

Anexo 4.

Recomendaciones sobre bioseguridad en el laboratorio de micobacterias y revisión de la normativa

Publicado con permiso del editor. Fuente original: *Enferm. Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25 (Suppl 3): 52-59.

© 2007 Elsevier España, SL. Todos los derechos reservados.

© 2014 Elsevier España, SL y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, SL. Todos los derechos reservados.

Recomendaciones sobre bioseguridad en el laboratorio de micobacterias y revisión de la normativa

Lorena López-Cerero^{a,b}, Jaime Esteban-Moreno^{b,c} y Julià González-Martín^{b,d}

^aServicio de Microbiología, Hospital Virgen Macarena, Sevilla, España.

^bGrupo de Estudio de las Infecciones por Micobacterias (GEIM) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

^cDepartamento de Microbiología Clínica, Fundación Jiménez Díaz-UTE, Madrid, España.

^dDepartament de Microbiologia, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona-IDIBAPS, Barcelona, España.

Para la microbiología clínica, *Mycobacterium tuberculosis* supone un microorganismo cuya manipulación es difícil, ya que entraña el riesgo de exponerse a un patógeno de transmisión principalmente aérea que requiere una contención de nivel 3. En estos momentos, la mayoría de los accidentes en el laboratorio de micobacterias puede reducirse mediante la práctica de procedimientos microbiológicos adecuados, el uso de dispositivos de contención y protección y un diseño de las instalaciones apropiado. La legislación actual contempla el grado de responsabilidad de las instituciones sanitarias y del personal del laboratorio, y define específicamente el nivel de bioseguridad requerido para el procesamiento de muestras para micobacterias. El respeto a las recomendaciones en contención primaria y secundaria, así como el control sistemático del personal de laboratorio y la elaboración de planes de actuación frente a accidentes, contribuyen a minimizar los riesgos de ser infectado y proteger a la comunidad.

Palabras clave: Bioseguridad. Laboratorio de micobacteriología. Legislación.

Biosafety recommendations in the mycobacteriology laboratory and review of legislation

In clinical microbiology, *Mycobacterium tuberculosis* is a difficult microorganism to manipulate because of the risk of exposure to this mostly air-borne transmitted pathogen which requires level 3 biosafety. At present, most laboratory accidents involving mycobacteria can be reduced by carrying out suitable microbiologic procedures, the use of safety and protection devices, and the design of appropriate installations. Current legislation defines the level of responsibility of healthcare institutions and

laboratory personnel and specifically stipulates the level of biosafety required for processing specimens containing mycobacteria. Adherence to primary and secondary safety recommendations, systematic monitoring of laboratory personnel, and the design of proactive plans to prevent accidents help to minimize the risk of infection and provide adequate protection for the community.

Key words: Biosafety. Mycobacteriology laboratory. Legislation.

Introducción

El personal de laboratorios clínicos y de investigación está expuesto a un riesgo significativo de infección por patógenos; uno de los más importantes es *Mycobacterium tuberculosis*. La incidencia de tuberculosis en el personal que maneja muestras potencialmente contaminadas con *M. tuberculosis* es de 3 a 9 veces más frecuente que la observada en individuos que no trabajan con ese tipo de muestras^{1,2}. Las especies del complejo *M. tuberculosis* son patógenos de transmisión fundamentalmente aérea, incluidas en el grupo de riesgo 3 según la directiva europea³ y la legislación española⁴. La inclusión de *M. tuberculosis* en este grupo se debe a que puede producir enfermedad grave y propagarse a la comunidad, pero para la que se dispone de tratamiento eficaz. Otras micobacterias que están incluidas dentro del mismo riesgo biológico son *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium ulcerans*, aunque no se han descrito infecciones en personal de laboratorio. Una mención debería hacerse sobre la aparición reciente de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes (MDR-TB) y con multirresistencia ampliada (XDR-TB)⁵ que, a pesar de que pueden producir infecciones de muy difícil tratamiento, no reciben una consideración especial por las clasificaciones internacionales de riesgo biológico. Tampoco se han documentado hasta la fecha infecciones accidentales por este tipo de cepas multirresistentes en personal de laboratorio. Aunque son escasas las muestras remitidas que realmente contienen micobacterias patógenas (1-10%), en la valoración del riesgo que supone su manipulación deben considerarse 2 aspectos importantes. En primer lugar, la dosis infecciosa (ID) en humanos es relativamente baja

Correspondencia: Dr. J. González Martín.
Servicio de Microbiología, Hospital Clínic,
Villarroel, 170 escalera 11, 3ª planta, 08036 Barcelona, España.
Correo electrónico: gonzalez@clinic.ub.es

(ID₅₀ 1-10 bacilos), mientras que un esputo de un paciente bacilífero puede contener > 10⁸ bacilos/ml de muestra⁷. En segundo lugar, el tamaño de los aerosoles que se generan en cada procedimiento. Las gotas pequeñas se secan rápidamente, transformándose en pequeños núcleos deshidratados (diámetro ≤ 5 µm) que pueden permanecer en el aire durante horas y ser inhaladas. Las gotas grandes no se secan fácilmente y pueden contaminar superficies y dedos, y pueden dar lugar a contaminación secundaria de la boca y la cavidad nasal. En la contaminación secundaria hay que tener en cuenta que la supervivencia estimada de *M. tuberculosis* es de 90 a 120 días en el polvo, 105 días en papel y 45 días en la ropa⁸.

