

Metodologias de Análise de *Legionella* em Sistemas de Água

Cristina Pizarro

(cristina.bravo@insa.min-saude.pt)

Raquel Rodrigues

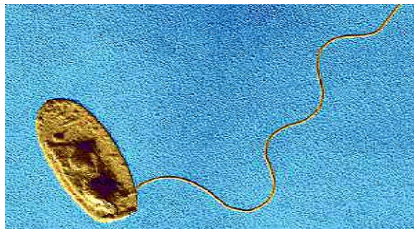
(raquel.rodrigues@insa.min-saude.pt)

SUMÁRIO

- Introdução teórica;
- Amostragem:
 - Norma ISO 19458:2006, Water quality- Sampling for microbiological analysis;
 - Procedimentos internos;
- Método Cultural;
- Resultados INSA 2010-2012;
- Métodos de Biologia Molecular (Real – Time PCR).

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.





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**.





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.**
- **Para a prevenção da Doença dos Legionários deverá também ser desenvolvido um Programa de Vigilância Ambiental.**

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

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

Decreto-Lei 79/2006

Artigo 29.º - *Requisitos de qualidade do ar*

- 9 - *“Em edifícios com sistemas de climatização em que haja produção de aerossóis, nomeadamente onde haja torres de arrefecimento ou humidificadores por água líqüida, 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 **pesquisa da presença de colónias de Legionella em amostras de água recolhidas nos locais de maior risco**, nomeadamente tanques das torres de arrefecimento, depósitos de água quente e tabuleiros de condensação, não devendo ser excedido um **número superior a 100 UFC**”.*

Outros documentos

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

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 superficial (incluindo balneares)
- água para pesquisa de microrganismos patogénicos

Amostragem

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

- **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**

Amostragem

Volume de amostra

Âmbito de amostragem	Volume a filtrar (L)
Monitorização	1
Inquérito epidemiológico	3



Amostragem

- **Colher sempre o primeiro jato**
- **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 à temperatura ambiente (6 a 18 °C), protegida do calor e da luz solar direta**

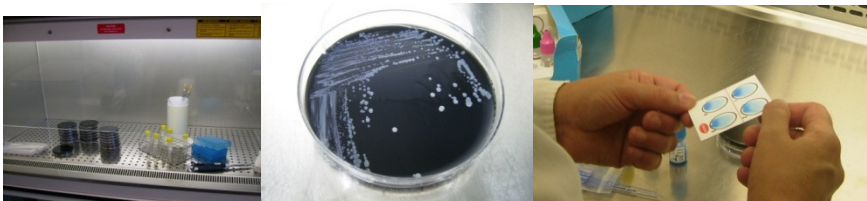
Método Cultural

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”

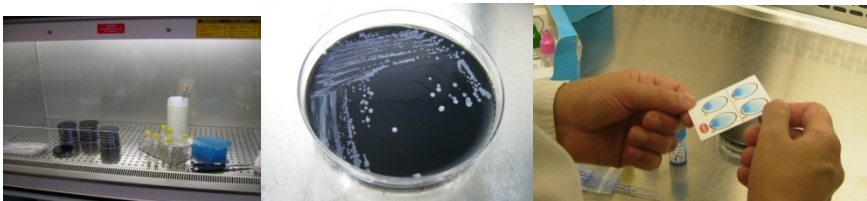


Método Cultural

Método interno :

DSA ASMI-PE09_03 P- Pesquisa e quantificação de Legionela por filtração e centrifugação

DSA ASMI-PE20_03 P- Pesquisa e quantificação de Legionela por centrifugação



Método Cultural

Modo de proceder:

Tipo de água	Sementeira direta	Sementeira após concentração
Rede pública, Piscina, Jacuzzi e Termal	Não	Sim
Inquérito epidemiológico, Torre de Refrigeração, Chiller, Equipamento industrial	Sim	Sim
Zaragatoas	Sim	Sim

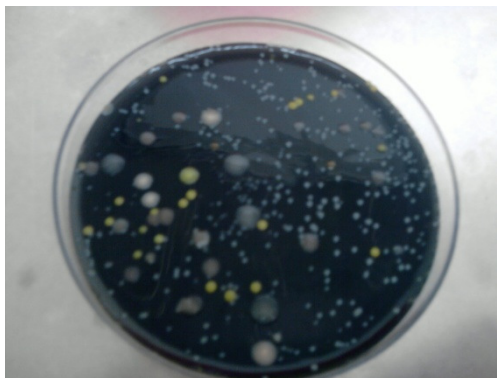


Leitura das placas

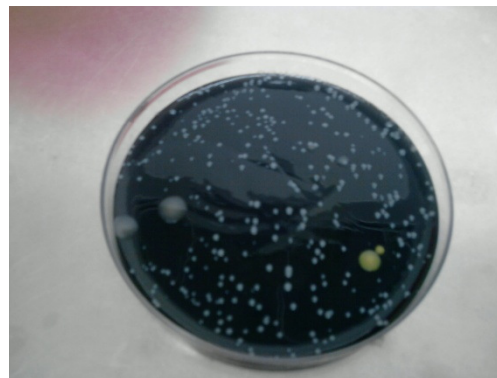
- Colónias características :

“Colónias que crescem em meio específico (GVPC), nunca antes das 48 horas de incubação, podendo apresentar uma coloração branca, rosada a azulada ou esverdeada, com aspeto vidro moído”.

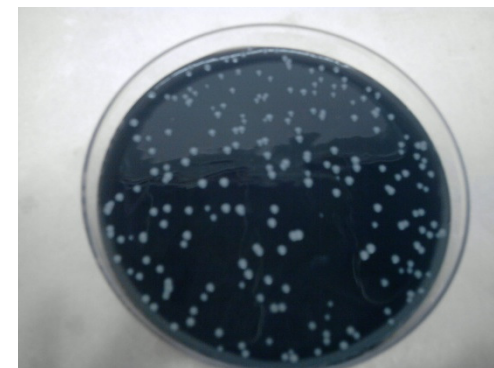
Sem tratamento



Calor



Ácido



Identificação das colónias suspeitas

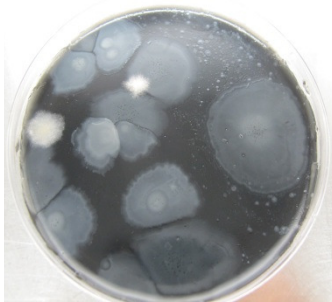
- Kit utilizado no laboratório inclui partículas azuis de látex, sensibilizadas com anticorpos que aglutinam na presença de antígenos específicos da parede celular da *Legionella*, formando agregados visíveis a olho nu;
- Permite distinguir entre: *L. pneumophila* (serogrupos 1, 2-14 ou 2-15) e *Legionella*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



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

Amostra proveniente de uma Torre de Refrigeração



Placa de GVPC - **direto** sem tratamento

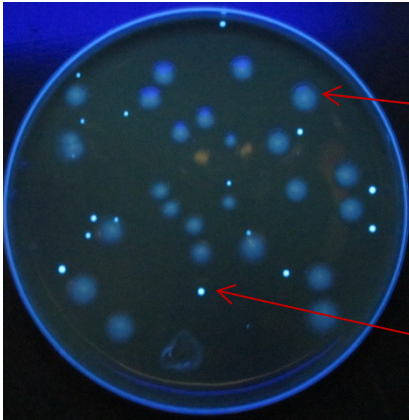


Placa de GVPC - **direto** com tratamento por calor



Placa de GVPC - **direto** com tratamento por ácido

Amostra proveniente de uma Torre de Refrigeração



Colónias de *Legionella pneumophila*

Colónias de *Legionella* spp. não *pneumophila*

Placa de GVPC sob luz U.V.

