

Legionella pneumophila e spp

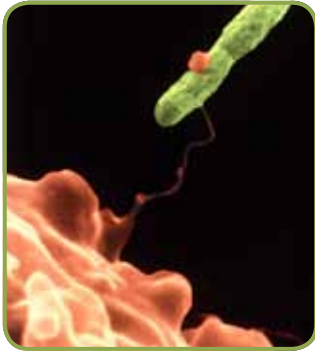


Certificação AFNOR:
Nº GEN 24/04-12/07

Método Referência:
NF T90-471; ISO/TS 12869

**Sistema de Detecção e Quantificação
de *Legionella* por Concentração e Amplificação
de Genes por Real-Time qPCR**

T Legionella pneumophila



Legionella é uma bactéria (parasita intracelular) associada à grave doença do Legionário (*Legionelose*) e com a Febre de Pontiac.

A transmissão respiratória do microrganismo pode conduzir a infeção que é usualmente caracterizada por um gradual aumento de sintomas.

A forma mais severa desta doença resulta numa pneumonia aguda, podendo ser fatal.

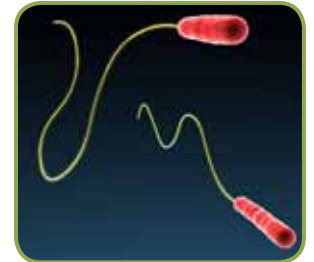
A doença do Legionário pode também atingir outros órgãos do corpo humano tais como o trato gastrointestinal e sistema nervoso central.

É raramente diagnosticada corretamente (menos de 3% dos casos). Os casos fatais variam de 15 a 20%, aumentando em indivíduos suscetíveis.

A Febre de Pontiac é também causada pela *Legionella pneumophila* mas não produz a severidade de sintomas encontrados na Doença do Legionário.

O surto que aconteceu em 1976 nos Estados Unidos, na American Legion, deu origem ao nome. O primeiro registo em Portugal data de 1979. Desde 1986 que Portugal integra o Programa Europeu EWGLI (*European Working Group for Legionella Infections*). A doença do Legionário é uma doença de notificação obrigatória (DDO) desde 1999 – Portaria nº 1071/98 de 31 de Dezembro.

Em 2004 foi criado o programa de vigilância integrada da doença do Legionário coordenado pela DGS.



T Fontes de Contaminação

- Sistemas de abastecimento de água;
- Torres de refrigeração e condensadores evaporativos;
- Sistemas de água quente com depósitos e circuitos de retorno;
- Sistemas de água quente com recirculação por jatos de alta velocidade e injeção de ar;
- Sistemas interiores de água fria para consumo humano (tubagens, depósitos, cisternas ou depósitos móveis);
- Sistemas de água quente sem circuito de retorno;
- Equipamentos de refrigeração por evaporação com atomizadores de água;
- Humidificadores industriais;
- Redes prediais de água quente e fria (>20°C e <50°C);
- Águas termais;
- Águas de Piscinas, Jacuzzis e Saunas;
- Lagos, Fontes Ornamentais, Fontanários e Repuxos Artificiais;
- Aparelhos de ar condicionado;
- Sistemas de aspersão em zonas urbanas;
- Sistemas de extinção de incêndios que utilizam água;
- Elementos de refrigeração exterior;
- Outros equipamentos que acumulam água e podem produzir aerossóis;
- Equipamentos de terapia respiratória;
- Respiradores;
- Nebulizadores.

T Solução

A Tecnilab Portugal, S.A apresenta exclusivamente como solução a tecnologia validada AFNOR da Pall GeneDisc Technology, Sistema de Detecção e Quantificação de *Legionella* por Concentração e Amplificação de genes por Real-Time qPCR (*Polymerase Chain Reaction*)".

Este sistema tem disponíveis dois protocolos:

- Um protocolo universal para todos os tipos de água incluindo amostras complexas (p.ex. águas de torres de arrefecimento)
- Um protocolo simplificado para amostras limpas (p.ex. águas abastecimento)

O tempo de resposta passa a ser 2 horas para amostras de águas claras e 3 horas para amostras de água complexas.

Esta tecnologia consiste em três etapas:

- *GeneDisc Cycler*
- *GeneDisc Ultra-Lyser*
- *GeneDisc Ultra-Purifier*



T 1ª Etapa: Extração Automática do ADN - *Ultra-Lyser*

O Sistema consiste num banho ultrasónico, num bloco aquecedor e numa rack para colocar os tubos de lise durante o processo.

Capacidade: rack com 48 tubos de 1,5 a 2 ml

O processo de extração usa protocolos padronizados. As variáveis de funcionamento que se podem alterar são o tempo de exposição ao banho ultrasónico, o tempo e temperatura do banho de aquecimento.

Os reagentes necessários para a Extração do ADN serão fornecidos com validação.

Existem dois tipos diferentes de reagentes para a extração de ADN:

- Pack 1 (ideal para amostras complexas);
- Pack 3 (ideal para amostras limpas).



T 2ª Etapa: Purificador - *GeneDisc Ultra-Purifier*

O *GeneDisc Ultra-Purifier* assegura uma purificação do ADN baseada na capacidade das moléculas de sílica em absorverem o ADN e com posterior lavagem com solvente.

O sistema consiste numa câmara de vácuo. O processo de purificação usa protocolos de purificação padronizados. Aspetos que necessitem de alteração, dependendo do tipo de amostra, são o tempo e potência na exposição ao vácuo.

O ADN é transferido para o Disco GeneDisc e preparado para ser analisado/processado no *GeneDisc Cycler*.

O Protocolo aplicado ao método GeneDisc para *Legionella* é validado pela NF VALIDATION de acordo com os padrões NF T90-471 e ISO /TS 12869.

A preparação de amostra pelo método GeneDisc permite a obtenção de amostras de ADN purificadas com uma taxa de recuperação muito elevada, ideal para aplicações quantitativas.

Este sistema é uma parte da Tecnologia Pall GeneDisc utilizado na preparação das amostras para o Real Time PCR testing (*Polymerase Chain Reaction*) e para a deteção/quantificação de microorganismos específicos. Permite processamento de 48 tubos de lise.



T 3ª Etapa: GeneDisc - “coração da análise” - Específico para cada Micro-Organismo



Composição dos discos:

- Prontos a usar, o disco está preenchido com os reagentes;
- Cada GeneDisc tem capacidade de 6 a 12 amostras;
- Inclui todos os padrões, controlos positivos e controlos negativos;
- Permitem a deteção e quantificação do ADN da *Legionella* por PCR em tempo real em todos os tipos de amostras de água. As análises de PCR são conduzidas de acordo com os requerimentos das normas NF T90-471 e ISO /TS 12869;
- Os métodos por GeneDisc para *Legionella* foram aprovados e certificados NF VALIDATION para a quantificação da *Legionella* em água. O método para *Legionella* requer o uso dos seguintes equipamentos e consumíveis: Pack Extração 1 ou 3, *GeneDisc Ultra-Lyser*, *GeneDisc Ultra-Purifier* e *GeneDisc Cycler*.

T 4ª Etapa: Análise de ADN

O *Cycler GeneDisc* é um sistema automático concebido para realizar a reação de cadeia de polimerase (RT-PCR) em tempo real. A PCR em tempo real é um método que combina a amplificação de ADN com a deteção em tempo real do corante fluorescente nas câmaras de reação após cada ciclo de PCR. O *Cycler GeneDisc* é constituído por uma unidade de base, contendo uma única cabeça de PCR, software da aplicação e firmware, interface do usuário e um painel de comunicação multiplex capaz de realizar a ligação e o controle em simultâneo até sete subunidades.

A PCR assegura um meio de replicar uma sequência única de ADN, para uma concentração muito baixa ser detetada ou medida. Tal é conseguido através da utilização de polimerase de ADN estável ao calor, tal como polimerase Taq, para replicar a sequência de uma única fila de ADN usando *oligonucleotídeos* ou *primers*, específicos para a sequência em questão. Cada ciclo de PCR é constituído por um ciclo térmico (ou seja, aquecimento

e refrigeração alternados) para separar a hélice dupla de ADN numa única fila, hibridizar *primers* e *probes* e melhorar a ação de polimerase do ADN. Tal é conseguido usando um movimento espacial patenteado em placas de temperatura fixa. Esta solução oferece uma melhoria significativa da reprodutibilidade e solidez da medição.

Este processo é repetido várias vezes, com uma duplicação da sequência do alvo de ADN em cada ciclo. A medição do alvo de ADN numa base em tempo real permite a quantificação com base no tempo para alcançar determinados limites de deteção limiar. O *Cycler GeneDisc* pode detetar dois fluoróforos na mesma reação usando dois canais diferentes.

A potência e seletividade da PCR resultam principalmente do uso de *primers* que são altamente específicos. O *Cycler GeneDisc* usa consumíveis prontos a serem utilizados: uma placa GeneDisc pré-carregada com todos os *primers* e *probes* específicos e uma Master Mix pronto a usar.



T Outras Aplicações:

Este equipamento pode ser aplicado na deteção de outros microrganismos patogénicos, tais como:

- *E.colli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cyanobacteria*, *Legionella spp*, *Salmonella*, *Listeria*, *VTECEHEC*, etc.

T Sistema Genesystems – Vantagens da Tecnologia

- Permite a quantificação da *Legionella* em 2 horas para amostras de águas claras e 3 horas para amostras de água complexas;
- Fácil de usar;
- Modular;
- A redução do tempo para a obtenção dos resultados permite a monitorização reativa;
- Quantifica simultaneamente *Legionella spp* e *Legionella pneumophila* - GeneDisc Placa *Legionella* DUO possibilita a deteção e quantificação de ambos, *Legionella spp* e *Legionella pneumophila*, usando a mesma preparação de amostras e sem gasto de tempo adicional;
- GeneDisc com Controlo Positivo Interno para detetar a presença de inibidores em cada amostra de extração de ADN;
- Os reagentes necessários para a Extração e Purificação do ADN serão fornecidos pelo fabricante em Kit com certificado que acompanhará todos os componentes necessários para o processo de Extração e Purificação específica de cada microorganismos.

Tecnilab, SA

Sede: Rua Gregório Lopes LT 1512 B, 1449 - 041 Lisboa - Portugal
Tel.: 21 722 08 70 | Fax: 21 726 45 50 | Email: geral@tecnilab.pt

Filial: Ermesinde - Porto
Tel.: 22 906 92 50 | Email: porto@tecnilab.pt

www.tecnilab.pt