En estos momentos disponemos de material, equipo y conocimientos que pueden disminuir las infecciones ocupacionales en el laboratorio. A pesar de ello, en una encuesta realizada en nuestro país en 26 laboratorios de micobacterias, más de un tercio del personal observaba deficiencias, como falta de sistemas de filtración efectivos o presión negativa en la zona de trabajo⁹. Teniendo en cuenta el riesgo inherente al manejo de muestras y cultivos para micobacterias, es importante revisar las normativas y recomendaciones que contemplan aspectos de bioseguridad en el laboratorio de micobacterias, considerando tanto la contención primaria como la secundaria y el control del personal.

Además de las distintas medidas que se desarrollan a continuación, la bioseguridad en el laboratorio de micobacterias debe entenderse con una visión amplia que se aplique a todas las actuaciones, y con una filosofía de monitorización continua tendente a minimizar, en todo lo posible, el riesgo y las posibilidades del azar. Es por ello que es necesario que los laboratorios dispongan de protocolos de trabajo desarrollados de todas las técnicas relacionadas con la instalación, así como de un manual de bioseguridad propio que, además de la información sobre las medidas de contención primaria, secundaria y de prevención sanitaria del personal, contemple las operaciones, la frecuencia y los criterios de aceptación de las revisiones de mantenimiento, así como las actuaciones en caso de incidentes y accidentes. La eficacia de estas medidas exige que todos los trabajadores del laboratorio de micobacterias las conozcan.

Contención primaria

La contención primaria protege de una forma inmediata al personal mediante varias medidas: una práctica microbiológica adecuada y las medidas de barrera de tipo primario, como los equipamientos de seguridad y los equipos de protección individual (EPI). Las prácticas microbiológicas adecuadas constituirían las normas universales, como no comer en el laboratorio, no pipetear con la boca, eliminación adecuada de residuos, lavado de manos al salir del laboratorio, etc., recogidas en la nota técnica de prevención del Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo (INHST)¹⁰ y detalladas en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹¹ y de los Centers for Disease Control (CDC) norteamericanos¹². A estas recomendaciones universales hay que añadir las prácticas propias de un nivel de tipo 3, como el acceso limitado o restringido al personal autorizado por el respon-

sable del laboratorio, cierre obligatorio de las puertas de acceso, control periódico del personal, restricción del uso de material de vidrio y jeringas, así como la obtención de steros iniciales del personal. Hay que tener en cuenta que el equipamiento de seguridad o la ingeniería de ventilación más sofisticados no suplen un procesamiento inseguro o una rutina no controlada.

Equipos de protección individual

Respecto a los equipos de protección individual, tanto la normativa europea⁴ como la española⁵ coinciden en que debe ser la institución sanitaria la encargada de proveer de la ropa y los equipos de protección individual necesarios, así como de su lavado, descontaminación y, si es necesario, su destrucción. El tipo de EPI que se debe utilizar no se especifica en estos documentos, pero está incluido el uso de guantes, batas y mascarillas en la nota técnica de prevención elaborada por el INHST^{13,14}, aunque no se considera necesario el empleo de calzado específico.

Una descripción más detallada del tipo y el uso que se debe dar a los EPI se encuentra en las recomendaciones de la OMS¹¹. El tipo de bata apropiada debe ser de abotonadura trasera y de manga que cubra todo el antebrazo. Es importante el uso de guantes, incluso durante todo el contacto inicial con las muestras, sobre todo teniendo en cuenta que se ha detectado contaminación con *M. tuberculosis* en el exterior del 6,5% de los contenedores de muestras clínicas¹⁵. En la actualidad, no existen guantes específicos frente al riesgo biológico. Se considera que los guantes impermeables que superan los ensayos de resistencia a la penetración (al agua y al aire), y se ensayan según la Norma UNE-EN 374-2, protegen de forma suficiente, aunque no frente a perforaciones o cortes. Respecto a la utilización de mascarillas respiratorias u otros dispositivos de protección respiratoria, se restringe la recomendación de su empleo a procedimientos de alto riesgo, como limpieza de derrames o apertura de cultivos fuera de una cabina de seguridad. El diseño de estas mascarillas debe responder a las especificaciones de eficacia filtrante de FFP3 según la ISO/CD 16900-2 para proteger de agentes biológicos, y pueden ser desechables o de uso personal. Las mascarillas quirúrgicas no se consideran equipos de protección respiratoria, según la Resolución de 25 de abril de 1996, de la Dirección General de Calidad y Seguridad Industrial. Un aspecto importante recogido en la legislación española y europea^{4,5} es la obligación del personal del laboratorio de quitarse las prendas protectoras, aunque no requiere cambio de vestuario completo, así como los guantes y mascarillas al salir de la zona de trabajo y que sean almacenadas, o si es necesario destruidas, en lugares separados de otras ropas de trabajo.

Equipamiento de seguridad

Los equipamientos de seguridad incluyen equipos como las cabinas de seguridad biológica, centrifugas de seguridad, autoclaves y contenedores de transporte y de residuos. La necesidad de un equipamiento de seguridad se menciona en la legislación^{4,5}, pero no se detalla ni se especifica el tipo de equipo que debe emplearse durante el procesamiento de las muestras o los cultivos. Existe una diferenciación en cuanto al riesgo biológico entre las diferentes fases del procesamiento de muestras. Técnicas como la realización de extensiones para tinción o apertu-

TABLA 1. Medidas recomendadas para laboratorios de nivel 3 de seguridad biológica^{15,11,12,24}

Medidas	Organismo ^a				
	CDC-NIH (BMBL 5 ^a ed)	ASM (Manual Clin Microbiol, 9. ^a ed)	OMS-WHO (LBM 3. ^a ed)	Unión Europea Directiva (2000/54/CE)	España (RD 664/1997)
Separación física de otras áreas de trabajo o pasillos	Sí	Sí	Sí	Aconsejable	Aconsejable
Filtrado del aire a través de filtros HEPA	Sí	Sí	Sí (dependiendo de los patógenos)	Sí, para el aire extraído	Sí, para el aire extraído
Acceso restringido	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Presión negativa respecto a la atmosférica	Sí	Sí	Sí	Aconsejable	Aconsejable
Superficies impermeables y de fácil limpieza	Sí	Sí	Sí	Sí, para el banco de trabajo y suelo	Sí, para el banco de trabajo y suelo
Área de trabajo precintable para su desinfección	Sí	Sí	Sí	Aconsejable	Aconsejable
Superficies resistentes a sustancias químicas	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Ventanillas o dispositivos alternativos para poder ver a los ocupantes	No especificado	No especificado	No especificado	Aconsejable	Aconsejable ^b
Laboratorio con equipo propio	Sí	Sí	Sí	Aconsejable	Aconsejable ^b
Uso de cabinas de bioseguridad para manipulación de muestras o cultivos	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Disponibilidad de autoclave o incinerador	Sí	Sí	Sí	Sí (disponible)	Sí (disponible)
Acceso a través de doble puerta de cierre automático	Sí	Sí	Sí	No especificado	No especificado ^b
Controles periódicos del personal mediante prueba tuberculífrica o equivalente	Sí ^c	Sí	Recomienda controles periódicos, sin especificar la técnica	No especificado	No especificado ^b

^aPara las abreviaturas de los organismos, véase texto.^bRecomendado en la Guía técnica del INSHT¹⁰.^cRecomendado en Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Settings³.

ra de contenedores con muestras clínicas pueden llevarse a cabo en una contención de nivel 2 según las recomendaciones de los CDC¹⁵. Sin embargo, durante la fijación de las extensiones se pueden generar aerosoles¹⁶, por lo que este procedimiento debería realizarse en el interior de cabinas de seguridad^{12,17}. Además, hay que considerar que pueden originarse derrames durante el manejo de muestras clínicas, por lo que la OMS¹¹ y la guía técnica del INSHT¹⁰ difieren en este aspecto de las indicaciones de los CDC y recomiendan la apertura de los contenedores de muestras en la cabina de seguridad. Las recomendaciones de la OMS y de los CDC especifican la necesidad de cabinas de seguridad (tipo I, II o III) para toda apertura de cultivos micobacterianos y todos los procedimientos que impliquen generación de aerosoles, como pipeteo u homogeneización con agitadores o vórtex.

Cuando se llevan a cabo extracciones de ADN o ARN mediante reactivos comerciales, sonicación o mediante inactivación térmica, no se suele tener en cuenta la supervivencia de *M. tuberculosis* tras estos procesos. Se ha estudiado que entre un 8 y un 77%^{18,19} de las muestras pueden contener bacilos viables tras ser tratadas para extracción de ácidos nucleicos o proteínas, por lo que, cuando los diferentes procesos de inactivación y extracción no puedan garantizar su total inactivación, deben manipularse en cabinas. El uso correcto de las cabinas de seguridad que describen las guías incluye la colocación de todo el material necesario para el trabajo en su interior, priorizando el equipo que pueda generar aerosoles en la parte posterior, el flujo adecuado de trabajo dentro de la cabina y su funcionamiento continuo las 24 h del día, aunque las de tipo IIA pueden apagarse después de su uso.

Otros dispositivos de contención física son las centrifugadoras de seguridad para la concentración de las muestras tras la descontaminación que, según las recomendaciones de la OMS¹¹, deben disponer de cubetas de seguridad antiaerosoles o rotores de contención. Una alternativa posible, si sólo se dispone de una centrifuga que careciera de sistema antiaerosol, o en el caso de microcentrifugas sin tapas de seguridad transparentes, es su utilización en el interior de una cabina de seguridad biológica, aunque podría suponer el requerimiento de varias cabinas de seguridad para el trabajo diario. A este instrumental de contención primaria de tipo físico hay que añadir los contenedores secundarios de transporte de muestras, que la OMS recomienda que sean estancos. Se valora también la conveniencia de una autoclave en el laboratorio de micobacterias para el tratamiento de todo residuo. No se requiere el autoclavado de los residuos en el interior del laboratorio de micobacterias si el material de desecho es transportado fuera mediante contenedores herméticos, irrompibles e impermeables.

Contención secundaria

Las barreras o medidas de contención secundaria son fundamentalmente las establecidas en las instalaciones en las que se manipulan cepas o muestras con micobacterias, así como la regulación de la eliminación de residuos, las condiciones de obtención y transporte de las muestras hasta el laboratorio y las normas de acceso de personas a estas dependencias.

Transporte de las muestras

Contempla el período desde la obtención de las muestras hasta su recepción en el laboratorio de micobacterias. En general, pueden establecerse dos situaciones: el transporte interno dentro de un mismo centro hospitalario o laboratorio y el transporte externo. Este último puede ser, a su vez, entre centros de una misma ciudad o de diferentes ciudades o países, pudiendo intervenir distintos métodos de transporte. En ningún caso deben transportarse muestras directamente en la mano.

Para el transporte interno deben usarse contenedores rígidos, de fácil limpieza y con materiales absorbentes en su interior que impidan la extravasación, por ejemplo, las neveras portátiles. Las muestras en su interior deben ubicarse en otros recipientes que impidan su movilidad, como gradillas de seguridad cuando sean tubos. Son más adecuados los contenedores con asas que permitan transportarlos cerca del suelo para evitar roturas en caso de caída. Dentro del hospital o centro es conveniente seleccionar la ruta que evite el contacto con el público, usando ascensores y pasillo de uso médico¹¹.

En el transporte externo pueden utilizarse servicios de mensajería, paquetería, correo u otros sistemas de envío. Existen unas normas y recomendaciones internacionales sobre las condiciones de envío y de embalaje. Las normas parten de recomendaciones de la OMS²⁰ adoptadas por la ONU y organizaciones internacionales de transporte, actualizadas en 2003 y 2004^{21,22}. Las sustancias infecciosas se clasifican en la clase 6.2 y las muestras con *M. tuberculosis*, al igual que las restantes con agentes biológicos que afecten a humanos, corresponden a la identificación ONU 2814. Como norma general, no está permitido el transpor-

te de sustancias infecciosas sin identificar y las compañías aéreas no permiten que los pasajeros las transporten en la cabina ni tampoco utilizando valija diplomática. El conductor del vehículo o responsable del medio de transporte ha de conocer la naturaleza del material que transporta y las medidas a tomar en caso de rotura o derrame del contenido de los recipientes.

Deben usarse contenedores internacionalmente homologados de forma que los embalajes consten de 3 capas: a) un recipiente primario, de vidrio o plástico de buena calidad, capaz de cerrar herméticamente y en el que se coloca la muestra; el recipiente primario ha de envolverse en material absorbente como algodón, celulosa o toallas de papel, en cantidad suficiente para absorber el contenido si se vierte; b) un recipiente secundario que contenga al primario, utilizando material de relleno para evitar movimientos del contenedor primario, y c) un contenedor externo, de material suficientemente resistente para protegerlo de influencias externas. En este último están las etiquetas de identificación de destino y procedencia, así como la señal indicativa de riesgo biológico.

Generalmente, el punto de recepción es el laboratorio de microbiología. Es necesario establecer un sistema de ventanilla para impedir el acceso al interior a personas ajenas al servicio. La manipulación de contenedores y recipientes ha de hacerse en el interior de cabinas de seguridad biológica. Si en el momento de la recepción existen dudas sobre la integridad de las muestras en el interior de los contenedores o de los recipientes, han de introducirse en una bolsa de plástico y abrirlos en el interior de una cabina de seguridad o proceder a su esterilización.

Acceso al laboratorio de micobacterias

La legislación y las normativas españolas e internacionales establecen las condiciones que deben cumplir las dependencias que manipulen muestras o cepas de microorganismos clasificados en el grupo 3^{4,5,10,12,23}. Las instalaciones donde se lleven a cabo deben estar físicamente separadas del resto del laboratorio de microbiología. El acceso ha de llevarse a cabo mediante un sistema de doble puerta que asegure que la instalación siempre esté cerrada y sellada, y se recomienda que sean de apertura automática. Entre ambas puertas puede existir una antesala con vestuarios. En lugar visible debe colocarse el símbolo de peligro biológico internacionalmente aceptado. Es aconsejable que el laboratorio de micobacterias esté dotado de una ventanilla de observación o cámaras que permitan ver a sus ocupantes, así como poner de manifiesto accidentes o incidentes que puedan ocurrir^{4,5}. Asimismo, el acceso ha de estar restringido a personas relacionadas con el laboratorio de micobacterias o expresamente autorizadas para realizar tareas de mantenimiento o similares, que deben llevar ropa protectora (bata u otro tipo de equipo) de uso exclusivo en el laboratorio, nunca ropa de calle. Por otra parte, la guía técnica del RD 664/1997¹⁹ indica que está prohibida la entrada en instalaciones de contención tipo 3 a las personas con elevado riesgo de contraer infecciones o aquellas para las que puedan resultar especialmente peligrosas. En el resto de los casos, el Real Decreto 664/1997 obliga a realizar una evaluación de riesgos de todo el personal que vaya a trabajar en estas instalaciones, y es obligatorio mantener un registro de éstos durante un período de 10 años^{5,10}.

Diseño de las instalaciones

El sistema de ventilación de la instalación es una de las medidas más importantes en la estructura física del laboratorio de micobacterias (tabla 1). Así, la entrada y la salida del aire han de estar canalizadas, de forma que el aire entre en el laboratorio de micobacterias desde las zonas de acceso al interior y que el aire de salida vaya directamente al exterior, sin recirculación y limpiado mediante filtros HEPA antes de salir. Los filtros HEPA han de estar dispuestos de forma que permitan fácilmente su revisión y cambio cuando sea necesario. Para asegurar el flujo de ventilación adecuado, la legislación española^{6,10} y de la Unión Europea⁴ consideran recomendable la instalación de un sistema de presión negativa. Normativas de otras instituciones obligan a esta instalación^{11,12,23}. El sistema de presión negativa poseerá dispositivos que permitan monitorizar la integridad de su funcionamiento por parte del personal del laboratorio. En este sentido, cabe instalar alarmas sonoras y/o visuales que indiquen cambios en el sistema de presión negativa^{11,23}. Si hay tomas de vacío, también deberán dotarse de filtro HEPA. Las superficies de paredes y techos deberán estar diseñadas de forma que permitan el funcionamiento del sistema de ventilación sin fugas. Estas superficies, además del suelo, deberán ser impermeables y permitir su limpieza y desinfección. La instalación de aire acondicionado y calefacción debe ser independiente de la del resto del laboratorio de microbiología, de forma que no comparta circuito de aire. Además, deberán calcularse los flujos de corriente para que no alteren la presión negativa¹¹.

Las normas que establecen los CDC¹² para la contención de *M. tuberculosis* indican que pueden ser aceptables laboratorios de micobacterias que no cumplan estrictamente los requisitos estructurales de la instalación, por ejemplo respecto al sellado de paredes y techos, siempre y cuando se mantengan el flujo direccional de aire desde la entrada al laboratorio hacia la salida al exterior mediante filtros HEPA y sistema de presión negativa.

El laboratorio de micobacterias debe poseer un sistema de seguridad para almacenar agentes biológicos, y es aconsejable que los materiales y reactivos sean de uso propio, no compartido con el resto del laboratorio de microbiología^{4,5,10-12,23,24}. También debe existir en el laboratorio un lavabo, que pueda accionarse con el pie o con el codo. Asimismo, las tuberías o cañerías en el interior del laboratorio de micobacterias deberán estar debidamente protegidas para permitir su limpieza y desinfección, y deberán poseer mecanismos que eviten el reflujo de agua de llegada a la instalación¹¹. El manual de bioseguridad de la OMS indica que la limpieza de los materiales y superficies de trabajo y estructurales del laboratorio debe realizarla personal del laboratorio¹¹. Del mismo modo, las poyatas, las mesas y el mobiliario deberán ser de materiales robustos, de fácil limpieza y resistentes a ácidos, álcalis y disolventes^{4,5,10-12,23,24}.

Debe asegurarse de forma periódica el mantenimiento y revisión del funcionamiento de los sistemas de ventilación y filtrado HEPA. La legislación española^{6,10} y de la Unión Europea⁴ no indican con qué periodicidad han de llevarse a cabo, aunque los CDC¹² señalan que debe ser anual. Las normas de la OMS¹¹ no hacen mención respecto a los laboratorios con contención tipo 3, aunque indican que en los laboratorios tipo 4 los filtros HEPA deben revisarse

anualmente. Otras normas, como la Guía de bioseguridad canadiense²⁵, especifican los rangos de las condiciones físicas, leídas por manómetros u otros dispositivos indicadores, que aseguran un buen funcionamiento y, por tanto, cuándo debe calibrarse o cambiarse la instalación.

La legislación española^{6,10} también indica que debe disponerse de un control eficiente de vectores, como roedores e insectos, con procedimientos de desinfección especificados, y considera aconsejable que pueda precintarse para su desinfección.

Desinfección y eliminación de residuos

El uso de desinfectantes está reservado para cuando no sea posible la esterilización. En la práctica, deben aplicarse para la limpieza de superficies, materiales y neutralización de derrames y vertidos. Su efectividad está influida por diversos factores, como son la presencia de materia orgánica (sangre, esputo, tejidos y otras muestras), que disminuyen la actividad de los hipocloritos, por la temperatura, la humedad relativa, la concentración del desinfectante y su tiempo de contacto. La elección del desinfectante adecuado es compleja debido a la amplia gama de oferta existente, aunque, en general, la mayoría contiene alguno de los siguientes compuestos o combinaciones de ellos: compuestos de cloro, de amonio cuaternario, de yodo, de fenol y de alcoholes. Atendiendo a su espectro de acción, se dividen en desinfectantes de actividad elevada, intermedia y baja. Entre los primeros destacan los aldehídos, el peróxido de hidrógeno y el ácido paracético. Los compuestos de amonio cuaternario se consideran de baja actividad. Los de actividad intermedia son adecuados para el uso en instalaciones en que se manipulen muestras o cultivos con *M. tuberculosis*. En general, requieren un tiempo mínimo de 20 min de contacto y comprenden los compuestos de cloro, fenol, yodo y los alcoholes. De los compuestos de cloro, el más usual es el hipoclorito sódico y de ellos la lejía doméstica. Se utiliza habitualmente en la limpieza de superficies y suelos, a concentración de 1 g de cloro/l (dilución 1/50 de lejía doméstica) para desinfección limpia y de 5 g de cloro/l (dilución 1/10 de lejía doméstica) para desinfección sucia (derrames o presencia de materias orgánicas). La elección de los desinfectantes se basa en diversos criterios, como son su actividad germicida, los efectos tóxicos o irritantes para las personas, su efecto corrosivo sobre los materiales de metal y su persistencia residual después de su utilización (tabla 2)^{11,12}.

Los materiales contaminados, líquidos y sólidos, han de depositarse en contenedores apropiados y deberán esterilizarse antes de su eliminación. Si se dispone de autoclave en el interior del laboratorio de micobacterias, se esterilizarán antes de trasladarlos fuera de la instalación. Si no es posible, se sacarán los desechos para esterilizar en el interior de contenedores herméticos que no puedan romperse ni verterse y debidamente precintados^{4,5,10-12,23,24}.

