

En la actualidad, existe poca información sobre las características de los aerosoles que contienen SARS-CoV-2 en el aire, sus patrones de concentración y comportamiento durante la transmisión en el aire debido a las dificultades para tomar muestras de aerosoles cargados de virus y los desafíos en su cuantificación a baja concentración. Tal falta de comprensión limita la evaluación efectiva del riesgo, la prevención y el control de los brotes de la enfermedad COVID-19⁸.

Sin embargo, ya hay varios estudios centrados en este aspecto, en la importancia del aire como vía de transmisión de virus.^{17,8}

Los resultados de estos estudios indican una cierta estabilidad de los virus en el aire dependiendo de las especies y enfatizan la importancia de monitorear el aire para la detección de posibles fuentes de infección, así como la identificación de las vías de transmisión¹.

Además, debe observarse la efectividad de la medida de cuarentena, así como los procedimientos de limpieza y desinfección⁸ como por ejemplo, en los cruceros después de los brotes de norovirus.

Van Doremalen 2020 señaló que los virus patógenos muestran una presencia ambiental prolongada que persiste como aerosoles durante varias horas. El genoma persistente del virus podría detectarse incluso más de 24 h después de la liberación.^{9,11} También puede ocurrir el transporte aéreo a larga distancia de virus patógenos³. Por lo tanto, el desarrollo y la mejora de diferentes métodos para la detección cuantitativa de virus en muestras de aire es importante⁴.

A pesar de que, actualmente, no existen regulaciones oficiales para monitorear los virus en el aire de manera regular, varios científicos que se centran en este tema defienden firmemente la necesidad de monitorear el aire durante los brotes¹.



2. Filtros de membrana de gelatina para tomar muestras de virus del aire

El método de filtro de gelatina es un método fácil, altamente eficiente y sensible para el monitoreo de microorganismos patógenos en el aire, así como de virus.^{1,2,4,6,8}

La idoneidad de los filtros de gelatina solubles en agua, especialmente para el muestreo de virus, ya ha sido probada y comprobada.^{1,4,6,7,8,10,11}

Los filtros son particularmente adecuados ya que muestran una excelente eficiencia de recolección de virus con tasas de retención de hasta 99.76%^{2,6}.

Además, el procedimiento de muestreo de aire con filtros de gelatina permite varias posibilidades para extender el límite de detección inferior a tan solo 10^2 partículas / m^3 ,⁶. Ofrece la opción de prolongar el período de muestreo (muestreo de altos volúmenes de aire, como 2000 l), el área de filtración de 50 cm^2 ($\varnothing 80 \text{ mm}$), caudal de hasta 50 l / min y la reducción del volumen del solvente a un mínimo de $80 - 100 \mu\text{l / cm}^2$ de área de filtro^{4,6,8}.

También están disponibles tamaños de filtro mas pequeños como $\varnothing 47 \text{ mm}$ (área de filtración 17 cm^2) por lo tanto, el volumen de disolvente puede reducirse aún mas a tan solo 1,5-2,0 ml.

La alta idoneidad de los filtros de gelatina fué demostrada por Jaschhof (1992a, 1992b) así como Friese, quien observó que en casos individuales, el filtro de gelatina es superior a otros métodos de muestreo de virus.

Esta eficiencia se logra sin realizar ningún paso adicional de preparación o posprocesamiento para tomar muestras de aerosoles de virus, al tiempo que se mantiene la capacidad de retención de los filtros constantemente alta.⁶

Los filtros de gelatina están disponibles como unidades de filtración pre-ensamblada y pre-esterilizadas listas para ser usadas.

Junto con el muestreador portátil y ligero AirPort® MD8, los filtros de gelatina es un método especialmente adecuado para aplicaciones móviles y proporciona una facilidad de uso excepcional.^{4,6}

Más allá de eso, Jaschhof (1992b) demostró que la duración del muestreo y una humedad relativa de hasta 80 - 85% a 30°C no afectaron negativamente la retención de virus, que arrojó unos resultados promedio del 99,76%.

Otro beneficio muy importante es que durante el muestreo de virus patógenos humanos no se necesita líquido, esto reduce el riesgo de infección del personal que realiza las pruebas analíticas.

La reducción reportada de la infectividad del virus después del muestreo con filtros de gelatina^{1,4} demuestra ser ventajosa ya que las muestras pueden considerarse como material no infeccioso.

Además, la posibilidad de almacenar los filtros de gelatina después del muestreo¹, así como la posibilidad de enviar los filtros de gelatina a otro laboratorio para su posterior análisis antes de la disolución, pueden ser una opción muy beneficiosa para el usuario.

3. Procesamiento de filtros de membrana de gelatina para la detección de virus por análisis de PCR

Tan pronto como el filtro de gelatina se haya disuelto en agua desionizada o cualquier otro tampón o medio apropiado, todas las partículas de virus retenidas en el filtro pueden procesarse y detectarse adicionalmente mediante PCR^{4,8,10,11}.

Para obtener resultados rápidos, sensibles, altamente específicos y fiables sobre la presencia de virus específicos, el PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) es el método de elección^{2,4,8}.

Incluso material sensible de ARN se puede detectar mediante la combinación de filtración de gelatina y qPCR^{1,4,8,11}.

Sin embargo, debe considerarse que la extracción de ARN es un paso crucial en la preparación de la muestra. Por lo tanto, para reducir la pérdida de material genético, se debe prestar especial atención a este paso^{2,4}.

Varios estudios mostraron que un análisis de PCR posterior al muestreo de aire utilizando filtros de gelatina proporciona resultados de recuperación superiores a otros métodos de detección y, por lo tanto, puede considerarse como un método preciso y práctico para la detección de virus en el aire^{4,7}.

