

MONITORIZAÇÃO DE LEGIONELLA PNEUMOPHILA POR PCR-RT

Ferreiro, N.R.B., ARSN I.P. - Laboratório Regional de Saúde Pública de Braga. nunoferreiro@srsbraga.min-saude.pt

Introdução

A *Legionella* é uma bactéria presente em ambientes aquáticos. É um bacilo gram negativo, pleomórfico, aeróbio e móvel. Apresenta ubiquidade na água doce, está associada a biofilmes e é considerada um parasita intracelular de alguns protozoários como por exemplo amibas, que funcionam como seu reservatório natural. Temperaturas entre 25°C e 45°C, matéria orgânica e nutrientes são fatores que favorecem a sua multiplicação em sistemas de ar condicionado, rega por aspersão, equipamentos de spa, piscinas e jacuzzis, entre outros. Das cerca de 50 espécies descritas (incluindo 70 serogrupos), apenas algumas provocam infecções respiratórias, sendo a *Legionella pneumophila* responsável pela grande maioria dos casos. A infeção no homem ocorre por via inalatória (aerossóis) com localização predominantemente pulmonar.



Resultados

Durante o ano 2012/2013 foram analisadas 105 amostras pelo método por PCR – RT para pesquisa de *Legionella pneumophila* distribuídas da seguinte forma:

| Origem | Amostras (%) |
|----------------|--------------|
| Termais | 36,2 |
| Consumo Humano | 17,1 |
| Processo | 46,6 |

Obtiveram-se resultados positivos em 9,5% das amostras

Objectivos

Apoiar as Autoridades de Saúde na tomada de decisão em tempo útil, o Laboratório Regional de Saúde Pública implementou um método para a Pesquisa e Quantificação de *Legionella* spp., incluindo *Legionella pneumophila*, por concentração e amplificação genética por reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR-RT) baseado na Norma NF T 90 - 471 de 2010, que permite efetuar o diagnóstico laboratorial num prazo de 48h.

Material e Métodos

A Pesquisa e Quantificação de *Legionella pneumophila* por PCR – RT efectua-se nas seguintes fases:

1. Concentração das amostras por filtração;
2. Extração do ADN;
3. Amplificação de uma ou várias sequências específicas de ADN de *Legionella*;
4. Identificação e quantificação das amplificações em tempo real.

Os principais equipamentos necessários são:

- Rampa de filtração com sistema de vácuo (imagem 1)
- Extractor de DNA (imagem 2)
- GeneDisc cycler (imagem 3)
- Centrífuga;
- Vortex



Principais consumíveis:

- Genediscs para *Legionella* spp. ou *Legionella pneumophila*;
- Pack Extração (Buffers, colunas de sílica, tubos para extração de DNA, tubos de lise);
- Pack DNA (Diferentes concentrações para a bactéria a pesquisar para construção de curva de calibração em cada mudança de lote)

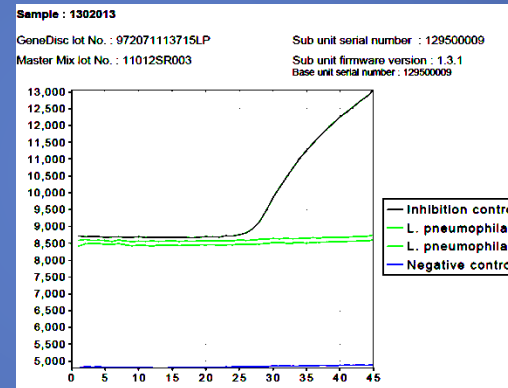


Gráfico 1 – Resultado interpretativo de amostra negativa

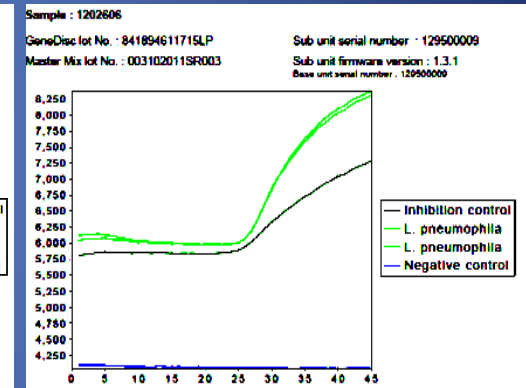


Gráfico 2 – Resultado interpretativo de amostra positiva

Conclusões

O método implementado constitui uma alternativa ao método de deteção e quantificação baseado na norma ISO 11731 por ser rápido, sensível e por ter a particularidade de detectar células viáveis não cultiváveis. É particularmente útil no caso de inquéritos epidemiológicos, contribuindo para a decisão atempada, de forma a minimizar o aparecimento de novos casos.

Referências Bibliográficas

ISO 11731 : 1998 (E) Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*

NF T 90 – 471: 2010 Qualité de l'eau – Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR)