




Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge

Métodos laboratoriais para a pesquisa e identificação de *Legionella spp*

Raquel Rodrigues
(raquel.rodrigues@insa.min-saude.pt)

SUMÁRIO


- Introdução teórica;
- Amostragem:
 - Norma ISO 19458:2006, Water quality- Sampling for microbiological analysis;
 - Procedimentos internos baseados nos documentos de apoio;
- Método Cultural;
- Métodos de Biologia Molecular (Real – Time PCR).

2

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Legionella

- ⇒ > 50 espécies e 70 serogrupos distintos;
- ⇒ Pelo menos 20 espécies de *Legionella* estão associadas a doenças no ser humano, como por exemplo, *Legionella micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, e *L. longbeachae*;
- ⇒ *Legionella pneumophila* (16 serogrupos) é responsável por 70 a 90% das infeções no Homem.



3

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Caracterização da Doença dos Legionários em Portugal

A Doença dos Legionários é reconhecida como uma doença **sub-notificada** uma vez que nem todos os casos diagnosticados pelos laboratórios do País são notificados através do sistema DDO. Além de sub-notificada, esta doença é também **sub-diagnosticada**.



4

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Circular Normativa N.º 05/DEP de 22/04/04

- O circuito de notificação clínica e laboratorial de casos de Doença dos Legionários é considerado apenas no âmbito da vigilância epidemiológica da doença.
- A circular termina dizendo:
Para a prevenção da Doença dos Legionários deverá também ser desenvolvido um Programa de Vigilância Ambiental.

5

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Legislação Nacional


- **Portaria 1220/2000 de 29 de Dezembro**, aplicada às águas minerais naturais e às águas de nascente.
- **Decreto-Lei 79/2006 de 4 de Abril**, aprova o Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios (RSECE).

NOTA TÉCNICA NT-SCE-02, 2009 - Metodologia para auditorias periódicas de QAI em edifícios de serviços existentes no âmbito do RSECE

6

 Instituto Nacional de Saúde 1899 www.insa.pt		
Portaria 1220/2000		
Água mineral natural utilizada nos estabelecimentos termais		
Parâmetros	Valores Máximos Recomendados	
	Por ingestão e em contacto com as mucosas	Por via externa
Microrganismos Viáveis 22°C	20/ml	100/ml
Microrganismos Viáveis 37°C	5/ml	20/ml
<i>Legionella pneumophila</i>	Não detectada/L	Não detectada/L
<i>Legionella</i> spp. não <i>pneumophila</i>	100 ufc/L	100 ufc/L

7

 Instituto Nacional de Saúde 1899 www.insa.pt		
Decreto-Lei 79/2006		
Artigo 29.º - Requisitos de qualidade do ar		
Artigo 9º.		
<p>“Em edifícios com sistemas de climatização em que haja produção de aerossóis, nomeadamente onde haja torres de arrefecimento ou humidificadores por água líquida, ou com sistemas de água quente para chuveiros onde a temperatura de armazenamento seja inferior a 60°C as auditorias da QAI incluem também a <u>pesquisa da presença de colónias de Legionella em amostras de água recolhidas nos locais de maior risco</u>, nomeadamente tanques das torres de arrefecimento, depósitos de água quente e tabuleiros de condensação, não devendo ser excedido um <u>número superior a 100 UFC</u>”.</p>		

8

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Outros documentos

- “Doença dos Legionários- Guia Prático” - DGS e DGT, 2001
- “European guidelines for control and prevention of travel associated legionnaires’ disease” - EC, 2005
- “Prevenção e controlo de *Legionella* nos sistemas de água” – IPQ, 2010
- “Water safety in buildings” - OMS, 2011
- European Legionnaires’ Disease Surveillance Network (ELDSNet) – ECDC, 2012

9

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Amostragem

ISO 19458:2006, Water quality- Sampling for microbiological analysis

Âmbito: Procedimentos de colheita e controlo da qualidade da amostragem de água para análise microbiológica.

- água para consumo humano;
- água de piscinas;
- água para pesquisa de microrganismos patogénicos;
- água superficial (incluindo balneares)

10

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Amostragem

ISO 19458:2006

• **Escolha dos pontos com maior probabilidade de contaminação:**

- Água proveniente de sistemas de ar condicionado;
- *Jacuzzi*;
- Chuveiros;
- Depósitos;
- Humidificadores;
- Água com temperatura entre (20 e 50) °C;
- Biofilmes.

11

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Amostragem

- Colher sempre o primeiro jacto
- Não desinfetar o ponto de colheita
- Não retirar acessórios do ponto de colheita
- Colher pelo menos 1 Litro (sempre que possível)
- Evitar a produção de aerossóis
- Usar o equipamento de proteção adequado

Transporte da amostra – entre 6 a 18°C, protegida do calor e da luz solar direta

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Método Cultural

Norma ISO 11731-1 :1998
 “Detection and enumeration of *Legionella* ” – Filtração e Centrifugação

Norma ISO 11731-2 :2004
 “Detection and enumeration of *Legionella* – Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts”



13

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Método Cultural

• **Modo de proceder:**

- Sementeira direta (se $>10^5$ UFC)
- Sementeira após concentração

Tabela I – Processamento de amostras para pesquisa de Legionela

Tipo de água	Sementeira directa	Sementeira após concentração
Rede pública, Piscina, Jacuzzi, Termal	Não	Sim
Todas as anteriores, se no âmbito de Inquérito Epidemiológico, Torre de refrigeração, Chiller, Equipamento industrial, Processo industrial	Sim	Sim
Zaragatoas	Sim	Sim

14

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Leitura das placas

- Leitura das placas após incubação, com o auxílio de uma lupa binocular com luz incidente num ângulo de 45 graus;