4. Procedimiento típico de muestreo de aire utilizando filtros de membrana de gelatina y preparación de muestras posteriores para la detección de virus en el aire por PCR

- 1) Desembale el filtro de gelatina desechable de 80 mm de Ø (ref-nº. 17528--80 ACD)
- 2) Monte el filtro de gelatina desechable en el soporte del filtro para el muestreador de aire MD8 (ya sea r AirPort MD8 (ref-nº. 16757) o MD8 Airscan (ref-nº. 16748))
- 3) Debe evitarse la contaminación del filtro al tocarlo
- 4) Comience el muestreo de aire a una velocidad de p.e. 50 l / min durante 20 min (1000 l es un volumen de muestreo de aire típico)
- 5) La parte superior del soporte del filtro se separa de la base girándola en sentido contrario a las agujas del reloj
- 6) Inserte el filtro de Ø 80 mm en un tubo falcon de 15 ml, el filtro puede romperse fácilmente, (opcionalmente puede usar filtros de 47 mm de Ø)
- 7) Período de almacenamiento opcional y | o envío a laboratorio analítico
- 8) Agregue 4 - 5 ml de solvente o 1,5 - 2 ml para un filtro de Ø 47 mm respectivamente (por ejemplo, agua desionizada estéril o el medio tampón apropiado)
- 9) Colocar en la centrifuga y girar a 3000 × g
- 10) Incubar en un agitador térmico (120 rpm) o un bloque calefactor durante 10 min a 37°C para disolver la gelatina
- 11) Inactivación de virus opcional
- 12) Siga la extracción de ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante
- 13) Disolver ARN
- 14) Adicionar el inhibidor de RNasas optional
- 15) Procesar inmediatamente sobre hielo u opcionalmente almacenar a -80°C
- 16) Sintetice el ADNc mediante transcriptasa inversa usando un kit disponible comercialmente con primer y oligo dT primer en un termociclador
- 17) Almacenaje opcional del ADNc a -20°C
- 18) Realizar el analisis PCR (p.e. qPCR)

5. Áreas de aplicación para la detección de virus patógenos humanos en el aire

Monitoreo de la efectividad del procedimiento de limpieza y desinfección

Monitoreo de la transmisión de virus en aerosol en diferentes áreas hospitalarias, como:

- Áreas de pacientes.
- Áreas del personal sanitario (especialmente vestuarios)
- Áreas públicas
- Áreas de deposición
- Ventilación de las habitaciones
- Servicios de pacientes

Monitoreo de transportes públicos como:

- Aviones
- Trenes, metro y tranvía.
- Cruceros
- Ferris

Monitoreo de áreas públicas con alto tráfico de visitantes, tales como:

- Aeropuertos
- Estaciones de trenes, autobuses e intercambiadores

Identificación y monitoreo de posibles fuentes de infección, formas de transmisión o puntos calientes, tales como:

- Reuniones de personas.
- Centros comerciales.

6. Características clave de los filtros de membrana de gelatina para la toma de muestras de virus y la detección posterior por PCR

- Alta eficiencia de muestreo (retención de hasta el 99,9% de partículas de virus)
- Muestreo de grandes volúmenes de aire posibles (caudal ajustable, diámetro de filtro de hasta \varnothing 80 mm), lo que proporciona la máxima sensibilidad
- Retención efectiva en condiciones ambientales hasta -30 ° C y 80 - 85% de humedad relativa
- Soluble en pequeños volúmenes de líquido (mínimo 80 - 100 μ l / cm^2 de área de filtro), proporcionando así una alta sensibilidad
- Altas tasas de recuperación de ácidos nucleicos.
- No se necesitan líquidos para el muestreo.
- Reducción de la infectividad de virus patógenos humanos.
- Almacenable después del muestreo
- Posible envío en seco después del muestreo sin pérdida de recuperación.
- Los filtros de gelatina disueltos pueden ser procesados posteriormente con métodos de prueba rápidos como PCR
- Excelente facilidad de uso.



Fig. 2: Filtro de gelatina

References

1. Azhar EI, Hashem AM, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Aburizaiza AS, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Jamjoom GA, Madani TA. 2014. Detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus genome in an air sample originating from a camel barn owned by an infected patient. *mBio* 5(4).
2. Burton NC, Grinshpun SA, Reponen T. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg.* 51(2):143-51.
3. Dee S, Otake S, Oliveira S, & Deen J. 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary research*, 40(4), 39.
4. Friese A. 2010. Aerogene Ausbreitung von Viren: Eine Studie verschiedener Sammelgeräte und Quantifizierungsmethoden zur Virusisolierung aus der Luft. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.) am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
5. Ijaz MK, Karim YG, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM. 1987. Development of methods to study the survival of airborne viruses. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Ottawa.
6. Jaschhof H. 1992a. Sampling virus aerosols—comparative studies on the efficiency of gelatin membrane filters, impaction collectors and impingers. *Bio Tec*; 4 (English translation).
7. Jaschhof H. 1992b. Sampling virus aerosols using the gelatin membrane filter—collection using a membrane filter at a high sampling rate. *Bio Tec*; 6 (English translation).
8. Liu Y, Ning Z, Chen Y, et al. 2020. Aerodynamic characteristics and RNA concentration of SARS-CoV-2 aerosol in Wuhan hospitals during COVID-19 outbreak. *bioRxiv*.
9. van Doremalen N, Bushmaker T, Munster VJ. 2013. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro Surveill.* 18(38).
10. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. 2020. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*.
11. Walenda T. 2007. Transmission von Viren über raumlufttechnische Anlagen. Diplomarbeit am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum in Bad Oeynhausen.

www.dicsa.es
950 55 33 33
info@dicsa.es

Síguenos en:

