

Muestreo de superficies de gran tamaño para el control de la contaminación de entornos críticos mediante el Sistema de Concentración de Muestras FluidPrep™

Nota de Aplicación

Revisión A*



Introducción:

Los métodos tradicionales de muestreo de superficies proporcionan resultados notoriamente pobres. Los hisopos comunes de muestreo de superficies limitan a los usuarios a superficies muy pequeñas y la eficacia de la recogida suele ser escasa. La mayoría de los kits de hisopos se fabrican para análisis basados en cultivos que requieren una incubación de varias horas o días y muchos patógenos de interés pueden ser viables, aunque no cultivables.

La recuperación de una muestra de superficie a partir de un hisopo para métodos moleculares rápidos requiere líquido adicional para el enjuague que a menudo diluye el objetivo más allá del límite de detección del ensayo.

El Laboratorio de Propulsión (JPL-Jet Propulsion Laboratory) de la NASA, Instituto de Tecnología de California, Grupo de Biotecnología y Protección Planetaria, Pasadena, CA, EE.UU., desarrolló el siguiente método de muestreo de superficie de gran extensión, para el muestreo de bacterias y hongos en las superficies de la Estación Espacial Internacional. Este nuevo método utiliza la pipeta concentradora InnoVaprep para concentrar la muestra final en volúmenes inferiores a un mililitro (véanse las publicaciones de referencia más abajo).

«Los análisis basados en cultivos limitan la comprensión de la diversidad de microbios que crecen y prosperan en las superficies porque sólo una pequeña fracción de los organismos de un entorno determinado puede cultivarse en condiciones de laboratorio estándar. Los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y la secuenciación de amplicones dirigida, que pueden identificar y cuantificar tanto los organismos cultivables como los no cultivables, proporcionan una evaluación más exhaustiva de lo que está realmente presente y en qué cantidades.» - NASA.

El Sistema de Concentración de Muestras FluidPrep CP Select™ (pipeta concentradora) InnoVaprep concentra rápidamente los microorganismos, logrando una concentración de hasta 10.000 veces a partir de muestras líquidas. El sistema filtra la muestra y, a continuación, emplea un método de elución por espuma húmeda para recuperar rápidamente los microorganismos en un volumen mucho menor. La facilidad de uso del sistema y su capacidad para proporcionar factores de concentración excepcionalmente altos lo convierten en un método ideal para el análisis rápido de muestras de superficies de gran tamaño.

El sistema de Concentración de Muestras FluidPrep CP Select™ es apropiado para bacterias, mohos, esporas y virus. El método es adecuado para diversas aplicaciones, como la seguridad alimentaria, la investigación de brotes, la vigilancia de enfermedades, incluidas las infecciones hospitalarias, la salud animal y la vigilancia de salas limpias.

El método utiliza toallitas de poliéster humedecidas estériles estándar para tomar muestras de superficies u objetos de gran superficie, de hasta un metro cuadrado. Las toallitas se colocan en un frasco con 200 ml de solución tampón, se agitan o se mezclan en un vórtex y, a continuación, el líquido se concentra (en minutos) desde 200 ml hasta un volumen final de aproximadamente 250 µl utilizando el Sistema de Concentración de Muestras FluidPrep CP Select™ (pipeta concentradora). El factor de concentración logrado mediante este procedimiento es de aproximadamente 800X, multiplicado por la eficacia (normalmente 50-90%).

Materiales Necesarios:

- **Instrumento: CP Select (InnovaPrep)**
- **Consumibles:**

Consumibles CP Select (a elegir entre los siguientes):

- **Búfer de Elución:**
 - **Tris** Item # HC08001 (para métodos moleculares)
 - **PBS** Item # HC08000 (para cultivos)
- **Puntas de Pipeta Concentradoras (CPTs):** (consulte la Guía de selección de consumibles para obtener más información)
 - **Ultrafiltro CPTs** – Item # CC08003-10
 - **0.05 µm CPTs** – Item # CC08020-10
 - **0.2 µm CPTs** – Item # CC08022-10
- **Fluido de almacenamientoCP** – item # HC08558 para la descontaminación del sistema
- **Tween 20** - para la adición de muestras
- **Toallitas estériles de poliéster**
 - Disponibles en formato seco y estéril - Véanse los siguientes ejemplos de Texwipe
 - STX1709 9 x 9" estéril seco Serie Revolve
 - STX1712 12 x 12" estéril seco Serie Revolve
 - STX1709P 9 x 9" estéril, prehumedecido, 70% IPA Serie Revolve
 - STX1712P 12 x 12" estéril, prehumedecido, 70% IPA Serie Revolve
 - TX3225 12 x 12" estéril seco Textra 10
- Pinzas esterilizadas (opcional)
- **Botella de muestra de 500 mL** - para la recuperación de la muestra
- **Solución salina estéril con búfer de fosfato** - (PBS; pH 7,4) - 200 mL por toallita para la elución

Si se utilizan toallitas secas, se requieren materiales adicionales:

- **Agua estéril de grado molecular**
- **Bolsas de plástico con cierre hermético**
 - Se recomienda el tamaño de un cuarto de galón para que quepan las toallitas y el búfer.

Compatibilidad de los métodos de análisis para virus utilizando la técnica de elución por espuma húmeda (Wet Foam Elution™)

La tecnología Wet Foam Elution™ se desarrolló como un método complementario para prácticamente cualquier método de análisis, ya sean métodos moleculares modernos o cultivos clásicos. Sin embargo, existe una advertencia en relación con los virus.

El agente espumante, Tween 20, un componente del búfer de elución FluidPrep, tiene un efecto diferente dependiendo de si el virus está encapsulado o no. Los virus no encapsulados están rodeados por una cubierta proteica, comúnmente denominada cápside. La cápside es bastante robusta y no se daña fácilmente con el Tween, por lo que tanto los ensayos

moleculares como los de placa son compatibles con los virus no encapsulados. Sin embargo, el Tween 20 puede afectar a las células de mamíferos utilizadas para ensayos de placa o ensayos TCID50, por lo que podría ser necesaria una dilución del concentrado.

Los estudios han indicado que la adición de un 0,5% de Tween 20 puede mejorar la recuperación de virus utilizando la elución por espuma húmeda y que hasta un 0,05% no es probable que altere el virus. Los virus encapsulados también tienen una cubierta proteica, pero esta cápside está encerrada dentro de una membrana lipídica externa. Aunque los efectos pueden variar mucho en función del virus, es posible que el Tween 20 pueda alterar la envoltura vírica o impedir que el virus se adhiera a las células y penetre en ellas. Como resultado, en algunos casos sólo los ensayos moleculares son compatibles para los virus con envoltura o encapsulados.

SEGURIDAD:

Debido a la posible presencia de patógenos infecciosos en las muestras, los usuarios deben trabajar con el equipo de seguridad laboral de su organización para asegurarse de que los métodos y las medidas de seguridad son apropiados y están aprobados. A menos que se trabaje con muestras que se sabe que no son infecciosas, InnovaPrep recomienda que las operaciones de CP Select se realicen en una cabina de bioseguridad.

PASO 1 - Prepare las toallitas de muestra (Omita este paso si utiliza toallitas prehumedecidas y continúe con el Paso 2).

- Seleccione la toallita seca que prefiera y dóblela por la mitad dos veces.
- Sumerja cada toallita en 15 ml de agua estéril de grado molecular durante 30 minutos.
Nota: La adición de Tween 20 al 0,05% al agua «(Soak Water)» y/o al « búfer de recogida de muestras» puede mejorar la recuperación de SARS-CoV-2 y otros organismos objetivo.
- Transfiera cada toallita a una bolsa de plástico estéril separada que pueda cerrarse herméticamente.

PASO 2 - Método de muestreo

- Utilizando guantes o unas pinzas esterilizadas, extraiga una de las toallitas previamente empapadas del envase o de la bolsa de plástico.
- Utilice la toallita para tomar muestras de superficies de hasta un metro cuadrado, incluidos pomos, asas, grietas u objetos (plásticos, vidrio, metales, madera lisa, etc.).
- Después de recoger la muestra, transfiera la toallita a una botella de 500 mL que contenga 200 mL de solución salina estéril búfer de fosfato (PBS; pH 7,4).

PASO 3 - Tratamiento de la muestra

- Agite la botella con la toallita durante 2 minutos.
- Concentre la muestra líquida utilizando el InnovaPrep CP Select™ siguiendo las recomendaciones del menú de la guía del usuario.

PASO 4 - Análisis de la muestra

- Las muestras son adecuadas para una variedad de cultivos y métodos rápidos, incluyendo PCR/qPCR digital, RT-PCR/RT-qPCR digital, NGS, etc. Las muestras concentradas por el CPT ya están listas para el análisis y cualquier otro paso de tratamiento posterior.
- Almacene las muestras líquidas preconcentradas o postconcentradas a 4 °C.

Notas:

Las puntas de pipeta concentradora están disponibles en varios tamaños de poro. Los usuarios pueden acceder a la [Guía de selección de consumibles](#) en el sitio web de InnovaPrep para determinar qué punta será la óptima para su objetivo de interés y aplicación.

El eluido final puede analizarse mediante cultivo clásico o métodos moleculares rápidos de su elección.

Agrupar y concentrar varias muestras en una única muestra concentrada puede ser útil para determinadas aplicaciones, como la monitorización de salas blancas, ya que puede reducir los costes de análisis y mejorar la sensibilidad del método. Al utilizar este enfoque, es importante tener en cuenta que la identificación de la ubicación exacta de un resultado positivo puede requerir un muestreo adicional o el análisis de alícuotas reservadas.

**Por favor, consulte nuestra web para obtener la metodología más actualizada, ya que se publican actualizaciones periódicamente.*

Referencias:

[2022 - Genomic Characterization of Parengyodontium torokii sp. nov., a Biofilm-Forming Fungus Isolated from Mars 2020 Assembly Facility](#)

[2022 - Microbial Burden Estimation of Food Items, Built Environments, and the International Space Station Using FilmMedia](#)

[2022- Draft Genome Sequences of Fungi Isolated from Mars 2020 Spacecraft Assembly Facilities](#)

[2022 - The Isolation and Characterization of Rare Mycobiome Associated With Spacecraft Assembly Cleanrooms](#)

[2021 - Clean room microbiome complexity impacts planetary protection bioburden](#)

[2020 - Description of Chloramphenicol Resistant Kineococcus Rubinsiae sp. nov. Isolated from a Spacecraft Assembly Facility](#)

[2020 - Crewmember microbiome may influence microbial composition of ISS habitable surfaces](#)

[2020 - Characterization of Spacesuit Associated Microbial Communities and their Implications for NASA Missions](#)

[2019 - Characterization of the Total and Viable Bacterial and Fungal Communities Associated with the International Space Station Surfaces](#)

[2017 - Human presence impacts fungal diversity of inflated lunar/Mars analog habitat](#)

[2016 - Characterization of Aspergillus Fumigatus Isolates from Air and Surfaces of the International Space Station](#)

[2016 - Microbial succession in an inflated lunar/Mars analog habitat during a 30-day human occupation](#)