo, se enjuagará la boca con agua o hará gárgaras, con el fin de arrastrar la microbiota colonizadora superficial. A continuación, hay que obtener el esputo tras una expectoración profunda (NO fluido retranasal), preferentemente matinal, siendo útil realizar previamente un drenaje postural o fisioterapia respiratoria. De no producirse expectoración espontánea, puede inducirse el esputo con nebulizaciones de suero fisiológico estéril (debe inhalar al menos 25 ml de solución salina al 3-10%), el que se denomina esputo inducido. En estos casos también es útil realizar previamente un drenaje postural o fisioterapia respiratoria. En pacientes pediátricos que no expectoran espontáneamente se recogerá la muestra por aspiración tras fisioterapia respiratoria. La dificultad para la obtención de buenas muestras ha favorecido el desarrollo de técnicas rápidas de detección de antígenos en orina (*Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila*).

- Orina: la primera orina de la mañana es la óptima para la mayoría de los estudios, ya que las bacterias se han multiplicado en la vejiga durante varias horas.

- Heces: se prefiere la toma de heces a la de una torunda rectal para las pruebas bacterianas, aunque si no es posible la obtención de heces, ésta debe ser insertada en recto de forma que alcance material fecal. Las torundas se deben enviar siempre en medios de transporte para preservar la viabilidad de los patógenos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición Nº 01	Página 5 de 17

4.4. VOLUMEN DE LA MUESTRA Y NÚMERO

En general, es mejor usar el mayor volumen de material disponible, aunque si las muestras son demasiado grandes se puede, por la dificultad de manipulación de las mismas en el laboratorio, facilitar la contaminación de la muestra. El volumen mínimo para inocular una placa o un caldo de enriquecimiento es una gota (0,05 ml) y como norma general, para el cultivo bacteriológico es necesario al menos 0,5 ml o 0,5 g de material, y se necesita más cantidad según el número de peticiones realizadas sobre esa muestra (ver tabla 3 del documento científico). Normalmente se procesa una muestra por cada solicitud, pero existen procesos como la determinación de micobacterias, la búsqueda de parásitos, las infecciones protésicas, etc... en las que es necesario ampliar el número de muestras para tener una mayor rentabilidad y/o una mejor interpretación de los resultados del cultivo.

4.5. CONSERVACIÓN

Existen bacterias especialmente sensibles a las condiciones ambientales y que requieren un procesamiento inmediato: *Bordetella pertussis*, *Shigella* spp., *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y microorganismos anaerobios. Retrasos de más de 6 horas, incluso con el uso de medios de transporte adecuados, dan lugar a una pérdida de recuperación de microorganismos viables. Si las muestras van a tardar en procesarse más de 6 horas, se deben refrigerar la mayoría de ellas. Volúmenes pequeños (<1 ml) o secciones pequeñas (<1 cm³) se deben enviar entre los 15-30 primeros minutos, en estos casos es aconsejable añadir unas gotas de suero salino fisiológico para evitar la desecación de las muestras. Las muestras que se van a procesar solo mediante técnicas de biología molecular se deben refrigerar o mejor congelar a -70°C, siempre asegurándose de cumplir las recomendaciones del fabricante de la técnica o procedimiento que se vaya a emplear (ver tabla 5 del documento científico).

4.6. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Cada laboratorio de Microbiología debe disponer de unas normas de recepción y aceptación de muestras para diagnóstico microbiológico que los médicos solicitantes deben conocer. Dado que toda muestra clínica es irreplicable, se intentará por todos los medios evitar el rechazo de las mismas, tratando de resolver en la propia sección de registro y recepción de muestras los problemas que pudieran ser causa de rechazo.

De manera general, se rechazarán siempre:

- las muestras no identificadas
- las muestras derramadas
- las que sean inadecuadas para la evaluación de la enfermedad que se pretende analizar
- las que excedan el número máximo aceptado para una evaluación determinada (por ejemplo, más de 1 coprocultivo de un mismo paciente en un mismo día)

Si las muestras son de muy difícil obtención sólo se rechazarán cuando estén mal identificadas y haya sido imposible resolver la incidencia; cuando se registren otros tipos de incidencias como una conservación inadecuada (temperatura inapropiada, muestras en medio no apropiado), se procesarán, pero se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados: "Interpretar los resultados con precaución: muestra recibida en condiciones defectuosas".

Las incidencias surgidas en la recogida de la muestra, se deben de informar lo antes posible al servicio solicitante con el objeto de que la resolución sea inmediata y además quedar anotadas en el registro de incidencias del plan de calidad del laboratorio.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 17

Existe la posibilidad, en los laboratorios en los que se dispone de petición electrónica, de que al registrar una muestra, se obtengan etiquetas sobrepresas con la identificación del paciente, número de muestra, tipo de muestra, servicio solicitante, medios de cultivo a utilizar y el box de trabajo en el que se realizará el procesamiento para cada una de las determinaciones a realizar, evitando así los posibles errores producidos por el registro manual y facilitando la siembra en los medios adecuados. Además, es posible añadir una o más determinaciones a una muestra con facilidad, si el médico peticionario lo solicita o si el microbiólogo lo considera necesario según la información que acompaña a la muestra.

4.7. TRANSPORTE

El tipo de prueba determina la naturaleza del sistema de transporte, pero siempre debe efectuarse lo más rápidamente posible desde la obtención de la muestra. Si el procesamiento no se realiza de inmediato o en las 2 primeras horas se deben de conservar de forma específica (ver tabla 5 del documento científico de este procedimiento). En la mayoría de los laboratorios, se dispone de un tubo neumático que facilita el envío de las muestras desde las distintas unidades asistenciales al laboratorio, siempre y cuando esté asegurado el cierre hermético de los contenedores. Hay muestras que NUNCA se deben enviar a través de este sistema de transporte y son los frascos de hemocultivos (sangre y líquidos estériles), muestras en jeringa y muestras especialmente valiosas por su dificultad de obtención como el LCR y muestras quirúrgicas intraoperatorias.

La mayoría de las muestras que se reciben diariamente en un laboratorio de Microbiología son sustancias infecciosas de la categoría B y designadas UN 3373, éstas se pueden transportar a otro hospital en el ámbito regional o nacional siguiendo las Instrucciones de envasado P620 relativa al transporte de sustancias infecciosas 2013-2014 y que se reproduce en el ANEXO 1.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los medios de cultivo habituales se detallan en las tablas 7 y 8 del documento científico. Es necesario disponer de medios de cultivo sólidos y líquidos.

Reactivos y productos:

- Colorantes para tinción de Gram
- Colorantes para tinción de Zhihl-Neelsen o tinción de auramina
- KOH (hidróxido de potasio)
- Tinta china
- Tinción de calcofluor
- Reactivos para la tinción de Giemsa o Field
- Lugol
- Alcohol 96°
- Aceite de inmersión
- Agua destilada estéril
- N-acetil cisteína
- Solución Ringer-lactato
- Solución salina
- Sistemas generadores de atmósfera anaerobia, microaerofílica y con 5%CO₂
- Reactivos necesarios para la realización de técnicas rápidas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 17

6. APARATOS Y MATERIAL

- Asas calibradas
- Pipetas Pasteur estériles
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta estériles
- Placas de Petri estériles
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Hojas de bisturí estériles
- Tubos de rosca y/o otros contenedores estériles
- Tubos de fondo cónico
- Jeringas y agujas desechables
- Papel parafilm
- Pinzas estériles
- Tijeras estériles
- Mechero Bunsen
- Guantes
- Jarras de incubación (anaerobiosis, microaerofilia, CO₂)
- Gradillas para colocar las muestras
- Agitador tipo *vórtex*
- Centrifugas y citocentrífuga
- Homogenizadores de muestras o morteros estériles
- Sonicador
- Stomacher
- Contenedores de residuos.
- Estufas (de aerobiosis y de CO₂)
- Neveras y congeladores (almacenaje de placas y reactivos)
- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Microscopio óptico

Las revisiones, así como cualquier tipo de incidencia, de los aparatos y/o el material, deben estar detalladas en la hoja de mantenimiento de equipos dentro del plan de calidad del laboratorio y se deben cumplir rigurosamente.

7. PROCESAMIENTO

El procesamiento de las distintas muestras en Microbiología conlleva los siguientes pasos: una evaluación de la adecuación de las muestras, una selección de medios y una siembra para el aislamiento primario. Durante todo el procedimiento se debe trabajar en campana de bioseguridad, usando guantes, bata y otro equipo protector según el tipo de muestra lo requiera.

A) CULTIVO MEDIANTE MÉTODOS CONVENCIONALES

7.1 FASE DE PRETRATAMIENTO

7.1.1. Centrifugación

- Centrifugar todos los líquidos con volumen superior a 1ml a 2.500 rpm durante 15 minutos
- Centrifugar la sangre a 3.500 rpm durante 3-5 minutos para detección de antígenos y/o anticuerpos
- Otras técnicas de concentración específicas: precipitación en etanol, ultracentrifugación selectiva, etc.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 17

7.1.2. Homogeneización muestras (de tejido, abscesos, heridas...)

7.1.2.1 Mediante hoja de bisturí

- Traspasar la muestra a una placa de Petri estéril. Con ayuda de una hoja de bisturí desmenuzar el tejido hasta obtener una consistencia homogénea. Seleccionar los bordes de la muestra
- Traspasar la muestra homogeneizada a un contenedor estéril con ayuda de una pipeta Pasteur

7.1.2.2. Mediante mortero

- Traspasar la muestra al interior de un mortero estéril y añadir 1-2 ml de caldo de cultivo
- Con ayuda de la mano del mortero triturar la muestra mediante movimientos rotatorios
- Traspasar la muestra utilizando una pipeta Pasteur estéril a un contenedor estéril

7.1.2.3. Mediante Stomacher

- Colocar la muestra en el interior de una bolsa de Stomacher y añadir 1-2 ml de caldo de cultivo
- Colocar la bolsa en el interior del Stomacher, dejando unos centímetros de la bolsa sobresalir sobre la tapa
- Cerrar la tapa y conectar el Stomacher durante 1 a 5 minutos
- Desconectar el Stomacher, extraer la bolsa y traspasar su contenido a un contenedor estéril

7.1.3. Sonicación

7.1.3.1. Técnica de sonicación del catéter para liberar biofilm

- Colocar la punta del catéter en tubo estéril con 10 ml de caldo TSB
- Someter el tubo a ultrasonidos durante 1 minuto a 55.000 Hz y 125 w
- Agitar en *vortex* durante 15 segundos
- Añadir 0,1 ml del caldo a 9,9 ml de solución salina. Agitar
- Dejar caer 0,1 ml de caldo y 0,1 ml de la suspensión salina por separado en agar sangre y MaConkey. Difundir con asa estéril
- Incubar durante 48 h en 5% CO₂ y contar las colonias

7.1.3.2. Técnica de procesamiento de prótesis articulares, válvulas y otros implantes

- En cabina de bioseguridad, retirar la tapa del envase estéril conteniendo la prótesis y añadir 400 ml de solución estéril de Ringer lactato o caldo de enriquecimiento. Para muestras más pequeñas (tornillos, tuercas), colocar en un tubo estéril de 10 ml con tapa de rosca tapa y cubrir con un máximo de 10 ml de solución o caldo
- Volver a colocar la tapa en el envase y asegúrese de que se enrosca en forma segura
- Agitar el envase durante 30 segundos con un *vórtex* de plataforma plana
- Someter a ultrasonidos durante 5 minutos
- Agitar durante 30 segundos
- De forma aséptica, extraer una alícuota de 50 ml de líquido de sonicación de la prótesis en un tubo cónico de centrifuga. Para muestras más pequeñas, para hacer la alícuota extraer todo el líquido sonicado en un tubo de centrifuga
- Centrifugar los tubos a 3.000 rpm durante 15 minutos
- Desechar 49,5 ml (antes de 15 minutos para evitar la resuspensión del sedimento) dejando 0,5 ml (una

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición Nº 01	Página 9 de 17

concentración de 100 veces) restante con el sedimento

I. Colocar una gota del sedimento sobre un portaobjetos para tinción de Gram

J. Colocar 0,1 ml de sedimento en cada placa a sembrar (agar sangre y agar chocolate)

7.2 SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO

De manera general hay que buscar siempre la parte más purulenta de la muestra para los cultivos y las extensiones y es preferible cultivar grandes volúmenes de muestra si hay disponibilidad, que centrifugarlos.

7.2.1. Piezas no triturables

Para muestras con o sobre cuerpos extraños quirúrgicos (distintos a las prótesis ortopédicas) si no hay material o tejido purulento que extraer, lo mejor es bañarlos en caldo de enriquecimiento en un contenedor estéril dejándolos incubar a 35°C durante 24 horas y luego realizar subcultivos a los medios necesarios y tinción de Gram de ese caldo.

7.2.2. Muestras recibidas en jeringas o tubos estériles

- Inocular 2 ó 3 gotas de la muestra en uno de los cuadrantes de la placa de Petri
- Realizar estriamientos de la muestra mediante un asa estéril por todos los cuadrantes de la placa
- Inocular unas gotas de la muestra en un caldo de cultivo

7.2.3. Muestras recibidas en torundas (cada vez menos deseable en función del tipo de muestra)

Rechazar radicalmente aquellas torundas sin medio de transporte. Si solo se envía una, se introduce en caldo y se realiza una agitación y se exprime todo el contenido de la torunda en un contenedor estéril. De ahí con una pipeta se inoculan las placas de cultivo y las extensiones. Si se envían dos torundas, utilizar una para realizar las extensiones para la tinción de Gram y proceder con la otra como a continuación:

- Hacer rotar la torunda varias veces en uno de los cuadrantes de la placa
- Con un asa estéril realizar estrías desde la zona de la descarga por el resto de los cuadrantes de las placas
- Introducir la torunda en un caldo de cultivo y exprimirla bien mediante movimientos rotatorios sobre las paredes del tubo. Cortar la parte superior y mantener en incubación una porción de la misma en el interior del tubo con caldo de cultivo

7.2.4. Técnica de Maki para cultivo de catéteres intravasculares

- Con la ayuda de un asa o de unas pinzas estériles extraer el catéter de su envase
- Si mide más de 2-4 cm, cortarlo con un bisturí hasta esa longitud
- Depositarlo en una placa de agar sangre y rodar desde un extremo al otro de la placa 3-4 veces