Instalaciones radiactivas

En la actualidad, todavía hay en funcionamiento equipos semiautomatizados para la detección de micobacterias mediante cultivo en medio líquido marcado radiactivamente. Estos sistemas, además de las consideraciones sobre seguridad biológica anteriormente expuestas, deben cumplir obligatoriamente la normativa legal vigente sobre

TABLA 2. Características de los desinfectantes tuberculocidas utilizables en laboratorios de micobacterias¹⁸

Tipo	Concentración	Mecanismo	Ventajas	Inconvenientes	Efectos sobre las personas
Compuestos de fenol	0,4-0,5%	Desnaturalización de proteínas	Baratos	Tóxicos, corrosivos, residuos	Irritantes, tóxicos, corrosivos
Iodóforos	75 ppm	Yodación y oxidación de proteínas	Baratos	Caros, inactivados por materia orgánica	Irritantes de piel y mucosas
Glutaraldehído	2%	Entrecruzamiento de proteínas	No corrosivo, no se afecta por otros compuestos	Vapores irritantes, tóxico	Irritante, tóxico
Hipoclorito	500 ppm (cloro libre)	Inactivación enzimática	Barato	Tóxico, corrosivo, inactivado por materia orgánica	Tóxico, corrosivo
Peróxido de hidrógeno	3%	Radicales libres	Estable	Caro, corrosivo	-

instalaciones radiactivas, incluidos los controles del personal que marca la ley en función de este riesgo²⁹.

Control de personal

Al margen de las medidas de contención descritas previamente, una parte muy importante del control biológico en el laboratorio de micobacterias descansa en el establecimiento de medidas destinadas al seguimiento y prevención de la enfermedad en los trabajadores. Este punto es especialmente importante, por cuanto, en numerosas ocasiones, las medidas de contención pueden no aplicarse correctamente, bien por ausencia de éstas, bien por desconocimiento del personal técnico, tal y como se estableció en diversos estudios^{9,26}.

De acuerdo con la Ley de Prevención de Riesgos Laborales, es responsabilidad del trabajador el uso de los medios aportados para la prevención por parte de la empresa¹⁷. El establecimiento de protocolos específicos para el seguimiento de los trabajadores es fundamental. En la actualidad, la legislación vigente^{4,5} no establece normas específicas para el seguimiento del personal en los laboratorios de nivel 3 de seguridad biológica en general, y del laboratorio de micobacterias en particular. No obstante, sí que establecen como responsabilidad del empresario o de la institución la vigilancia adecuada y específica de la salud de los trabajadores en relación con los riesgos por exposición a agentes biológicos (artículo 8 del RD 664/97, artículo 14 de la Directiva 2000/54/CE)^{4,5}. Asimismo, en la misma normativa se establece la necesidad de una formación adecuada del personal sanitario en relación con los riesgos y las precauciones que deben tomar, así como de establecer un programa de vacunación del personal en caso de existir vacunas eficaces frente al patógeno con el que se trabaja^{4,5}. El hecho de que estas directivas legales sean de carácter general hace que no puedan encontrarse en ellas normativas específicas para los laboratorios de micobacterias. Sin embargo, existen numerosas guías técnicas y recomendaciones de diversas autoridades y sociedades científicas que sí especifican más detalladamente cuáles deben ser esas normas.

En el caso de la tuberculosis (y, por tanto, de los laboratorios destinados a su diagnóstico), el control del personal sanitario descansa en la detección temprana de la infec-

ción tuberculosa, con el objetivo de establecer, en aquellos casos en los que sea recomendable, un tratamiento de ésta para evitar la aparición de cuadros de enfermedad. Ese control se viene realizando hasta ahora mediante la prueba tuberculínica; la más frecuentemente empleada en nuestro medio es la reacción de Mantoux. La realización de esta prueba es ampliamente recomendada por todas las instituciones y sociedades científicas^{12,17,28-31}. En ese sentido, cada vez que se incorpore un nuevo miembro al laboratorio de microbiología en general, y al de micobacterias en particular, es obligado realizar una historia clínica de exposición a la tuberculosis, así como la realización de una prueba tuberculínica, cuyo resultado se considerará como basal a efectos de seguimiento. En caso de ser positiva, se recomienda la realización de una radiografía de tórax y, en caso de que esté recomendado, el inicio de un tratamiento de la infección latente mediante isoniazida durante 6 meses a 1 año²⁹. En caso de negatividad, se recomienda la repetición de la prueba a los 15 días para evaluar un posible efecto *booster*^{12,17,29,29,31}. En esta primera historia clínica se debe registrar la existencia o no de una vacunación previa con BCG, por el efecto que ésta pudiese tener en el resultado de la prueba tuberculínica.

En caso de que la prueba basal de tuberculina fuese negativa, la recomendación generalizada es que el estudio debe realizarse periódicamente en los casos en los que sea previsible una exposición a *M. tuberculosis*, como es el caso del personal del laboratorio de micobacterias. La periodicidad del estudio, sin embargo, puede ser variable, dependiendo del riesgo relativo de exposición al patógeno. En ese sentido, existe un consenso virtualmente unánime en que debe realizarse al menos un estudio anual en las personas en que el resultado sea negativo^{12,17,28,29,31-34}, y puede hacerse con más frecuencia (semestral) en los casos de elevado riesgo de exposición o en trabajadores especialmente predispuestos por la existencia de algún factor de riesgo, tales como enfermedades que causen inmunodepresión¹⁷. Sin embargo, es fundamental explicar adecuadamente la necesidad de estos estudios al personal, puesto que uno de los principales problemas que se detectan es la baja tolerancia de aquél a la repetición de los estudios, máxime en una prueba cuyo resultado es visible, lo que puede conducir a que el trabajador no acuda a la lectura de la prueba por que interpreta que es negativa y, por consiguiente, a que ese resultado no sea registrado o in-

TABLA 3. Actuaciones frente a la exposición accidental según el tipo de accidente

Orden de la actuación	Pinchazo	Aerosoles	Derrame o rotura
1. ^a	Lavado de la herida	Cierre de la centrifuga (1 h)	Cubrir con papel absorbente
2. ^a	Desinfección	Evacuación	Desinfectante
3. ^a	Atención médica	Restricción de la entrada (1-24 h)	Retirada de vidrio con pinzas
4. ^a	Control posterior	Descontaminación con: • Ropa protectora • EPI respiratorio	Retirada del material desinfectado al contenedor de residuos

cluso sea mal evaluado por personal inexperto en la lectura de la prueba³¹.

A la hora de realizar la interpretación de los resultados, se debe considerar al personal sanitario como de alto riesgo de contagio, por lo que en nuestro país el valor a emplear para evaluar la positividad de la prueba será de ≥ 5 mm³². Los criterios de conversión que deben aplicarse serán los mismos que para la población general y los recomendados para el personal sanitario. Además, en caso de detectarse un caso de conversión, se recomienda la realización de una prueba extraordinaria al resto del personal, que se repetirá a intervalos de 3 meses, en tanto y en cuanto aparezcan nuevas conversiones^{17,29}.

Recientemente, se ha aprobado en Estados Unidos una normativa para el empleo de las pruebas de detección de liberación de interferón gamma (IGRA)³⁶. En este documento se autoriza el empleo de estas pruebas para los mismos casos en que se empleen las pruebas tuberculínicas clásicas, incluido el seguimiento de trabajadores sanitarios con alto riesgo de contagio. En las nuevas recomendaciones de los CDC sobre prevención de transmisión de la tuberculosis en instituciones sanitarias, ya se incluyen estas nuevas pruebas como una alternativa al Mantoux, y se establecen incluso pautas para la interpretación de los resultados³¹, por lo que esas pruebas podrían figurar como parte de los protocolos de seguimiento del personal expuesto al contagio, como es el que trabaja en los laboratorios de micobacterias.

Un segundo apartado que se debe contemplar en el seguimiento del personal es la posibilidad de vacunación. La legislación vigente establece como obligación del empresario el establecer un sistema de vacunación del personal siempre que exista una vacuna eficaz^{4,5}. Sin embargo, el hecho de que la actual vacuna BCG tenga una utilidad poco precisa hace que la mayoría de las instituciones opte por no recomendar la vacunación sistemática del personal del laboratorio de micobacterias^{12,17,28,29,32,33}. No obstante, en el caso del personal que trabaje habitualmente con cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes, o donde la posibilidad de contagio por parte de estos organismos sea grande, sí que se recomienda la vacunación con BCG para las personas cuya prueba tuberculínica sea negativa. Esta recomendación se realiza fundamentalmente por la falta de tratamientos eficaces para la infección latente causada por esas cepas^{17,28,29}.

En caso de accidente en el trabajo que implique la aerosolización de cultivos positivos, el seguimiento del personal cambia, y deben realizarse pruebas tuberculínicas basales en el momento inmediatamente posterior al accidente y posteriormente cada 2-3 meses mientras se detecten conversiones entre los miembros del laboratorio expuestos al contagio^{12,17,29,33}.

No existe, en el momento actual, ninguna contraindicación oficial para trabajar en el laboratorio de micobacterias durante el embarazo^{4,5,28}. En este caso, el seguimiento puede hacerse normalmente³¹. Habría que tener en cuenta el estado de la paciente sólo si se necesita realizar radiografías en caso de conversión de la prueba tuberculínica. En cualquier caso, dado el riesgo que puede presentar la tuberculosis para la madre y el feto, la realización de ese estudio no estaría contraindicada³¹. De la misma forma, no estaría contraindicado el tratamiento de la infección tuberculosa latente con los protocolos habituales basados en el empleo de isoniazida.

Actuación en caso de accidente

La legislación europea y la española^{4,5} recogen de forma específica que es responsabilidad de la institución sanitaria la elaboración de un plan de urgencia contra una exposición a un agente biológico del grupo 3 en caso de fallo de la contención física. Ambas normativas también detallan que debe estar, por escrito y en el lugar de trabajo, el procedimiento a seguir en caso de accidente, y que el personal del laboratorio debe comunicar inmediatamente cualquier accidente o incidente a la persona responsable de la seguridad en el laboratorio. Existen 3 posibles accidentes dentro del laboratorio de micobacterias: a) derrames o rotura de viales de cultivo líquido; b) fallo en la contención de aerosoles por rotura de centrifuga, y c) pinchazos accidentales. La implantación de procedimientos seguros ha conseguido que algunos accidentes sean excepcionales, como la ingesta accidental debido a la prohibición universal del pipeteo con la boca, y la aerosolización mediante el calentamiento de asas, al usar asas desechables. El pinchazo accidental es poco frecuente, pero puede producir transmisión de tuberculosis en el personal³⁷. El plan de emergencia debe incluir: notificación inmediata, evacuación, eliminación del agente y control tras la exposición. En el manual de seguridad de la OMS³¹ se detallan las actuaciones recomendadas en cada tipo de accidente (tabla 3).

