Amostragem de grandes áreas superficiais para controlo de contaminação em ambientes críticos utilizando o Sistema de Concentração de Amostras FluidPrep™

Nota de aplicação

Revisão A*

Introdução:

Os métodos tradicionais de amostragem de superfícies apresentam resultados notoriamente insatisfatórios. Os cotonetes comuns para amostragem de superfície limitam os utilizadores a áreas muito pequenas, e a eficiência da recolha é frequentemente baixa. A maioria dos kits de recolha é fabricada para análises baseadas na cultura, que requerem incubação durante várias horas ou dias, e muitos agentes patogénicos de interesse podem ser viáveis, mas não cultiváveis.
A recolha de uma amostra de superfície através de um cotonete para métodos moleculares rápidos requer um fluido de enxaguamento adicional que, frequentemente, dilui o alvo para além do limite de deteção do ensaio.

O Laboratório de Propulsão a Jacto (JPL) da NASA, do Instituto de Tecnologia da Califórnia, Grupo de Biotecnologia e Proteção Planetária, em Pasadena, Califórnia, EUA, desenvolveu o seguinte método de amostragem de superfícies em larga escala para recolher amostras de bactérias e fungos nas superfícies da Estação Espacial Internacional. Este novo método utiliza a pipeta concentradora InnovaPrep para concentrar a amostra final em volumes inferiores a um mililitro (ver publicações referenciadas abaixo).

> "As análises baseadas em culturas limitam a nossa compreensão da diversidade de micróbios que crescem e prosperam em superfícies, porque apenas uma pequena fração dos organismos num determinado ambiente pode ser cultivada em condições laboratoriais padrão. Os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e a sequenciação de amplicons direcionados, que podem identificar e quantificar organismos cultiváveis e não cultiváveis, fornecem uma avaliação mais abrangente do que está realmente presente e em que quantidades." - NASA

O Sistema deConcentração da amostra FluidPrep CP Select™ ((Pipeta concentradora) O InnovaPrep concentra rapidamente microrganismos, atingindo concentrações até 10.000 vezes superiores a partir de amostras líquidas. O sistema filtra a amostra e, em seguida, utiliza um método de eluição por espuma húmida para recuperar rapidamente os microrganismos num volume muito mais pequeno. A facilidade de utilização do sistema e a capacidade de fornecer fatores de concentração excecionalmente elevados tornam-no ideal para a análise rápida de grandes amostras de superfície.

O sistema de concentração de amostras FluidPrep CP Select™ é adequado para bactérias, fungos, esporos e vírus. O método é apropriado para uma variedade de aplicações, incluindo segurança alimentar, investigação de surtos, vigilância epidemiológica (incluindo infeções hospitalares), saúde animal e monitorização de salas limpas.

O método utiliza toalhitas de poliéster estéreis padrão para recolher amostras de grandes superfícies ou objetos, com uma área até um metro quadrado. Os toalhetes são colocados num frasco contendo 200 ml de solução tampão, agitados ou homogeneizados em vortex, sendo depois o líquido concentrado (em poucos minutos) de 200 ml até um volume final de aproximadamente 250 µl utilizando o Sistema de Concentração de Amostras FluidPrep CP Select™ (pipeta concentradora). O factor de concentração obtido por este procedimento é de aproximadamente 800 vezes, multiplicado pela eficiência (tipicamente de 50 a 90%).

Materiais necessários:

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

Consumíveis CP Select (escolha de entre os seguintes):

- **Solução tampão de eluição:**
  - **Tris**Artigo nº HC08001 (para métodos moleculares)
  - **PBS**Artigo nº HC08000 (para culturas agrícolas)
- **Ponteiras de pipeta concentradoras (CPTs):**(Consulte o Guia de Seleção de Consumíveis para mais informações)
  - **Ultrafiltro CPTs**– Artigo nº CC08003-10
  - **CPTs de 0,05 µm**– Artigo nº CC08020-10
  - **CPTs de 0,2 µm**– Artigo nº CC08022-10
- **Fluido de armazenamento CP**– Artigo nº HC08558 para descontaminação do sistema

- **Pré-adolescente 20 -**para a adição de amostras
- **Toalhetes humedecidos estéreis de poliéster**
  - Disponível em formato seco e estéril - Veja os seguintes exemplos da Texwipe.
  - STX1709 Série Revolve Estéril Seca 9 x 9”
  - STX1712 12 x 12” Série Revolve estéril e seca
  - STX1709P 9 x 9” estéril, pré-humedecido, 70% IPA Série Revolve
  - STX1712P 12 x 12” estéril, pré-humedecido, 70% IPA Série Revolve
  - TX3225 12 x 12” Textra 10 estéril e seco
- Pinças esterilizadas (opcional)
- **Frasco de amostra de 500 mL**- para recuperação de amostras
- **Solução salina estéril com tampão fosfato**- (PBS; pH 7,4) - 200 mL por lenço para eluição

Caso utilize toalhitas, serão necessários materiais adicionais:

- **Água estéril de grau molecular**

- **Sacos de plástico com fecho hermético**
  - Recomenda-se um recipiente de um quarto de galão (aproximadamente 950 ml) para acomodar os toalhetes húmidos e a esponja de limpeza.

Compatibilidade de métodos de análise viral utilizando a técnica de eluição por espuma húmida (Wet Foam Elution™)

A tecnologia Wet Foam Elution™ foi desenvolvida como um método complementar para praticamente qualquer técnica analítica, desde os métodos moleculares modernos até às culturas tradicionais. No entanto, existe uma ressalva em relação aos vírus.
O agente espumante Tween 20, um componente do tampão de eluição FluidPrep, tem um efeito diferente consoante o vírus seja ou não envelopado. Os vírus não envelopados estão rodeados por uma camada proteica, vulgarmente chamada de capsídeo. O capsídeo é bastante resistente e não é facilmente danificado pelo Tween, pelo que tanto os

ensaios moleculares como os de placas são compatíveis com vírus não envelopados. No entanto, o Tween 20 pode afetar as células de mamíferos utilizadas para ensaios em placa ou TCID50, sendo necessária a diluição do concentrado.

Estudos indicaram que a adição de 0,5% de Tween 20 pode melhorar a recuperação viral por eluição em espuma húmida, e que concentrações tão baixas como 0,05% provavelmente não alteram o vírus. Os vírus envelopados também possuem um revestimento proteico, mas este capsídeo está envolvido por uma membrana lipídica externa. Embora os efeitos possam variar bastante dependendo do vírus, o Tween 20 pode romper o envelope viral ou impedir que o vírus se ligue e penetre nas células. Consequentemente, em alguns casos, apenas os ensaios moleculares são adequados para vírus envelopados.

SEGURANÇA:

Devido à potencial presença de agentes patogénicos infecciosos nas amostras, os utilizadores devem trabalhar com a equipa de segurança no trabalho da sua organização para garantir que os métodos e as medidas de segurança são adequados e aprovados. A menos que se trate de amostras comprovadamente não infeciosas, a InnovaPrep recomenda que as operações com CP Select sejam realizadas numa cabine de segurança biológica.

PASSO 1 - Prepare os toalhetes humedecidos para a amostra (Salte este passo se utilizar toalhetes humedecidos e continue para o Passo 2).

- Selecione o toalhete humedecido da sua preferência e dobre-o ao meio duas vezes.
- Mergulhe cada toalhete humedecido em 15 ml de água estéril de grau molecular durante 30 minutos.
  Nota: A adição de 0,05% de Tween 20 à "água de imersão" e/ou à "solução tampão de recolha de amostras" pode melhorar a recuperação do SARS-CoV-2 e de outros organismos-alvo.
- Transfira cada toalhete humedecido para um saco de plástico estéril separado que possa ser bem fechado.

ETAPA 2 - Método de Amostragem

- Utilizando luvas ou pinças esterilizadas, retire um dos toalhetes humedecidos da embalagem ou do saco de plástico.
- Utilize o lenço humedecido para recolher amostras de superfícies até um metro quadrado, incluindo maçanetas, puxadores, fissuras ou objetos (plásticos, vidro, metais, madeira lisa, etc.).
- Após a recolha da amostra, transfira o toalhete humedecido para um frasco de 500 mL contendo 200 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS; pH 7,4).

ETAPA 3 - Tratamento da amostra

- Agite o frasco com o toalhete humedecido durante 2 minutos.
- Concentre a amostra líquida utilizando o InnovaPrep CP Select™ seguindo as recomendações do menu do manual do utilizador.

ETAPA 4 - Análise da Amostra

- As amostras são adequadas para uma variedade de métodos de cultura e rápidos, incluindo PCR digital/qPCR, RT-PCR/RT-qPCR digital, NGS, etc. As amostras concentradas pelo CPT estão prontas para análise e quaisquer etapas de processamento subsequentes.
- Armazene as amostras líquidas pré-concentradas ou pós-concentradas a 4°C.

Notas:

As ponteiras concentradoras para pipetas estão disponíveis em vários tamanhos de poros. Os utilizadores podem aceder aoGuia de Seleção de ConsumíveisVisite o site da InnovaPrep para determinar qual a ponta que será a mais adequada para a utilização e aplicação pretendidas.

O eluato final pode ser analisado por cultura clássica ou por métodos moleculares rápidos da sua escolha.

A combinação e concentração de múltiplas amostras numa única amostra concentrada pode ser útil para certas aplicações, como a monitorização de salas limpas, uma vez que pode reduzir os custos de análise e melhorar a sensibilidade do método. Ao utilizar esta abordagem, é importante notar que a identificação da localização exata de um resultado positivo pode exigir uma amostragem adicional ou a análise de alíquotas reservadas.

**Consulte o nosso website para obter a metodologia mais atualizada, uma vez que as atualizações são publicadas periodicamente.*

Referências:

2022 - Caracterização genómica de Parengyodontium torokii sp. nov., um fungo formador de biofilme isolado de Marte em 2020. Instalação de Montagem

2022 - Estimativa da carga microbiana nos alimentos, ambientes construídos e na Estação Espacial Internacional utilizando Mídia cinematográfica

2022 - Sequências genómicas preliminares de fungos isolados das instalações de montagem da nave Mars 2020

2022 - Isolamento e caracterização de um micobioma raro associado a salas limpas de montagem de naves espaciais

2021 - A complexidade do microbioma em salas limpas impacta a carga biológica na proteção planetária

2020 - Descrição de Kineococcus rubinsiae sp. nov. resistente ao cloranfenicol, isolada de uma nave espacial. Instalação de Montagem

2020 - O microbioma dos tripulantes pode influenciar a composição microbiana das superfícies habitáveis da ISS.

2020 - Caracterização das comunidades microbianas associadas a fatos espaciais e suas implicações para a NASA Missões

2019 - Caracterização das comunidades bacterianas e fúngicas totais e viáveis associadas ao Superfícies da Estação Espacial Internacional

2017 - A presença humana impacta a diversidade fúngica de habitats insuflados análogos à Lua e a Marte.

2016 - Caracterização de isolados de Aspergillus fumigatus do ar e de superfícies da comunidade internacional EspaçoEstação

2016 - Sucessão microbiana num habitat insuflável análogo à Lua/Marte durante 30 dias de ocupação humana.