Expressão dos resultados

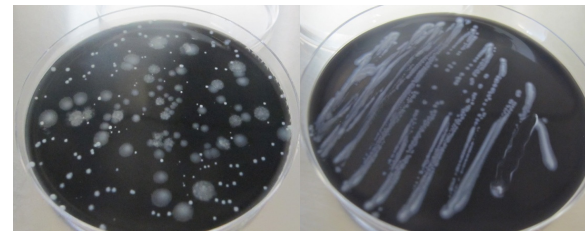
- **Não detetada (LD= 10, 50, 100) / L**
- **Positiva – Nº UFC / L**
(UFC – Unidades Formadoras de Colónias)
 - *Legionella pneumophila* serogrupo 1
 - *Legionella pneumophila* serogrupo 2-14 ou 2-15
 - *Legionella* spp. não *pneumophila*

Alguns dos casos positivos em 2013

Rede predial de um edifício antigo

2011 - *Legionella pneumophila* Serogrupo1

2013 - *Legionella pneumophila* Serogrupo1



Alguns dos casos positivos em 2013

Homem de 50 anos infetado por *Legionella pneumophila* Seroprupo 1.
Trabalhava em frente a um edifício com uma torre de refrigeração.

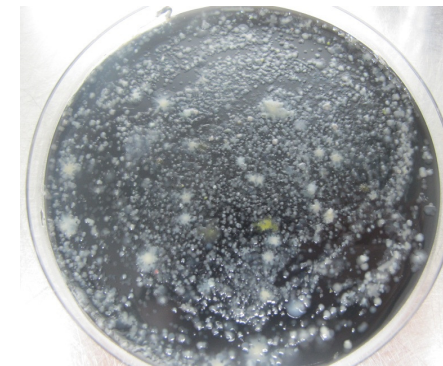
Amostra de água da TR:

Legionella rubrilucens

Flora microbiana contaminante

Pseudomonas aeruginosa

Aeromonas hydrophila



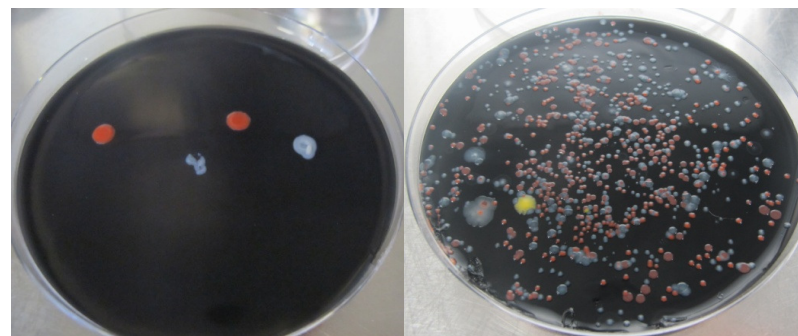
Alguns dos casos positivos em 2013

Mulher de 72 anos infetada por *Legionella pneumophila* Serogrupo 1.
Viagem turística, alojamento em hotel abastecido com água de furo,
sem tratamento.

Amostra de água do chuveiro do quarto:

Legionella pneumophila Serogrupo 1

Legionella spp. não *pneumophila*



Direto

Concentrado

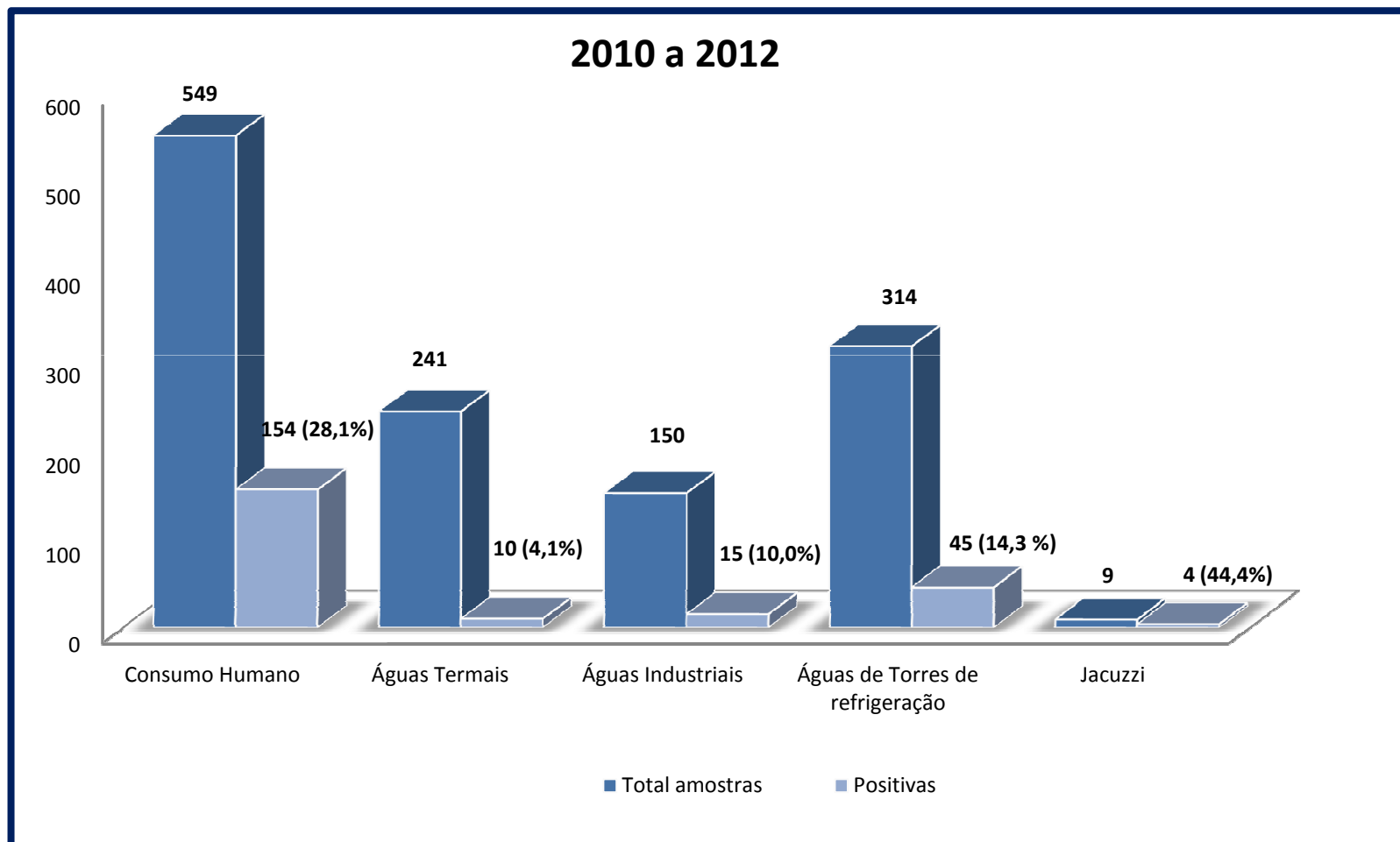
Método Cultural

- 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 exigente em tempo, meios de cultura, reagentes e experiência técnica.

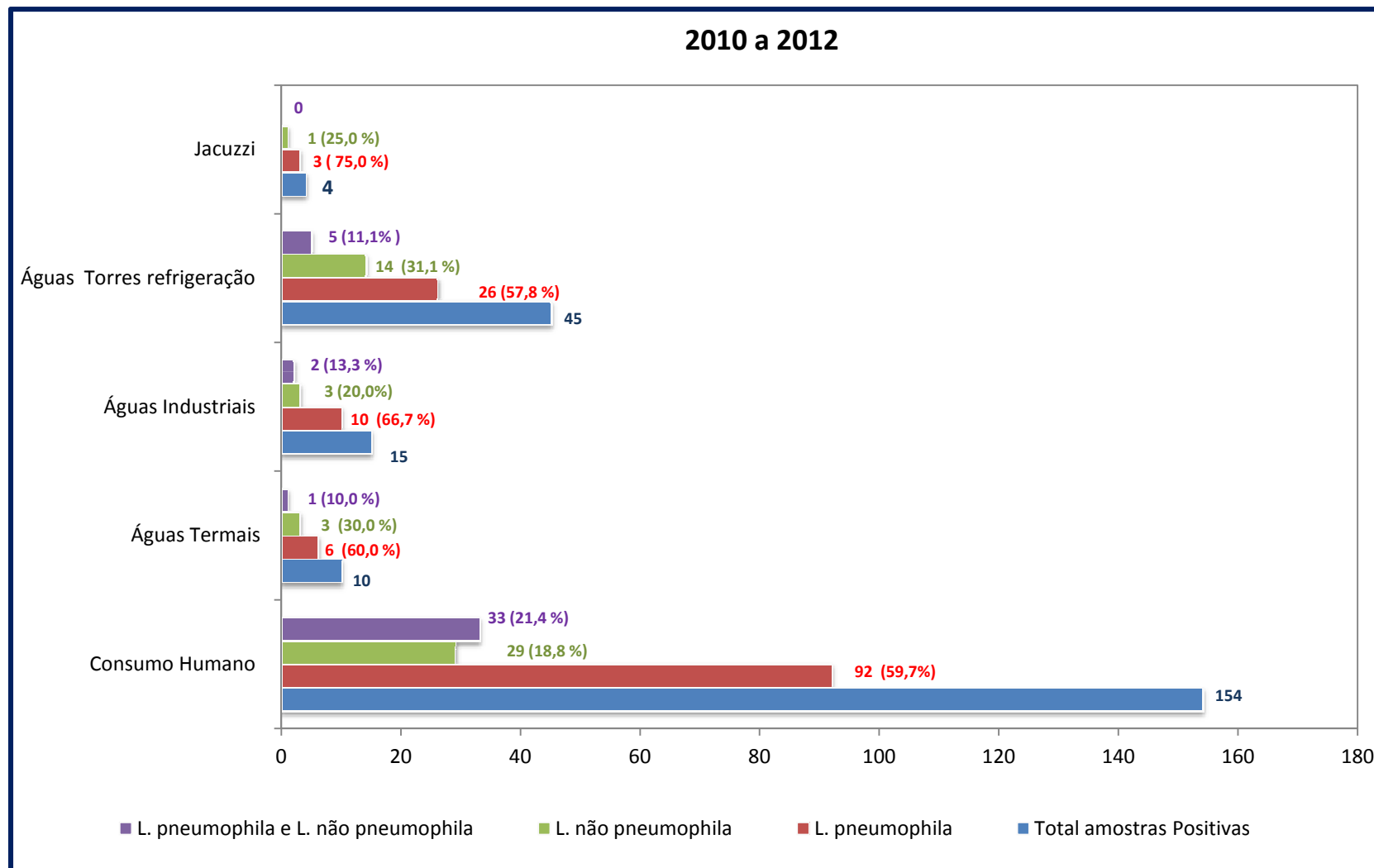
Resultados INSA 2010-2012

- Apresentação dos dados laboratoriais, no período de 2010 a 2012, no âmbito do controlo de rotina, da Vigilância Sanitária e Inquéritos Epidemiológicos.
- Os métodos utilizados para a pesquisa, identificação e quantificação de *Legionella* foram baseados na Norma ISO 11731:1998.

Apresentação dos resultados



Apresentação dos resultados



Método de Biologia Molecular: Real – Time PCR

PCR em Tempo Real (RT-PCR)

- Técnica que possibilita a monitorização do estado de uma reação de PCR em tempo-real. **Amplificação e deteção 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.

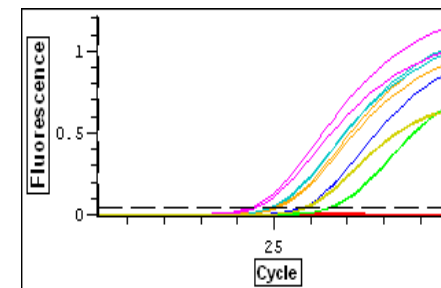
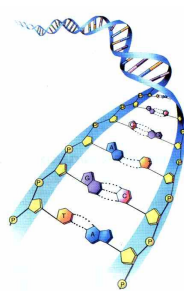
Protocolo RT-PCR

- 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.

Protocolo RT-PCR

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



PCR em Tempo Real (RT-PCR)

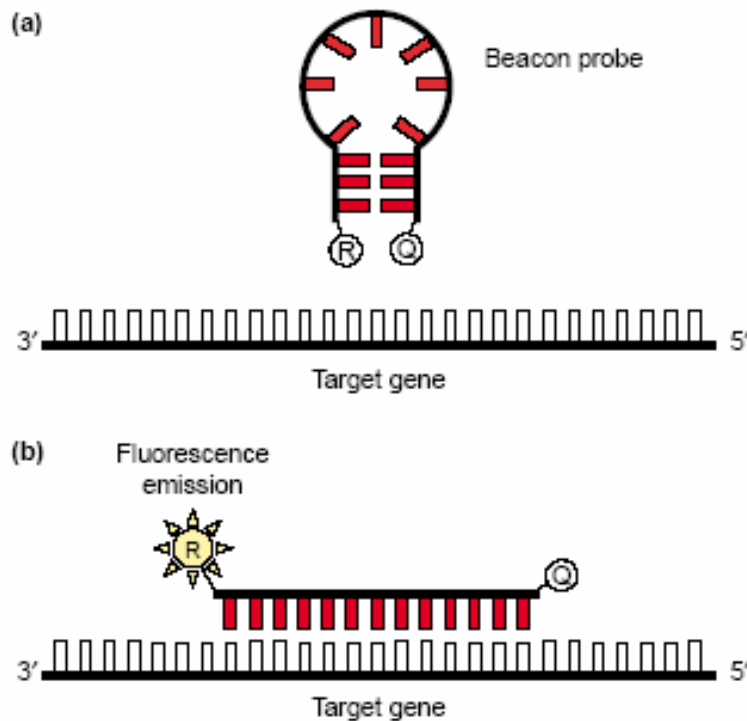
- **Sistemas de deteção de fluorescência:**
- **Agentes intercalantes:**
 - SYBR Green
- **Sondas de hibridação:**
 - Sondas FRET
 - Molecular beacons
- **Sondas de hidrólise:**
 - Sondas TaqMan

PCR em Tempo Real (Sondas hibridação)

- **Molecular beacons**

- Oligonucleótidos complementares à região interna do produto de PCR
- Possuem um fluorocromo repórter e um quencher
- Têm uma região complementar entre si => forma de gancho
- Não são hidrolisadas

PCR em Tempo Real (Sondas hibridação)

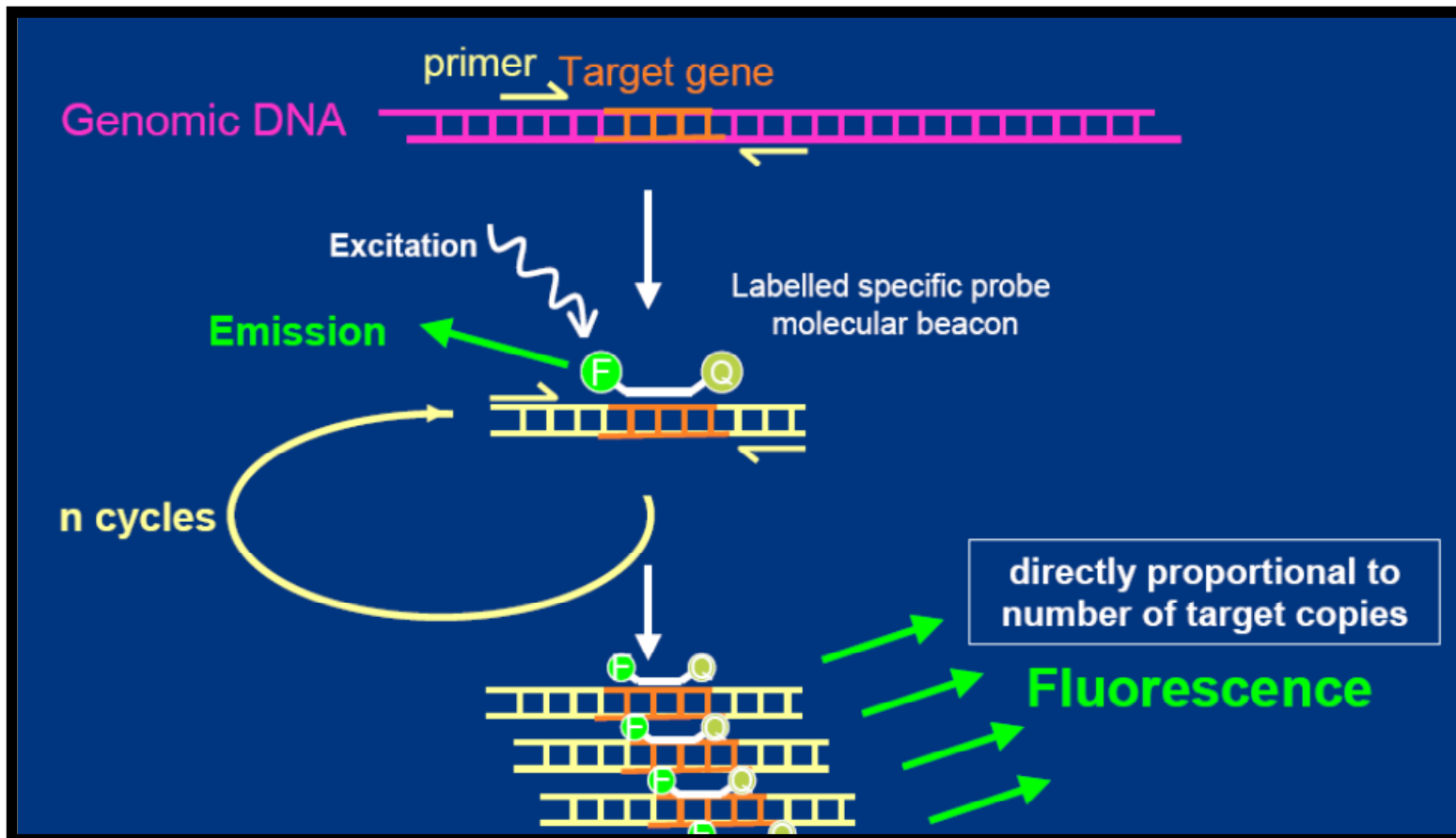


Em solução não há emissão de fluorescência

Durante a fase de *annealing*, a sonda muda de conformação, liga-se à sequência complementar



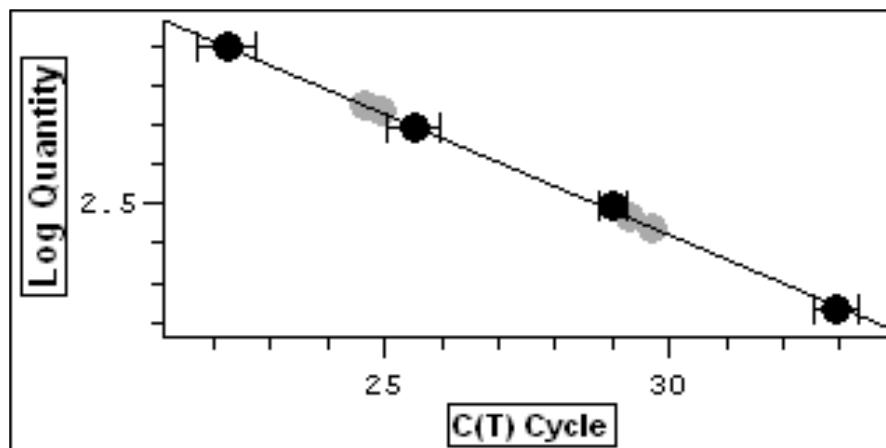
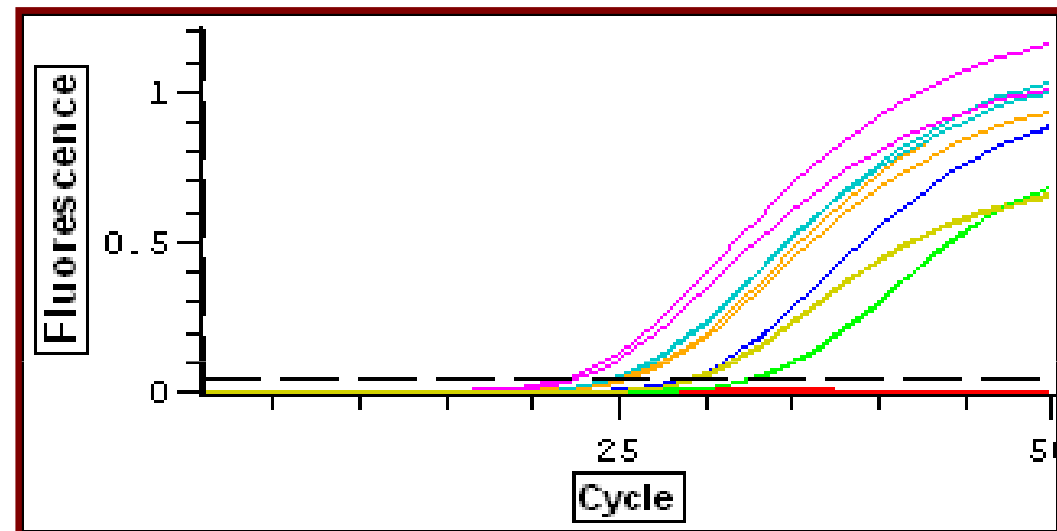
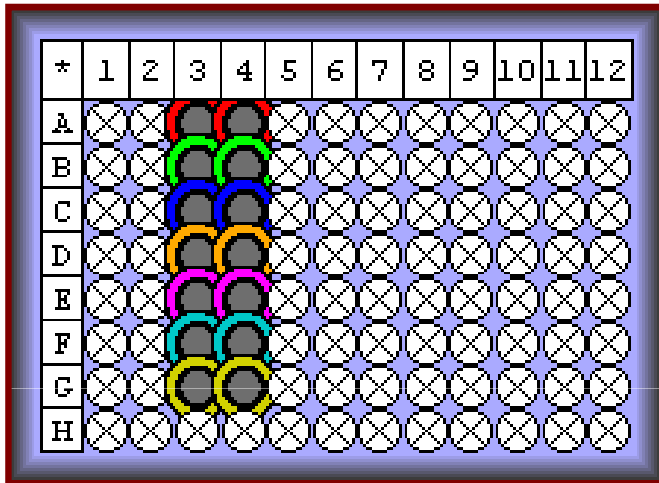
Amplificação do gene pretendido



Interpretação resultados

- **1ª 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) / L)

Apresentação Resultados



**Curvas de amplificação
– amostras positivas**



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

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

As equipas dos Laboratórios de Microbiologia

Lisboa

Raquel Rodrigues

Cecília Silva

Clélia Costa

Maria Leal

Porto

Cristina Pizarro

Alcina Reinas

Maria Sameiro

Carla Coelho

Luísa Almeida