Bibliografía

1. Germanaud J, Jamet M. Tuberculose et personnel hospitalier. Enquête retrospective dans les hôpitaux du centre de la France. *Médecine Hyg.* 1994;52:1593-2.
2. Sepkowitz KA. AIDS, tuberculosis, and the health care worker. *Clin Infect Dis.* 1995;20:232-42.
3. Shinnick TM, Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin Infect Dis.* 1995;21:291-9.

4. Directiva 2000/u4/EC del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Diario Oficial, 2000; n.º L 262 de 17 de octubre de 2000:0021-45.
5. Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Boletín Oficial del Estado, 1997.
6. Centres for Disease Control. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2000-2004. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2006;55:301-5.
7. Ridley RL. Airborne pulmonary tuberculosis. *Bacteriol Rev.* 1961;25:243-8.
8. Rubin J. *Mycobacterial disinfection and control*. En: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization and preservation*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991.
9. Vazquez M, Gómez P, Romero M, Casal MJ, Spanish-Group-of-Mycobacteriology. Investigation of biological risk in mycobacteriology laboratories: a multicentre study. *Int-J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:879-85.
10. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales; 2001.
11. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3.ª ed. Ginebra: OMS; 2006.
12. Centres for Disease Control. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5.ª ed. Washington: U.S. Department of Health and Human Services; 2007.
13. Constans A. Nota técnica de prevención NTP 376. Exposición a agentes biológicos: seguridad y buenas prácticas en el laboratorio. Disponible en: <http://www.wntases/insh/ntp/ctbiologios.htm>
14. Martí C, Alonso RM, Constans A. Nota técnica de prevención NTP 572. Exposición a agentes biológicos. La gestión de equipos de protección individual en centros sanitarios. Disponible en: <http://www.wntases/insh/ntp/ctbiologios.htm>
15. Allen BW, Darrell JH. Contamination of specimen container surfaces during sputum collection. *J Clin Pathol.* 1983;36:479-81.
16. Allen BW. Survival of tubercle bacilli in heat-fixed sputum smears. *J Clin Pathol.* 1981;34:719-22.
17. Centres for Disease Control. Proposed Guidelines for Goals for Working Safely with *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical, Public Health, and Research Laboratories. 1997.
18. Blackwood KS, Burdz T, Turenne C, Sharma M, Kabani A, Wolfe J. Viability testing of material derived from *Mycobacterium tuberculosis* prior to removal from a containment level-III laboratory as part of a laboratory risk assessment program. *BMC Infectious Diseases.* 2005;2:4.
19. Somerville W, Thibert L, Schwartzman K, Behr MA. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2996-7.
20. Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos. Ginebra: OMS; 1997.
21. Organización Mundial de la Salud. Transport of infectious substances. Ginebra: OMS; 2004.
22. Organización de las Naciones Unidas. Recommendations on the transport of dangerous goods. 13th revised ed. New York y Geneva: ONU; 2003.
23. Center of Emergency Preparedness and Response. Laboratory biosafety guidelines. Canada: Ministry of Health; 2004.
24. Loza E, Alomar P, Bernal A, Harlo A, Perez JL, Picazo JJ, et al. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. SEIMC; 2000.
25. Real Decreto 783/2001, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes. Boletín Oficial del Estado 2001:27284-303.
26. Tam CM, Leung CC. Occupational tuberculosis: a review of the literature and the local situation. *Hong Kong Med J.* 2006;12:448-54.
27. Ley 31/1995 de Prevención de Riesgos Laborales. Boletín Oficial del Estado, 1995.
28. Protocolos de Vigilancia Específica: Agentes Biológicos. En: Ministerio de Sanidad y Consumo, editores. Ministerio de Sanidad y Consumo; 2001.
29. Richmond JY, Knudsen RC, Good RC. Biosafety in the Clinical Mycobacteriology Laboratory. *Clin Lab Med.* 1996;16:527-50.
30. Rodríguez-Bayarri MJ, Madrid-San-Martin P. Tuberculosis pulmonar como enfermedad profesional. *Arch Bronconeumol.* 2004;40:463-72.
31. Centres for Disease Control. Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Settings, 2005. *MMWR.* 2005;54(No. RR-17).
32. Bolyard EA, Tablan OC, Williams WW, Pearson ML, Shapiro CN, Deitchman SD, et al. Guideline for infection control in health care personnel, 1998. *Am J Infect Cont.* 1998;23:289-354.
33. Alcáide-Fernández de Vega F, Esteban-Moreno J, González-Martín J, Palacios-Gutiérrez JJ. *Micobacterias*. SEIMC; 2005.
34. Pflyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007. p. 543-72.
35. Grupo de trabajo sobre tuberculosis. Consenso nacional para el control de la tuberculosis en España. *Med Clin (Barc).* 1992;98:24-31.
36. Centres for Disease Control. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis; recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, and Guidelines for using the QuantiFERON®-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR.* 2005;54(No. RR-15).
37. Oymak SP, Gülmez I, Demir K, Osezmi M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by accidental needlestick. *Respiration.* 2000;67:696-7.