17

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Identificação das colónias suspeitas

- Kit utilizado no laboratório inclui partículas azuis de látex, sensibilizadas com anticorpos que aglutinam na presença de antígenos específicos da parede celular da *Legionella*, formando agregados visíveis a olho nu;
- Permite distinguir entre: *L. pneumophila* (serogrupos 1, 2-14 ou 2-15) e *Legionella* spp. não *L. pneumophila*:



18

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Amostra proveniente de uma Torre de Refrigeração

 Placa de GVPC - concentrado sem tratamento

 Placa de GVPC - concentrado com tratamento por calor

 Placa de GVPC - concentrado com tratamento por ácido

19

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Amostra proveniente de uma Torre de Refrigeração

 Placa de GVPC - direto sem tratamento

 Placa de GVPC - direto com tratamento por calor

 Placa de GVPC - direto com tratamento por ácido

20

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Expressão dos resultados

- **Não detetada / L**
- **Positiva – Nº UFC / L**
(UFC – Unidades Formadoras de Colónias)
 - *Legionella pneumophila* serogrupo 1
 - *Legionella pneumophila* serogrupo 2-14 ou 2-15
 - *Legionella* spp. não *pneumophila*

21

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Método Cultural

- Capacidade de isolar as diferentes estirpes de *Legionella*;
- Possibilidade de descobrir o agente etiológico nos IE;
- Possibilidade de comparação de estirpes clínicas com estirpes ambientais;
- Método complexo e exigente em tempo, meios de cultura, reagentes e experiência técnica.

22

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Método de Biologia Molecular: Real – Time PCR

23

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

PCR em Tempo Real (RT-PCR)

- Técnica que possibilita a monitorização do estado de uma reação de PCR em tempo-real. **Amplificação e detecção em simultâneo.**
- Baseado nos mesmos princípios do PCR:
 - Adição de um sinal (fluorescência) emitido em cada ciclo da reação de PCR, como um indicador de amplificação produzida;
- A fluorescência emitida apresenta uma relação direta com a quantidade de DNA amplificada.

24

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

PCR em Tempo Real (RT-PCR)

- **Sistemas de deteção de fluorescência:**
- **Agentes intercalantes:**
 - SYBR Green
- **Sondas de hibridação:**
 - Sondas FRET
 - Molecular beacons
- **Sondas de hidrólise:**
 - Sondas TaqMan

25

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Protocolo RT-PCR

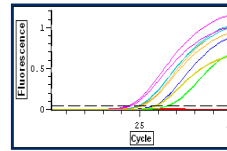
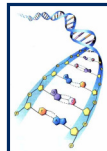
- Colheita de 1 L de amostra de água.
- As amostras devem ser entregues no Laboratório o mais rapidamente possível, de preferência no prazo de 24h e não excedendo as 48 horas.
- Caso a amostra seja analisada no prazo de 24 horas, estas devem ser guardadas à temperatura ambiente (18°C a 30°C). Caso só sejam processadas no prazo de 48 horas, estas devem ser armazenadas entre 2°C a 8°C.

NOTA: Amostras de água que sofreram tratamento por biocida só devem ser submetidas a este tipo de análise 48 horas após a realização do mesmo.

26

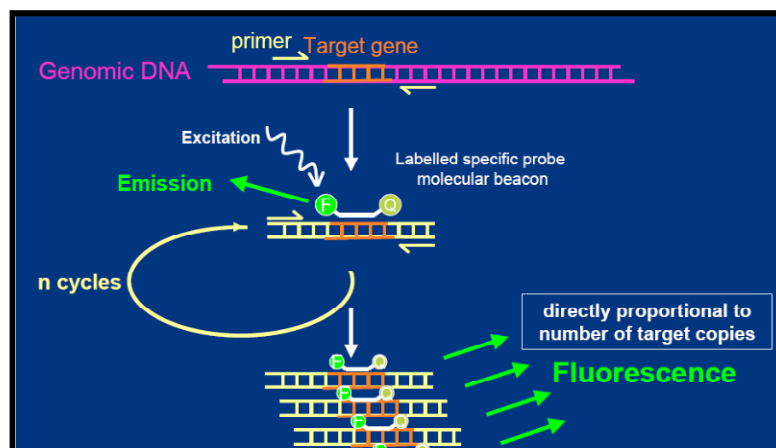
Protocolo RT-PCR (CONT).

- Concentração da amostra através de filtração;
- Extração de DNA;
- PCR em Tempo Real **Qualitativo**;
- PCR em Tempo Real **Quantitativo**;
- Expressão de resultados.



27

Amplificação do gene pretendido



28

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Interpretação resultados

- **1º Análise:**
 - ✓ Presença / Ausência *Legionella spp* não *pneumophila* e *Legionella pneumophila*;
- **2ª Análise:**
 - ✓ Quantificação de *Legionella spp* e *Legionella pneumophila* (resultado expresso em Unidades Genómicas (UG)).

29

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Apresentação Resultados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Curvas de amplificação
– amostras positivas**

30

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Vantagens PCR em Tempo Real

- Capacidade de resposta em poucas horas;
- Extremamente sensível;
- Necessita de quantidades de DNA muito inferiores às necessárias para uma reação de PCR.

31

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Desvantagens PCR em tempo Real

- Elevado custo;
- Necessidade de pessoal técnico qualificado para a correta interpretação dos resultados obtidos;
- Não existência de correlação entre UG (unidades genómicas) e UFC (Unidades formadoras de colónias) – Grande entrave em Termos Legislativos.

32

A equipa do Laboratório de Microbiologia

Lisboa

Raquel Rodrigues

Cecília Silva

Clélia Costa

Pedro Sardinha