7.2.5. Técnica de rajado de catéter silásticos pediátricos para cultivo cuantitativo

- Con la ayuda de un bisturí estéril, sobre una placa de Petri estéril, rajar el catéter abriéndolo por la mitad con la ayuda de pinzas estériles. Colocarlo en la placa de AS con el interior del catéter hacia la superficie del agar, moviéndolo de forma circular por toda la placa

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición Nº 01	Página 10 de 17

7.2.6. Cultivos semicuantitativos (conexión catéteres/piel pericatóter)

- Extender la muestra con la torunda seca por toda la placa de agar sangre como si de un cultivo cuantitativo de orina se tratara

7.2.7. Cultivos cuantitativos (orina, secreciones traqueales, BAS y LBA)

- En el caso de muestras respiratorias fluidas, agitar en *vórtex* durante unos segundos. Si no se consigue una buena homogeneización, añadir suero salino y agitar en *vórtex* de nuevo. Indicar en los medios de cultivo la dilución aproximada realizada. También se puede utilizar en muestras muy mucosas, acetil-cisteína para fluidificarlas, conociendo bien la dilución mantenida

- En el caso de la orina sembrar con asa calibrada un volumen adecuado en los medios apropiados, realizando un cultivo cuantitativo por toda la superficie de la placa. Las muestras de orina obtenidas por micción media y de sondaje vesical se deben sembrar en medio de cultivo con asa de 1 µL, mientras que las muestras de orina obtenidas por punción suprapúbica, nefrostomía o cistoscopia deben sembrarse con asa de 10 µL para el recuento consiguiente

7.3 EXTENSIONES

En el diagnóstico microbiológico la realización de las extensiones para las tinciones o visión directa, son las herramientas más coste-efectivas y más rápidas para proporcionar información útil al clínico

7.3.1. Mediante impronta: Piezas de tejido

- Colocar el tejido en una placa de Petri y cortar una porción con la ayuda de una hoja de bisturí
- Con unas pinzas, tomar la pieza cortada y realizar impresiones por la superficie del corte sobre un portaobjetos

7.3.2. Extensiones finas: material muy purulento

- Tomar una porción de la muestra y colocarla sobre un portaobjetos
- Colocar otro portaobjetos sobre la muestra y presionar los dos portaobjetos
- Desplazar el portaobjetos superior sobre el que contiene la muestra hasta separarlos
- Repetir este último paso hasta conseguir una extensión fina. Con papel secante retirar el sobrante

7.3.3. Líquidos, fluidos, LCR y LBA

- Depositar una gota de líquido sobre un portaobjetos (dos si escasa muestra o poco concentrada) y dejar secar
- Citocentrifugar unas gotas de líquido 5-10 min. a velocidad media

7.3.4. Muestras en torundas

- Si hay sólo una torunda colocarla sobre un tubo estéril y añadir una pequeña cantidad de caldo de cultivo
- Agitar en *vórtex* y exprimir la torunda sobre las paredes del tubo. Del líquido resultante poner una gota sobre el portaobjetos y dejar secar al aire
- Si hay más de una torunda, directamente realizar movimientos rotatorios suaves, exprimiendo la torunda sobre el portaobjetos, evitando romper células ni elementos bacterianos

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 11 de 17

7.3.5. Muestras de orina

- Colocar una gota o 10 µL de orina bien mezclada, no centrifugada sobre el portaobjetos (mejor si son portas-delimitados con un círculo para localizar la muestra al microscopio). Secar al aire sin extender

7.3.6. Muestras distintas de torundas (exudados o aspirados, esputos)

- Seleccionar la parte más purulenta del esputo o con rastros de sangre del pus y depositar sobre el portaobjetos con ayuda de un asa estéril o una pipeta
- Extender la muestra sobre la superficie del portaobjetos creando una delgada película

7.3.7. Material seco o escaso

- Emulsionar la muestra en 0,5 ml de caldo estéril. Agitar en *vórtex*
- Usar una pipeta Pasteur para colocar 1 gota sobre el portaobjetos y extender con la punta de la pipeta

7.3.8. Cultivos en medios líquidos (hemocultivos, tioglicolato...)

- Preparar una extensión sobre portaobjetos con pipeta estéril
- Utilizar agujas desechables o dispositivos especiales sobre los frascos de hemocultivos para colocar 1 o 2 gotas sobre el portaobjetos
- Extender con asa estéril en una delgada película
- En medios con carbón activado, preparar las extensiones como una extensión de sangre periférica para recuento hematológico (ver gota fina para malaria)

7.3.9. Extensiones de sangre periférica.

- Las extensiones de sangre para parásitos deben realizarse sobre portaobjetos de cristal habituales (2,5 cm ancho x 6 cm largo). Para una optimización de la óptica se pueden lavar los portaobjetos con alcohol eliminando los restos de grasa o suciedad antes de realizar las extensiones
- Las extensiones, independientemente de la tinción a usar, se deben teñir lo más pronto posible después de que se hayan secado. Si se almacenan sin teñir pueden ocasionarse artefactos en la tinción
- La observación de sangre para descartar malaria se considera una prueba urgente a realizar de forma inmediata bajo requerimiento clínico o facultativo y debe informarse su resultado de igual forma. Para su realización ver el procedimiento SEIMC n° 35 “El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas” (2009)

7.4 INCUBACIÓN

Hay que separar todas las placas y caldos inoculados según el sistema de ordenación de cada sección del laboratorio y colocarlos en función de la temperatura y atmósfera requerida para la incubación. Se debe comprobar diariamente que la temperatura y el nivel de humedad de las estufas es el adecuado.

Respecto a los medios de cultivo habituales, las placas de agar chocolate se incubarán en atmósfera de CO₂ y las de MacConkey, agar sangre y caldos de enriquecimiento (tioglicolato o BHI) en aerobiosis; las específicas para estudio de anaerobios en esa atmósfera.

Respecto a microorganismos, las placas para recuperar *Campylobacter* spp. y *H. pylori* se incubarán en atmósfera de microaerofilia, *Legionella* spp. y *Bordetella pertussis* en aerobiosis y se utilizará una atmósfera de incubación con 5-7% CO₂, sobre todo para aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 12 de 17

influenzae, y *Neisseria gonorrhoeae*. Este tipo de atmósfera también puede utilizarse para la incubación de muestras respiratorias, genitales y líquidos normalmente estériles, mediante el uso de estufas equipadas, jarras especiales con sistema de provisión de CO₂, con sobres, ampollas o tabletas generadoras de CO₂ en jarras de cierre hermético. También pueden ser opcionales para incubar subcultivos de hemocultivos o caldos de enriquecimiento, cultivos para *Streptococcus agalactiae* o difteria, y urocultivos. Respecto a los medios cromogénicos se seguirán las instrucciones del fabricante pero por regla general nunca deben incubarse en anaerobiosis y deben conservarse en la oscuridad.

B) CULTIVO MEDIANTE SIEMBRA AUTOMATIZADA

La mayoría de los sistemas automatizados procesan muestras líquidas incluyendo torundas en medio de transporte líquido, exudados, aspirados, líquidos estériles y orinas. Globalmente evitan errores de etiquetado, accidentes laborales, ahorran tiempo y permiten reorganizar el trabajo de los técnicos del laboratorio. La mayoría de ellos utilizan varios patrones pre-programados de técnica de siembra, aunque cada laboratorio también puede diseñar un modelo propio.

El manejo diario del WASP consiste: A primera hora de la mañana

- 1° Inicialmente encendido y puesta en marcha, y comprobación de conexión al sistema informático y confirmación a través del panel de control de los siguientes pasos.
- 2° Hay un tiempo de espera para que el módulo donde se ubica el esterilizador (de asas) alcance la temperatura adecuada.
- 3° El sistema realiza un chequeo automático de todas las funciones y realiza un lavado de asas, una comprobación de la tinta de cartucho y limpieza de impresoras (son las que imprimen los portas para la Tinción de Gram), comprobación de los lectores de códigos de barra y de la rueda de inserción de etiquetas.
- 4° Se carga el carrusel con las placas necesarias según el tipo de muestra a sembrar, con el agar hacia abajo.
- 5° Se cargan las muestras a través del rack (orinas, coprocultivos y exudados) y el aparato los vehiculiza hacia el interior para iniciar el procesamiento.

Al terminar (sobre las 5 de la tarde) se vacía el carrusel de placas, se comprueba que no se queda ningún elemento en el interior del sistema (tapas, portas...) y se cierra el sistema operativo desde la pantalla panel de control.

En el caso del InoquiA se configuran en el sistema los protocolos de siembra en placa, en tubo o en porta de cada tipo de muestra: orina, torunda vaginal, etc., así como el número de placas a sembrar por muestra. Una vez configurado, el sistema aplicará los protocolos correspondientes de manera automática. A continuación hay que cargar el sistema con los distintos tipos de medio a sembrar a temperatura adecuada y con las muestras a sembrar en las gradillas configuradas previamente.

Asegurarse que el sistema tiene suficientes esferas magnéticas en el contenedor correspondiente así como puntas de pipeta y pegatinas de códigos de barra.

El sistema hará un chequeo previo de componentes antes de comenzar a trabajar, nos informará con una alarma si encuentra algún error o falta algún fungible. Las placas una vez sembradas se irán colocando automáticamente según el tipo de atmósfera a incubar posteriormente. Se asegura la trazabilidad durante todo el proceso ya que el sistema se conecta al sistema informático del laboratorio.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 13 de 17

C) TÉCNICAS RÁPIDAS

Las diferentes técnicas de inmunocromatografía y enzimoimmunoanálisis se describen y detallan en el Procedimiento de Microbiología de la SEIMC n° 19: Técnicas rápidas de detección de antígeno (2005), por lo que a continuación, sólo se indicará el procesamiento general de las muestras para realización de técnicas de biología molecular.

Las muestras con solicitud de biología molecular se deben transferir a la unidad correspondiente y las solicitudes serán revisadas y programadas por el responsable técnico de este área. La muestra será alicuotada en el área de recepción de muestras, transfiriendo 0,5-1 ml de la muestra a un tubo de tapón de rosca de 2 ml, debidamente etiquetado, para su envío a la unidad de biología molecular, haciendo constar en el registro informático que la prueba ha sido enviada. La muestra que, por criterio del responsable técnico, requiera un procesamiento urgente, será convenientemente marcada sobre el frasco que contiene la alícuota y se entregará inmediata y directamente al personal de biología molecular. El resto de alícuotas no urgentes, se pueden agrupar para trasladarlas en intervalos de 1 hora. Los resultados serán validados por el responsable técnico de biología molecular.

Preparación de las muestras:

- ORINA: centrifugar 8-10 ml de orina durante 15 minutos a 4°C y 2500g (centrífuga de 3000 rpm). Decantar el sobrenadante dejando de 0,5 a 1 ml y enviar al laboratorio de biología molecular.
- HECES: resuspender en tubo de 1,5 ml, 100 mg (100 µL) de heces en 900 µL de buffer ASL. Agitar en *vórtex* durante 2 minutos. Dejar sedimentar 10 minutos a temperatura ambiente. Transferir cuidadosamente el sobrenadante (1 ml) a un tubo con tapón de rosca (2 ml). Incubar el tubo 10 min a 70°C
- MUESTRAS EN MEDIO DE TRANSPORTE DE BACTERIAS: agitar para homogeneizar y enviar 0,5 ml
- MUESTRAS EN MEDIO DE CITOLOGIA LIQUIDA: se enviará la muestra original sin manipular y la petición
- MUESTRAS EN MEDIO DE TRANSPORTE DE VIRUS: homogeneizar la muestra y enviar 0,5 ml
- MUESTRAS RESPIRATORIAS:
 - líquidas: enviar 0,5 mL de muestra
 - mucosas: homogeneizar la muestra, incluyendo si precisa el uso de acetilcisteína según el mismo protocolo de siembra. Enviar 0,5 ml de muestra
- MUESTRAS DE BIOPSIA: Homogeneizar la muestra siguiendo el mismo protocolo de siembra. Enviar 0,5 ml
- LCR y LIQUIDOS BIOLOGICOS: Homogeneizar la muestra y enviar 0,5 ml
- PLASMA y/o SUERO: Enviar 0,5 ml de plasma/suero
- SANGRE ANTICOAGULADA EDTA: alícuota de 0,5 ml en tubo con tapón de rosca
- Los procesamientos de las distintas muestras se harán según las especificaciones del fabricante para cada una de las determinaciones solicitadas

8. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual de calidad del Servicio 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 la supervisión de las técnicas deberá realizarla el facultativo especialista responsable de la sección donde se trabajen dichas muestras.

La toma de muestra, su transporte y conservación, por parte de los servicios quirúrgicos, debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología. El laboratorio de Microbiología debe elaborar y tener accesible su cartera de servicios y un Manual de toma de muestras a disposición de todos los médicos peticionarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 14 de 17

9. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Antes de manejar muestras biológicas, todo el personal deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad para trabajar en un laboratorio de Microbiología, que estarán detalladas en el manual de calidad del laboratorio o se pueden consultar en el procedimiento número 10a de la SEIMC relativo a Seguridad en el Laboratorio de Microbiología, en el que se detallan los niveles de contención necesarios para cada microorganismo. Todos los laboratorios de Microbiología deberían tener unos protocolos normalizados de trabajo sobre la recogida, transporte y procesamiento de las distintas muestras que habitualmente se trabajen en ese centro, para ser consultados en cualquier momento tanto por el personal técnico como facultativo.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida.

Las muestras obtenidas al mismo tiempo de sitios anatómicos diferentes deben considerarse y trabajarse como muestras diferentes.

En las muestras inoculadas en frascos de hemocultivos no se puede realizar la tinción de Gram.

En algunos tipos de muestras antes de la realización del cultivo, se debe valorar la calidad de la muestra mediante tinción de Gram (criterios de Murray-Washington) para proceder o no a su siembra (esputos).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Baron EJ, Michael Miller Melvin P, Weinstein Sandra S, Richter Peter H, Gilligan, Paul Bourbeau Karen C, Carroll Sue C, Kehl W, Michael Dunne. A guide to utilization of the Microbiology Laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013. Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis 2013; 57: e22-e121
2. Guembe M, Martín-Rabadán P, Cruces R, Pérez-Granda MJ, Bouza E. Sonicating multi-lumen sliced catheter tips after the roll-plate technique improves the detection of catheter colonization in adults. J Microbiol Methods 2016; 122: 20–22
3. Martín-Rabadán P, Pérez-García F, Zamora Flores E, Nisa ES, Guembe M, Bouza E. Improved method for the detection of catheter colonization and catheter-related bacteremia in newborns. Diagn Microbiol Infect Dis 2017; 87:311-314
4. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, Hanssen A, Wilson WR. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2013; 56:e1–25.

Anexo 1.

Instrucción de envasado P650

Las sustancias infecciosas de la categoría B y designadas UN 3373 se pueden transportar siguiendo las instrucciones de envasado P620 relativas al transporte de sustancias infecciosas 2013-2014 y que se reproduce a continuación. Las diversas disposiciones mencionadas se exponen en la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas.

A. Los envases deberán ser de buena calidad, suficientemente fuertes como para resistir los choques y las cargas que pueden producirse normalmente durante el transporte, incluido el trasbordo entre distintas unidades de transporte de mercancías y entre unidades de transporte y almacenes, así como el izado de palés o sobreenvases para su ulterior manipulación manual o mecánica. Los envases deberán estar fabricados y cerrados de forma que en las condiciones normales de transporte, no se produzcan mermas debidas a vibraciones o a

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 15 de 17

cambios de temperatura, de humedad o de presión.

B. El envase deberá comprender los tres elementos siguientes:

- i. Un recipiente primario
- ii. Un recipiente secundario
- iii. Un recipiente exterior de los que, bien el envase secundario, bien el envase exterior, deberá ser rígido
Para el transporte en avión, el recipiente exterior deberá ser rígido

C. Los recipientes primarios se colocarán en un recipiente secundario de forma tal que, en las condiciones normales de transporte, no puedan romperse, perforarse ni dejar escapar su contenido al recipiente secundario. Los recipientes secundarios irán sujetos dentro de embalajes exteriores con un material amortiguador apropiado. Un derrame del contenido no menoscabará la integridad del material amortiguador ni del envase exterior.

D. Para el transporte, la marca que se muestra a continuación deberá figurar en la superficie exterior del envase exterior sobre un fondo de un color que contraste con ella y que sea fácil de ver y leer. La marca deberá tener forma de cuadrado orientado en un ángulo de 45° (romboide) del que cada lado tendrá una longitud de al menos 50 mm, el grosor de las líneas deberá ser al menos de 2 mm y la altura de las letras y cifras deberá ser de al menos de 6 mm. La designación oficial de transporte, «BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B» (SUSTANCIA BIOLÓGICA, CATEGORÍA B), en letras de al menos 6 mm de altura, deberá figurar en el envase exterior al lado de la marca en forma de rombo



E. Al menos una de las superficies del envase exterior deberá tener una dimensión mínima de 100 mm × 100 mm.

F. El bulto completo deberá superar con éxito el ensayo de caída descrito la Reglamentación de la Instrucción de envasado P650 de UN.

G. Para sustancias líquidas:

- a.** Los recipientes primarios deberán ser estancos. Para el transporte aéreo, estos recipientes no podrán contener más de un litro
- b.** Los recipientes secundarios deberán ser estancos
- c.** Si se introducen varios recipientes primarios frágiles en un mismo recipiente secundario, los recipientes primarios irán envueltos individualmente o separados de manera que se evite todo contacto entre ellos
- d.** Se colocará material absorbente entre los recipientes primarios y el recipiente secundario. El material absorbente se pondrá en cantidad suficiente para que pueda absorber la totalidad del contenido de los recipientes primarios a fin de que el derrame de la sustancia líquida no comprometa la integridad del

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 16 de 17

material amortiguador o del recipiente exterior.

e. El recipiente primario o el secundario deberán resistir sin derrames una presión interna de 95 kPa (0,95 bar)

f. Para el transporte aéreo el recipiente exterior no deberá contener más de 4 litros; en este volumen no se incluye el hielo, hielo seco o nitrógeno líquido cuando se utilizan para mantener frías las muestras

H. Para sustancias sólidas:

a. Los recipientes primarios deberán ser a prueba de derrames. Para el transporte aéreo los recipientes primarios no deberán superar el límite de peso del recipiente externo

b. El embalaje/envase secundario deberá ser a prueba de derrames

c. Si se introducen varios recipientes primarios frágiles en un mismo recipiente secundario, los recipientes primarios irán envueltos individualmente o separados de manera que se evite todo contacto entre ellos

d. Para el transporte aéreo, si el recipiente primario contiene partes del cuerpo, órganos o cuerpos enteros, el envase exterior no debe contener más de 4 kg. En esta masa no se incluye el hielo, hielo seco o nitrógeno líquido cuando se utilizan para mantener frías las muestras

e. Cuando haya dudas sobre la presencia de líquido residual en el recipiente primario durante el transporte, deberá utilizarse un envase adaptado para líquidos, que comprenda material absorbente

I. Muestras refrigeradas o congeladas (hielo y hielo seco):

a. Cuando se use hielo o el hielo seco deberán colocarse fuera de los envases secundarios, en el envase exterior o en un sobreenvase. Se colocarán unos calzos interiores para que los envases secundarios se mantengan en su posición inicial cuando el hielo se haya fundido o el hielo seco se haya evaporado. Si se utiliza hielo, el envase exterior o el sobreenvase habrá de ser estanco

b. El recipiente primario y el envase secundario mantendrán su integridad a la temperatura del refrigerante usado, así como a las temperaturas y presiones que pudieran producirse si fallara la refrigeración

J. Cuando los bultos se coloquen en un sobreenvase, la marca de los bultos prescrita por la presente instrucción de envasado deberá, o bien ser directamente visibles, o bien reproducirse exterior del sobreenvase.

K. Las sustancias infecciosas adscritas al N° UN 3373 que se envasen y marquen de conformidad con esta instrucción no estarán sujetas a ninguna otra prescripción del presente Reglamento excepto las siguientes cuando el transporte sea a través de un medio aéreo:

a. en cada bulto deberán constar el nombre y la dirección del expedidor y del destinatario (consignatario)

b. deberá constar en un documento escrito (como un conocimiento de embarque aéreo) o en el envase el nombre y número de teléfono de una persona responsable

c. la clasificación debe ser conforme con la disposición 2.6.3.2 de las Instrucciones Técnicas de la OACI

d. deben observarse los requisitos de notificación de incidentes de la disposición 7.4.4 de las Instrucciones Técnicas de la OACI (éstas hacen referencia a los operadores)

e. deben observarse los requisitos de inspección de daños o fugas de las disposiciones 7.3.1.3 y 7.3.1.4 de las Instrucciones Técnicas de la OACI (éstas hacen referencia a los operadores)

f. se prohíbe el transporte de sustancias infecciosas por los pasajeros y la tripulación, ya sea en persona, como equipaje de mano o en el interior del mismo, o en el equipaje facturado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimiento general de recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología	PNT-RTPM-01	
		Edición N° 01	Página 17 de 17

L. Los fabricantes de envases y los distribuidores ulteriores deberán proporcionar instrucciones claras sobre su llenado y cierre al expedidor o a la persona que prepara el embalaje/envase (un paciente, por ejemplo) a fin de que pueda ser adecuadamente dispuesto para el transporte.

M. En el mismo envase de las sustancias infecciosas de la división 6.2 no deberá haber otras mercancías peligrosas, a menos que sean necesarias para mantener la viabilidad de las sustancias infecciosas, para estabilizarlas o para impedir su degradación, o para neutralizar los peligros que presenten. En cada recipiente primario que contenga sustancias infecciosas podrá envasarse una cantidad máxima de 30 ml de mercancías peligrosas de las clases 3 (líquidos inflamables), 8 (sustancias corrosivas) ó 9 (sustancias y objetos peligrosos varios). Cuando esas pequeñas cantidades de mercancías peligrosas se envasen de conformidad con la presente instrucción de envasado, no se aplicará ninguna otra prescripción de la presente Reglamentación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

PNT-RTPM-02

Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública

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.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describen los pasos a seguir de manera general, en la recogida, procesamiento (cuando sea posible) y transporte de las muestras que conllevan sospecha de microorganismos con gran interés y repercusión para la salud pública, ya sea por ser agentes etiológicos de enfermedades emergentes o porque podrían ser potencialmente usados en ataques bioterroristas.

El alcance incluye a todo el personal de enfermería y/o médico encargado de la toma de muestras a estos pacientes, al personal que transporta las muestras en el hospital y fuera de él y a todo el personal sanitario y no sanitario que trabaja en los servicios de Microbiología.

2. FUNDAMENTO

Los patógenos englobados en los dos grupos anteriormente referidos no están presentes con frecuencia en los procedimientos diagnósticos habituales de los laboratorios de Microbiología, por lo que los microbiólogos no solemos estar familiarizados con sus características ni con la recepción y manipulación de las muestras biológicas potencialmente infectadas por ellos.

Aunque existen muchos más microorganismos que forman parte de las enfermedades emergentes y de posibles agentes de bioterrorismo, en este procedimiento solo se señala el manejo de las muestras de algunos de ellos con creciente interés en nuestros días, para que su conocimiento ayude a mantenernos en alerta frente a estos patógenos. El manejo de estas muestras se realizará en función del nivel de bioseguridad del laboratorio, siendo la seguridad en el manejo de las mismas prioritaria y fundamental. La manipulación de las muestras solamente debe ser realizada por personal entrenado y cualificado que se debe encargar además de la custodia y organización del transporte de las mismas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Full versión of Biosafety in Microbiology and Biomedical laboratory (BMBL), 5th edition. En: www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15
2. OMS. Enfermedades epidémicas y pandémicas. Disponibles en: <http://who.int/csr/disease/es>
3. SEIMC Código: GEGMIC 01, 2014. Preguntas frecuentes sobre la actuación de los laboratorios de Microbiología en relación con la infección por el Virus Ebola.
4. Sentinel level clinical laboratory protocols for suspected biological threat agents and emerging infectious diseases En: www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines

4. MUESTRAS

De manera general, en la obtención de muestras para estudios microbiológicos siempre se deben cumplir las precauciones estándar que protegen frente a la mayoría de los microorganismos, y sólo en aquellas en las que se sospeche un patógeno que necesite un nivel de bioseguridad tipo 3 o 4, la protección para el paciente y para el personal que realiza la toma se convierte en una prioridad. Es en estos casos, cuando la utilización de los equipos de protección personal se convierte en una acción de obligado cumplimiento y la recolección y el manejo de las muestras debe ser realizada únicamente por personal entrenado y con conocimientos técnicos sobre estos patógenos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La obtención de muestras de algunos de estos microorganismos y sus condiciones de conservación se detallan a continuación en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Muestras y conservación de bacterias con interés en salud pública

Microorganismo	Muestras	Transporte	Comentarios
<i>Francisella tularensis</i>	Aspirado de nódulos linfáticos, raspados, Biopsia de la lesión, Médula ósea Esputo	TA >2h 2-8°C	Contenedor estéril y evitar la desecación Torunda con medio de transporte Amies
	Sangre Suero	TA 2-8°C	Fascos hemocultivos 1 ml suero sin anticoagulante
<i>Bacillus anthracis</i>	Vesícula o escara Heces Esputo, Líquido pleural LCR Sangre	TA	Aspirar el fluido o utilizar 2 torundas (dacron) Fascos hemocultivos (aerobios y anaerobios) Evitar la desecación
	Tejidos		
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Sangre Médula ósea	TA	Fascos hemocultivos Lisis-centrifugación
<i>Yersinia pestis</i>	Esputo	TA; >2h 2-8°C	Contenedor estéril, evitar la desecación
	Sangre	TA	
	Aspirado, biopsia o tejido	TA; >2h 2-8°C	

Abreviaturas: TA (temperatura ambiente), LCR (líquido cefalorraquídeo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

Tabla 2. Muestras y conservación de virus con interés en la salud pública

Microorganismo	Muestras	Transporte	Comentarios
Virus Zika	Suero Orina (para diagnóstico primario)	2-8°C 48h-7días (-20°C) >7 días (-70°C)	Otras muestras posibles: plasma, LCR, líquido amniótico y sangre
Virus de la gripe A y B	Torunda nasofaríngea o Aspirado nasal (MTV) Espudo y LBA Aspirado endotraqueal (pacientes intubados) Suero	2-8°C >72h (-70°C) 2-8°C	Torundas de dacron y varilla de plástico o aluminio. No usar de algodón.
Coronavirus (SARS-CoV) (MERS-CoV)	Muestras del Tracto respiratorio: -inferior (espudo, LBA) -superior (exudado orofaríngeo o nasofaríngeo) Suero Orina y heces	2-8°C >72h (-70°C) 2-8°C 2-8°C	Muestras respiratorias a partir del día 7 de comienzo de los síntomas 2 tomas con 14 días de diferencia Para realizar el seguimiento viral
Virus Ebola	Sangre anticoagulada con EDTA	TA >24h 2-8°C	Otras muestras: orina, heces, sáliva, conjuntiva, semen, secreción vaginal, vómitos

Abreviaturas: TA (temperatura ambiente), LCR (líquido cefalorraquídeo), MTV (medio de transporte para virus), LBA (lavado broncoalveolar), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-IRB-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

4.2. TRANSPORTE

Las sustancias infecciosas de la categoría A y designadas UN 2814 o UN 2900 solamente pueden ser transportadas en embalajes que cumplen las especificaciones correspondientes a la clase 6.2 de Naciones Unidas y la Instrucción de embalaje/envasado P620, que se reproduce a continuación. Las diversas disposiciones mencionadas se exponen en la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas.

Se autorizan los siguientes envases, siempre que se respeten las disposiciones especiales de envasado que figuran a continuación:

Envases que reúnan los requisitos del capítulo 6.3 y hayan sido aprobados en consecuencia, consistentes en:

- a) Envases interiores que comprendan:
- i) uno o varios recipientes primarios estancos
 - ii) un recipiente secundario estanco
 - iii) salvo en el caso de las sustancias infecciosas sólidas, un material absorbente colocado entre el recipiente o recipientes primarios y el recipiente secundario, en cantidad suficiente para absorber la totalidad del contenido; si se colocan varios recipientes primarios frágiles en un solo envase secundario, se envolverán individualmente o se separarán entre sí para impedir todo contacto entre ellos
- b) Un envase exterior rígido
- Barriles (1A1, 1A2, 1B1, 1B2, 1N1, 1N2, 1H1, 1H2, 1D, 1G)
 - Cajas (4A, 4B, 4N, 4C1, 4C2, 4D, 4F, 4G, 4H1, 4H2)
 - Bidones (3A1, 3A2, 3B1, 3B2, 3H1, 3H2)
 - La dimensión exterior mínima no será inferior a 100 mm

Requisitos adicionales:

1. Los envases interiores que contengan sustancias infecciosas no se agruparán con envases interiores que contengan mercancías que no sean afines. Los bultos completos podrán colocarse en un sobreenvase de conformidad con lo dispuesto en 1.2.1 y 5.1.2; ese sobreenvase podrá contener hielo seco.
2. No tratándose de envíos excepcionales, como órganos enteros que requieran un envase especial, las sustancias infecciosas serán envasadas con arreglo a las siguientes disposiciones:
 - a) Sustancias expedidas a temperatura ambiente o a una temperatura superior: los recipientes primarios serán de vidrio, de metal o de plástico. Para asegurar la estanqueidad se utilizarán medios eficaces tales como termosoldaduras, tapones de faldón o cápsulas metálicas engastadas. Si se utilizan tapones roscados, éstos se reforzarán con medios eficaces tales como bandas, cinta adhesiva de parafina o cierres de fijación fabricados con tal fin
 - b) Sustancias expedidas refrigeradas o congeladas: se colocará hielo, hielo seco o cualquier otro producto refrigerante alrededor del (de los) recipiente(s) secundario(s) o, en el interior de un sobreenvase que contenga uno o varios bultos completos marcados según lo prescrito en 6.3.3. Se colocarán unos calzos interiores para que el (los) embalaje(s) secundario(s) o los bultos se mantengan en su posición inicial cuando el hielo se haya fundido o el hielo seco se haya evaporado. Si se utiliza hielo, el envase exterior o el sobreenvase habrán de ser estancos. Si se utiliza hielo seco, el envase exterior o el sobreembalaje/sobreenvase habrán de permitir la salida del gas carbónico. El recipiente primario y el envase secundario conservarán su integridad a la temperatura del refrigerante utilizado
 - c) Sustancias expedidas en nitrógeno líquido. Se utilizarán recipientes primarios de plástico capaces de soportar temperaturas muy bajas. El envase secundario también habrá de poder soportar temperaturas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

muy bajas y, en la mayoría de los casos, tendrá que ajustarse sobre el recipiente primario individualmente. Se aplicarán asimismo las disposiciones relativas al transporte de nitrógeno líquido. El recipiente primario y el envase secundario conservarán su integridad a la temperatura del nitrógeno líquido

d) Las sustancias liofilizadas también podrán transportarse en recipientes primarios que consistan en ampollas de vidrio termoselladas o viales de vidrio con tapón de caucho y provistos de un precinto metálico

3. Sea cual fuere la temperatura prevista para la sustancia durante el transporte, el recipiente primario o el envase secundario habrán de poder resistir, sin que se produzcan fugas, una presión interna que produzca una diferencia de presión de no menos de 95 kPa y temperaturas de entre $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-40\text{ }^{\circ}\text{F}$ a $+130\text{ }^{\circ}\text{F}$).
4. En el mismo envase de las sustancias infecciosas de la división 6.2 no deberá haber otras mercancías peligrosas, a menos que sean necesarias para mantener la viabilidad de las sustancias infecciosas, para estabilizarlas o para impedir su degradación, o para neutralizar los peligros que presenten. En cada recipiente primario que contenga sustancias infecciosas podrá envasarse una cantidad máxima de 30 ml de mercancías peligrosas de las clases 3 (líquidos inflamables), 8 (sustancias corrosivas) ó 9 (sustancias y objetos peligrosos varios, incluidas sustancias peligrosas para el medio ambiente). Cuando esas pequeñas cantidades de mercancías peligrosas de las clases 3, 8 ó 9 se envasen de conformidad con la presente instrucción de envasado, no se aplicará ninguna otra prescripción de la presente Reglamentación.
5. Las autoridades competentes podrán autorizar otros embalajes/envases para el transporte de sustancias de origen animal, de conformidad con las disposiciones de 4.1.3.7.

Disposiciones especiales de embalaje/envasado

1. Los expedidores de sustancias infecciosas se asegurarán de que los bultos estén preparados de manera que lleguen a su destino en buenas condiciones y no representen un riesgo para las personas o animales durante el transporte.
2. Una relación del contenido situada entre el embalaje/envase secundario y el embalaje/envase exterior.
3. Cuando no se conozcan las sustancias infecciosas que van a transportarse, pero se sospeche que cumplen los criterios para su inclusión en la categoría A, la indicación «sustancia infecciosa de la que se sospecha que pertenece a la categoría A», deberá figurar en el documento de transporte del interior del envase exterior, entre paréntesis, a continuación de la designación oficial de transporte.
4. Antes de devolver al expedidor un embalaje/envase vacío o de enviarlo a otra parte, será desinfectado o esterilizado para neutralizar cualquier posible riesgo y se desprenderá o borrará cualquier etiqueta o marca que indique que ha contenido una sustancia infecciosa.

Las instrucciones de envasado y condiciones de transporte para las sustancias infecciosas de la categoría B se describen en el protocolo científico y técnico PNT-RTPM-01.

4.3. REGISTRO

Se procederá de la misma manera que lo descrito para las muestras generales que se detalla en el PNT-RTPM-01, procurando que todo el proceso lo realice una única persona cumpliendo de forma estricta en todo momento las normas de bioseguridad en el laboratorio.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se procederá de la misma manera que lo descrito para las muestras generales que se detalla en el PNT-RTPM-01, procurando que todo el proceso lo realice una única persona cumpliendo de forma estricta en todo momento las normas de bioseguridad en el laboratorio.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Para bacterias cultivables en laboratorios de bioseguridad tipo II/III

Agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey

Agar Thayer-Martin y agar BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract)

Caldo Tioglicolato o BHI (Brain Heart Infusion)

Frascos de hemocultivos

Aceite de inmersión

Reactivos para la tinción de Gram

6. APARATOS Y MATERIAL

- Equipos de protección individual (bata de apertura posterior y capucha, calzas, mascarilla FFP2 o FFP3, gafas de montura integral o pantalla facial completa, guantes nitrilo largos o doble guante)
- Cabina de seguridad biológica tipo II/III
- Asas calibradas desechables
- Pipetas Pasteur estériles
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta estériles
- Placas de Petri estériles
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Hojas de bisturí estériles
- Guantes
- Contenedores de residuos.
- Papel parafilm
- Jarras de incubación
- Sistemas generadores de atmósfera de CO₂
- Estufas (de aerobiosis y de CO₂)
- Neveras y congeladores (almacenaje de placas y reactivos)
- Microscopio óptico
- Centrífugas (opcional)
- Sistemas automáticos hemocultivos (opcional)

7. PROCESAMIENTO

Los laboratorios de Microbiología en nuestro país tienen un nivel de bioseguridad tipo 2 (excepto el Centro Nacional de Microbiología que tiene un laboratorio de nivel 3) y el procesamiento de la mayoría de los patógenos que se describen en este procedimiento no difiere del que se realiza con las muestras habituales, siempre que se sea riguroso con el cumplimiento de las medidas de seguridad en el laboratorio. Se recomiendan las cabinas de clase II cuando se realizan actividades con un alto potencial de producir aerosoles, que hay que evitar en la

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

medida de lo posible. Es de destacar que los rotores de las centrifugas deben estar sellados herméticamente y que sólo se abrirán dentro de las cabinas de bioseguridad y que se debe evitar el uso del *vórtex* para agitar.

Bacterias:

Para *Bacillus anthracis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Yersinia pestis* y *Francisella tularensis* los medios utilizados son los convencionales: agar sangre (AS), agar chocolate (CH) y agar MacConkey (McK) y caldos de enriquecimiento como tioglicolato o BHI. Para *Francisella tularensis* además utilizar placas de Thayer Martin o BCYE que son medios suplementados con cisteína, y caldo de tioglicolato, que tiene que ir suplementado con un 1% de Isovitalax.

La incubación de las placas de agar sangre y agar chocolate se realizará a 35°C-37°C en atmósfera de CO₂ y en atmósfera de aerobiosis las placas de MacConkey y el caldo de enriquecimiento. Para *Yersinia pestis* hay que sembrar por duplicado los medios de cultivo para poder incubarlos además a 25-28°C. El tiempo de incubación para *Yersinia pestis* es de 5-7 días, y en el caso de *Francisella tularensis* las muestras de tejido se mantendrán hasta 7 días y los hemocultivos hasta 10 días, realizando un subcultivo ciego al finalizar el periodo de incubación. Durante la incubación todas las placas deben permanecer selladas y se deben examinar diariamente. También puede realizarse el diagnóstico mediante técnicas serológicas para *Yersinia pestis* (detección del antígeno f1) y *Francisella tularensis*.

Virus:

- Virus Zika: el diagnóstico de este virus se realiza mediante métodos serológicos y moleculares (RT-PCR) sin embargo, en la mayoría de los pacientes no se detecta ARN del virus después de la primera semana de la enfermedad. Por este motivo, el virus se detecta en orina al menos 2 semanas después del comienzo de los síntomas. La OMS recomienda las estrategias siguientes para el diagnóstico:

- Análisis de ácidos nucleicos en pacientes cuyos síntomas hayan comenzado hace menos de 7 días.
 - Serología y/o análisis de ácidos nucleicos en pacientes cuyos síntomas hayan comenzado hace 7 días o más.
- La serología es el método preferido en muestras de pacientes cuyos síntomas hayan comenzado hace más de 7 días. Si se utilizan análisis de ácidos nucleicos, los resultados negativos deben interpretarse con cautela, pues no descartan la infección, dado que la viremia disminuye rápidamente 7 días después del inicio de los síntomas y puede no ser detectada por las pruebas en el límite inferior de la sensibilidad. Para todas las muestras distintas de suero hay que obtener a la vez muestras de suero para detectar IgM. El estudio en LCR se hará solo si hay complicaciones neurológicas. Los laboratorios que utilicen pruebas panflavivíricas combinadas con secuenciación génica u otros métodos moleculares convencionales, como las pruebas múltiples de detección de *Flavivirus*, deben asegurarse de que las secuencias cebadoras internas hayan sido actualizadas para detectar los linajes recientes del Virus Zika.

Dado que se han documentado coinfecciones por el Virus Zika y otros *Arbovirus* y teniendo en cuenta la circulación endémica de *Flavivirus*, los análisis para el Virus Zika deberían realizarse junto con análisis para los Virus del dengue y la fiebre chikungunya, de forma secuencial.

- Virus Ebola: en la actualidad las muestras se centralizan en el laboratorio de referencia nacional (CNM Instituto Carlos III). El diagnóstico molecular se debe realizar en laboratorios con nivel de contención tipo 3, ya que, si bien la técnica en sí misma puede llevarse a cabo en áreas de nivel de bioseguridad tipo 2 utilizando muestras inactivadas, la inactivación se debe realizar en una zona de bioseguridad tipo 3 o utilizando una cabina de bioseguridad tipo III. El cultivo de virus sólo puede hacerse única y exclusivamente en laboratorios de nivel de seguridad tipo 4.

- Virus Influenza: el diagnóstico mediante técnicas rápidas de detección antigénica de gripe es una práctica habitual de todos los laboratorios de Microbiología, pero la sensibilidad de estas pruebas varía en relación a los subtipos, obteniéndose por ejemplo poca sensibilidad para N1H1 y N5H1. Las pruebas rápidas de detección de antígenos y las pruebas moleculares (RT-PCR) se pueden realizar en una cabina de bioseguridad tipo II y en laboratorios con nivel de bioseguridad tipo 2. El cultivo proporciona el diagnóstico más específico, pero éste

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recogida y transporte de muestras para detección de microorganismos con gran relevancia en la salud pública	PNT-RTPM-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

sólo puede hacerse en laboratorios con nivel de bioseguridad tipo 3.

- Coronavirus (MERS): para el diagnóstico de infección por este virus se utilizarán las técnicas moleculares (RT-PCR) que detectan ARN vírico en muestras clínicas. Para estudios de vigilancia o de investigación se utilizarán los métodos serológicos. No se precisan medidas habituales de protección para el manejo de este patógeno, siendo suficientes las precauciones estándar utilizadas de forma habitual.

8. 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. La supervisión de las técnicas y de los envíos a centros de referencia deberá realizarla siempre un especialista en Microbiología.

9. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Si inadvertidamente se procesan muestras con sospecha de patógenos altamente peligrosos en un laboratorio tipo 2, se sellarán las placas y se pasará la muestra preferiblemente a una zona de bioseguridad tipo 3 o al área de micobacterias que suele ser la que presenta mayor nivel de protección en todos los laboratorios. Si se ha utilizado algún material o aparataje, se procederá a la descontaminación de los mismos, así como de las superficies de trabajo siguiendo las instrucciones del fabricante o utilizando desinfectantes habituales, la OMS recomienda una dilución 1:10 de lejía comercial.

Todo el personal del laboratorio sin excepción deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad del laboratorio.

Todo el personal tiene que estar entrenado en la utilización de los equipos de protección individual.

Todos estos patógenos están incluidos en las enfermedades de declaración obligatorias (EDO) y se debe comunicar su sospecha y/o detección a las autoridades sanitarias competentes.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las identificaciones erróneas más frecuentes de *Francisella tularensis* son *Haemophilus influenzae* y *Aggregatibacter* spp.

Algunos de los sistemas automatizados no identifican adecuadamente *Yersinia pestis*, se puede confundir con *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Acinetobacter* spp. o *Pseudomonas* spp.

El fracaso en detectar ARN del Virus Zika no excluye la infección por este virus.

No se deben procesar muestras que no sean de pacientes con sintomatología clínica.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. CDC Laboratory testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) en www.cdc.gov/coronavirus/mers/infection-prevention-control.html
2. CDC Guidance for US Laboratories testing for Zika virus infection. En www.aphl.org/programs/preparedness/crisis-management/pages/Zika.aspx
3. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. 2015. Manual of Clinical Microbiology, 11th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
4. Amy L. Leber. 2016. Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 1-3, 4th edition. American Society for Microbiology Washington, D.C.
5. Pérez Saénz JL (Coordinador). 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>