PCR Real Time: Método oficial de Análisis de Legionella. ¿Porqué no?

Marta Brull – Albert Manero

Laboratori Ambiental

Aigües de Terrassa

ÍNDICE

- Microbiología clásica.
- Marco legal (I y II).
- Métodos moleculares.
- PCR (cualitativa vs cuantitativa).
- RT PCR cuantitativa.
- Norma NF T90-471 2010.
- Cerrando el diseño.
- Comparativa entre métodos (I, II y III).
- Ejemplo interpretación resultados
- Conclusiones.

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

Microbiología clásica

- **1977:** McDade, primer aislamiento de *Legionella*.
- **1978:** Weaver, Agar Mueller-Hinton + hemoblobina + Isovitalex.
- **1978:** Feeley, Agar Mueller-Hinton + L-Cisteïna + pirofosfat.
- **1979:** Feeley, +extracte de llevat +carbó activat= **CYE Agar**
- **1980:** Pascuelle, +ACES + α-cetoglutarat =**BCYE- α Agar**

↓

1984: Dennis, + glicina + vancomicina + polimixina B + cicloheximida= **GVPC Agar**

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

Marco legal I

- **1991-1999: protocols i monografies d'actuació i prevenció.**
- **2001: Decret 417/2000,** *pel qual s'estableixen amb caràcter d'urgència les condicions tecnicosanitàries aplicables als aparells i equips de transferència de massa d'aigua en corrent d'aire amb producció d'aerosols per a la prevenció de la legionel·losi.*
- **2001: Real Decreto 909/2001,** *pel qual s'estableixen els criteris higienicosanitaris per a la prevenció i control de la Legionel·losi.*
- **2002: Decret 152/2002,** *pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i control de la Legionel·losi*
- **2003: Real Decreto 865/2003.**
- **2004: Decret 352/2004.**

Laboratori Ambiental

Marco legal II

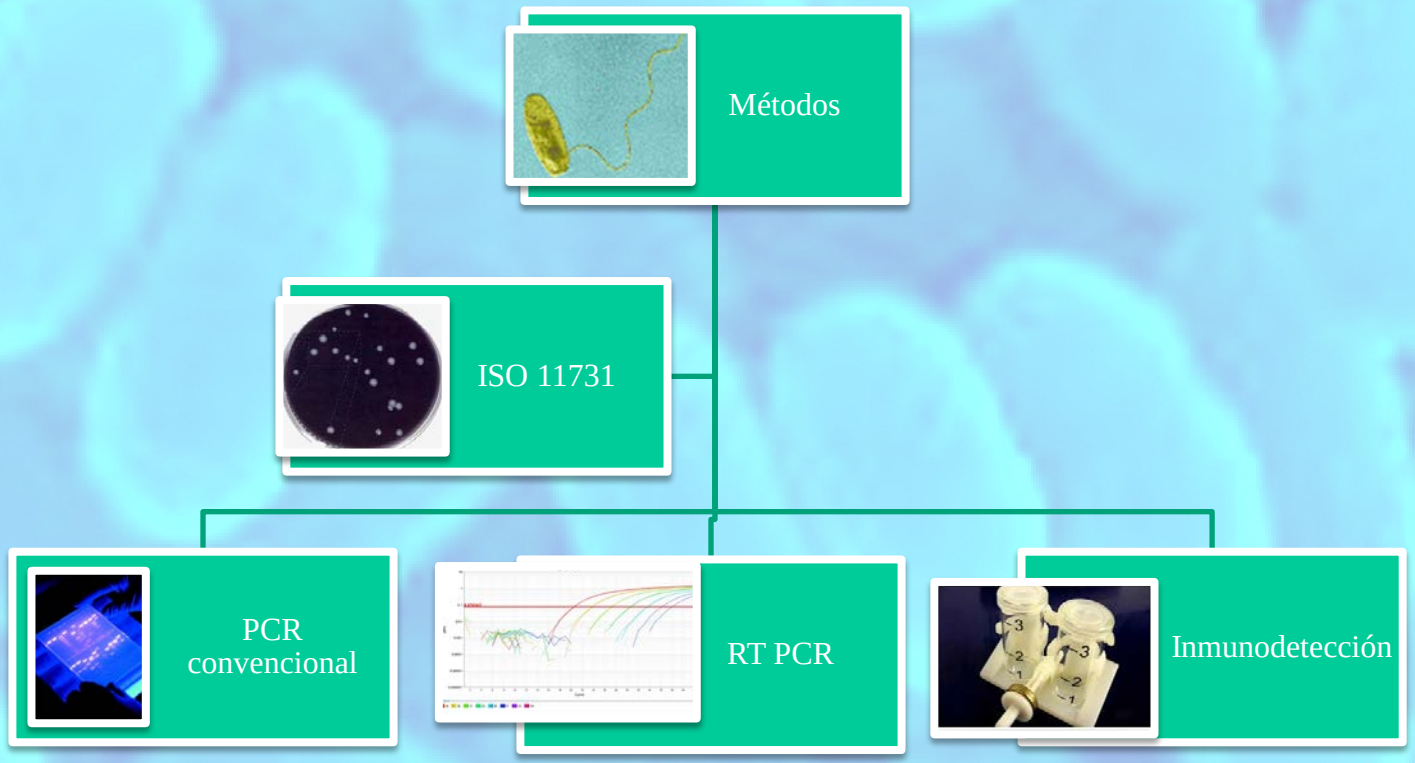
1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

Marco legal

- **Real Decreto 865/2003**
  - **ISO 11731 Parte 1**
- **Decret 352/2004**
  - **Artículo 28:** métodos oficialmente aprobados o recomendados internacionalmente
- Guías Ministerio
  - **ISO 11731 Parte 1**

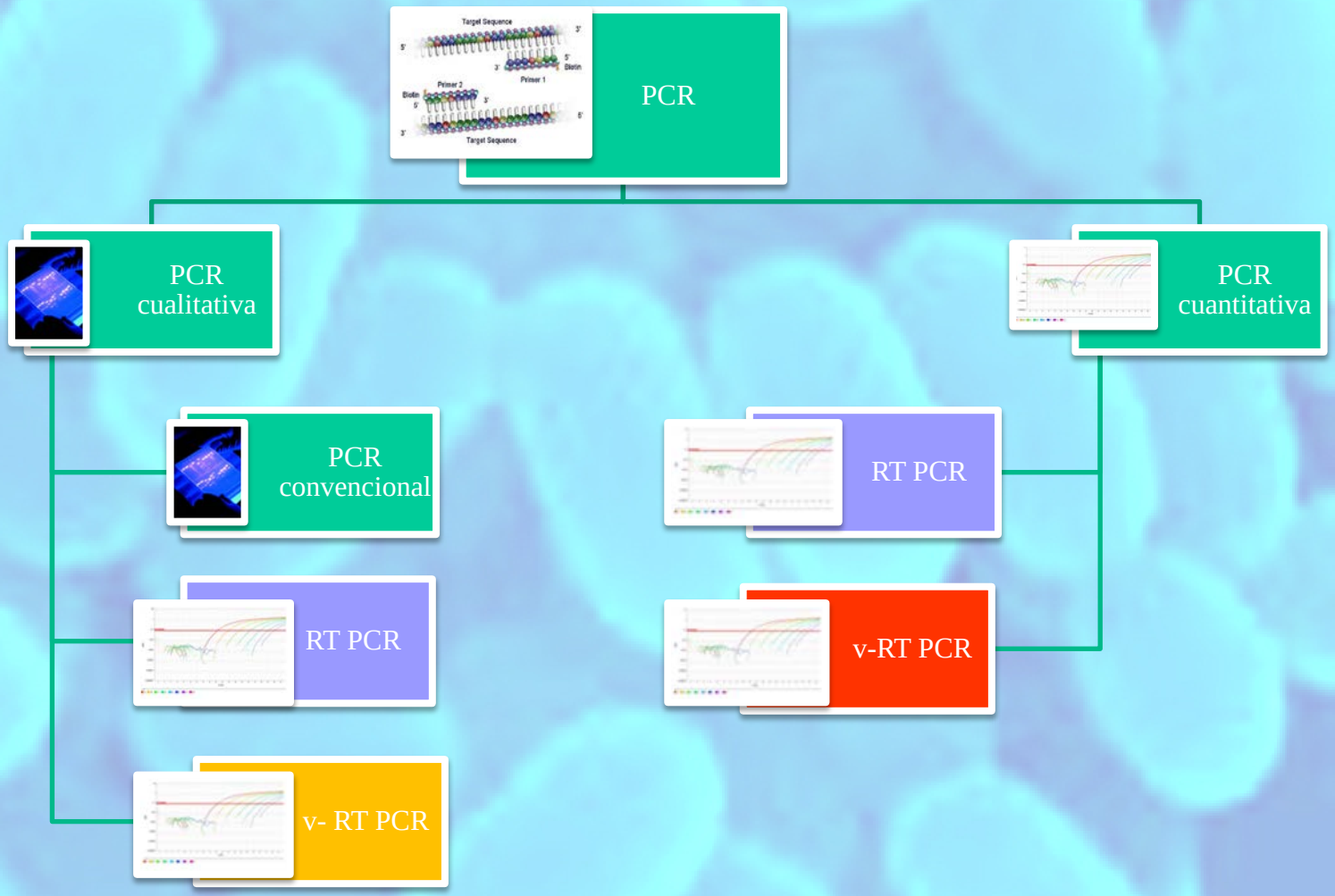
Métodos moleculares

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.



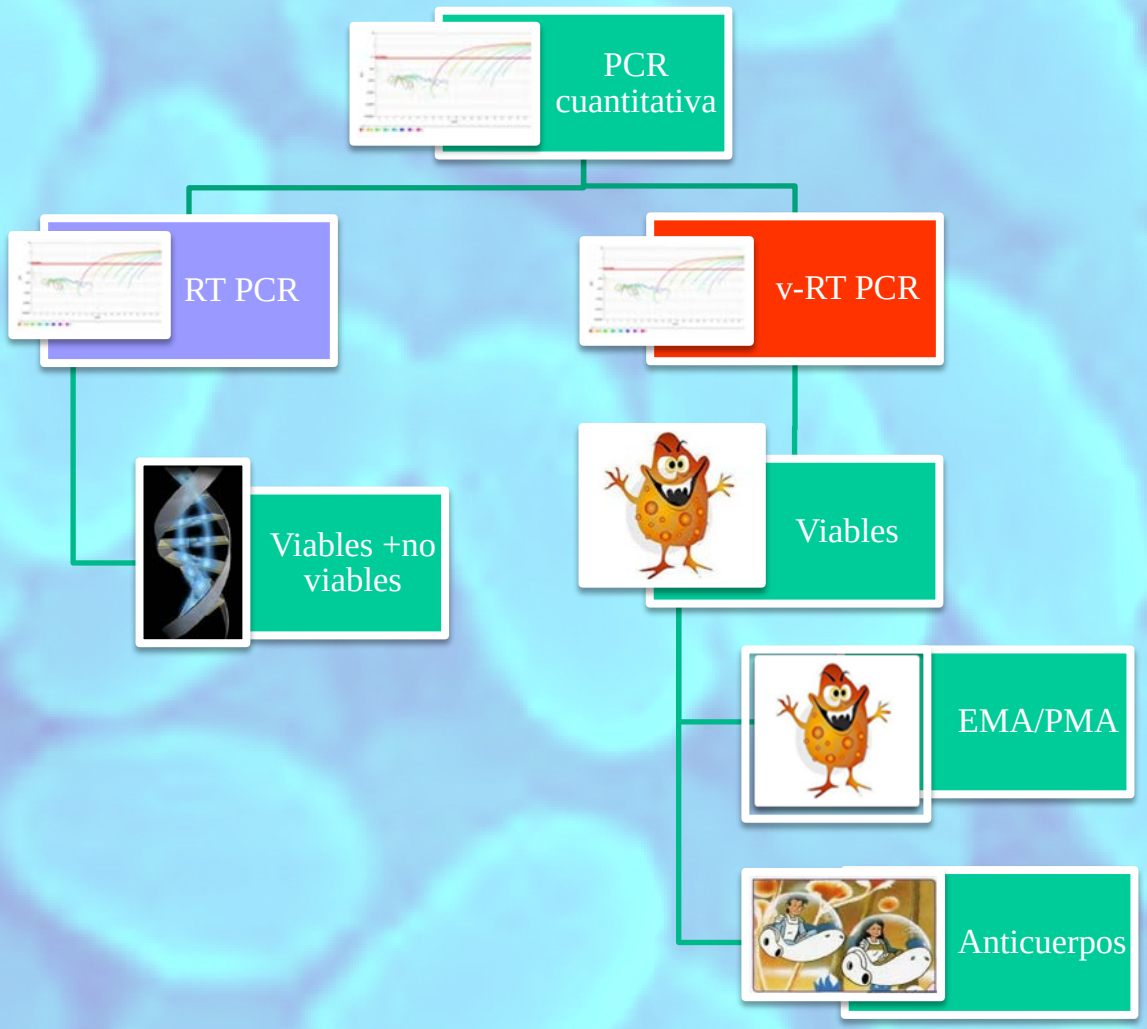
PCR (qualitativa vs quantitativa)

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.



PCR (qualitativa vs quantitativa)

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.



Laboratori Ambiental

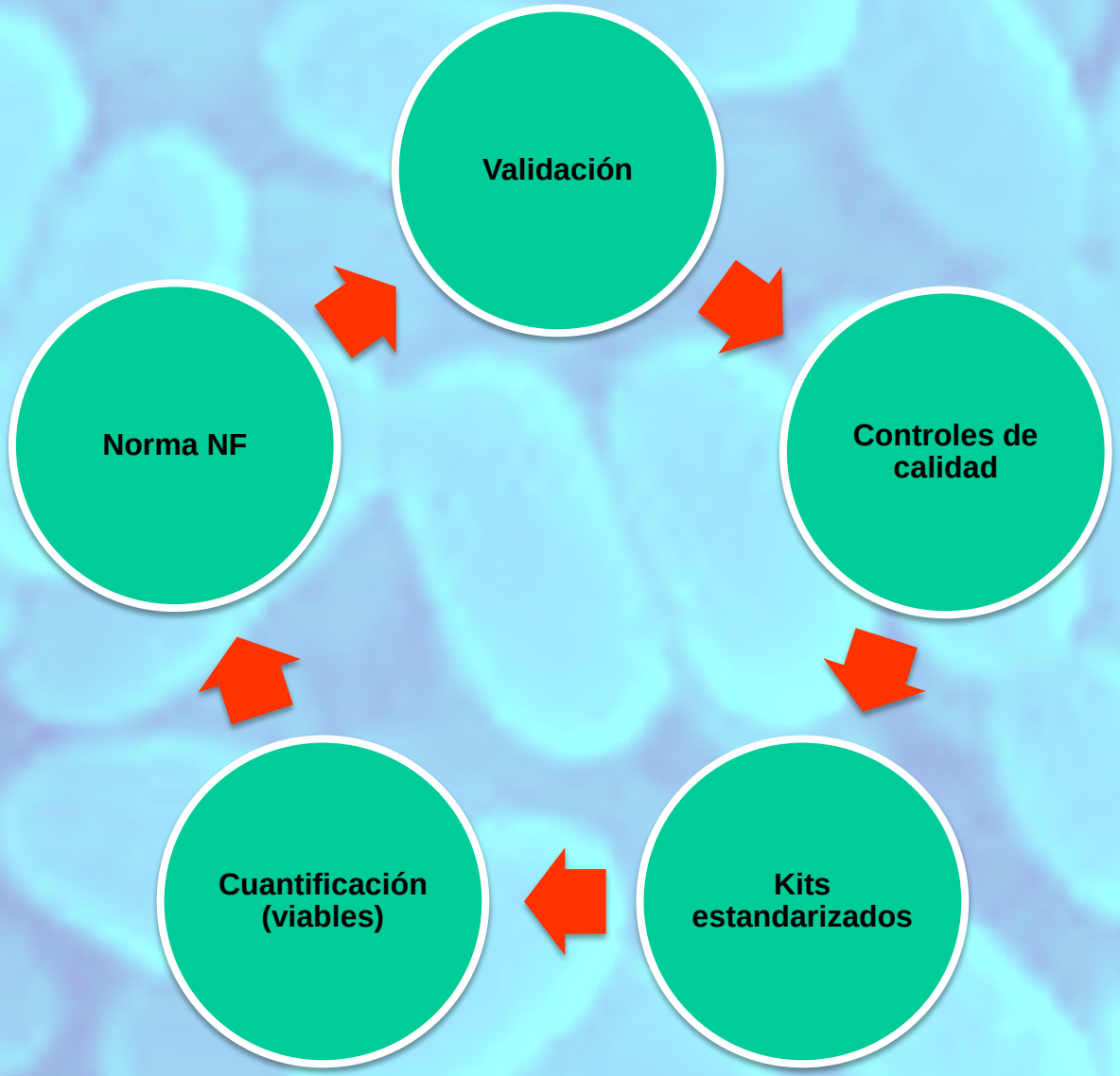
NF T90-471 2010

Détection et quantification des Legionella et/ou L. pneumophila par concentration et amplification génique par PCR-RT

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

Cerrar diseño

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.



Laboratori Ambiental

Comparativa métodos I

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

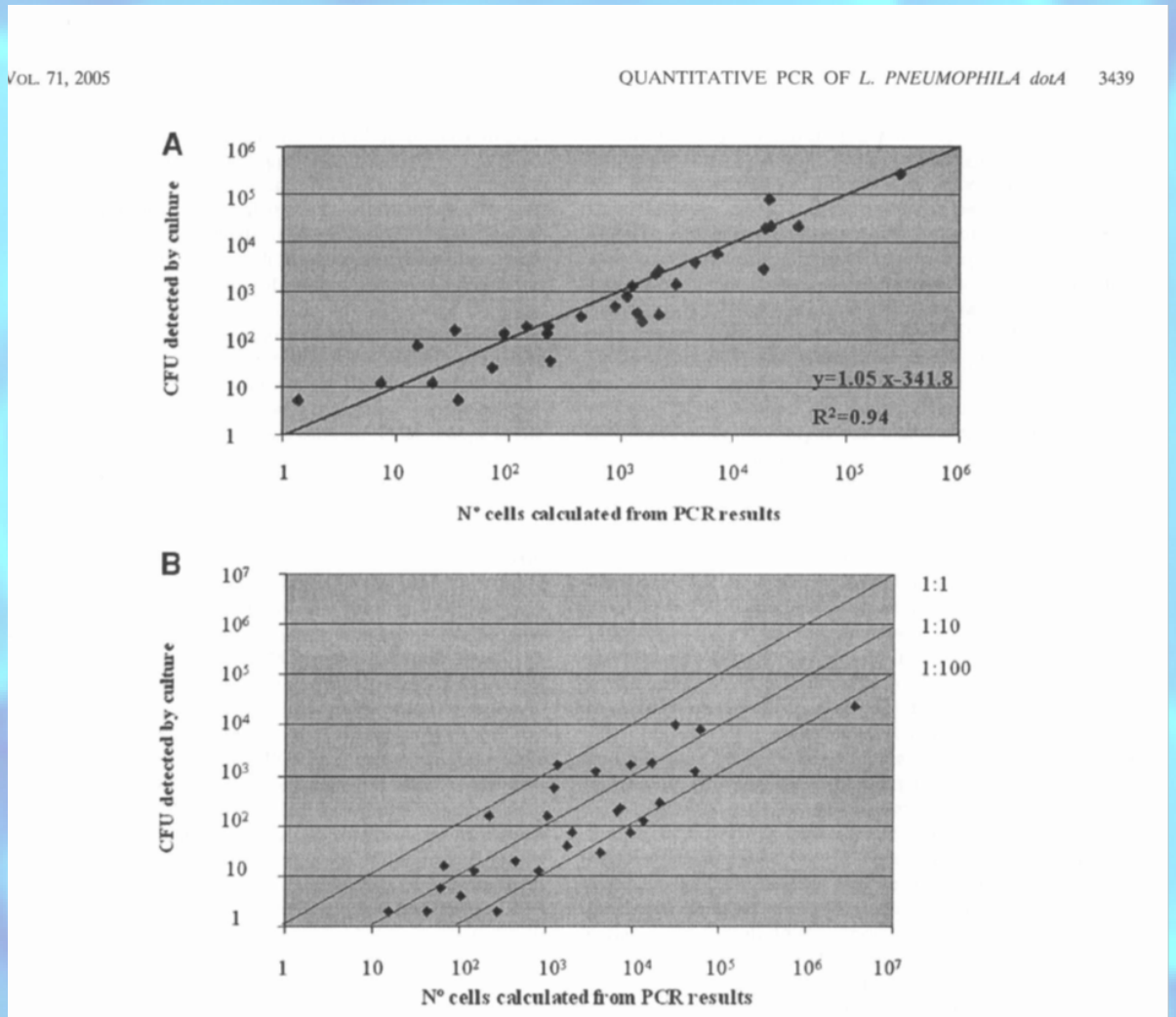


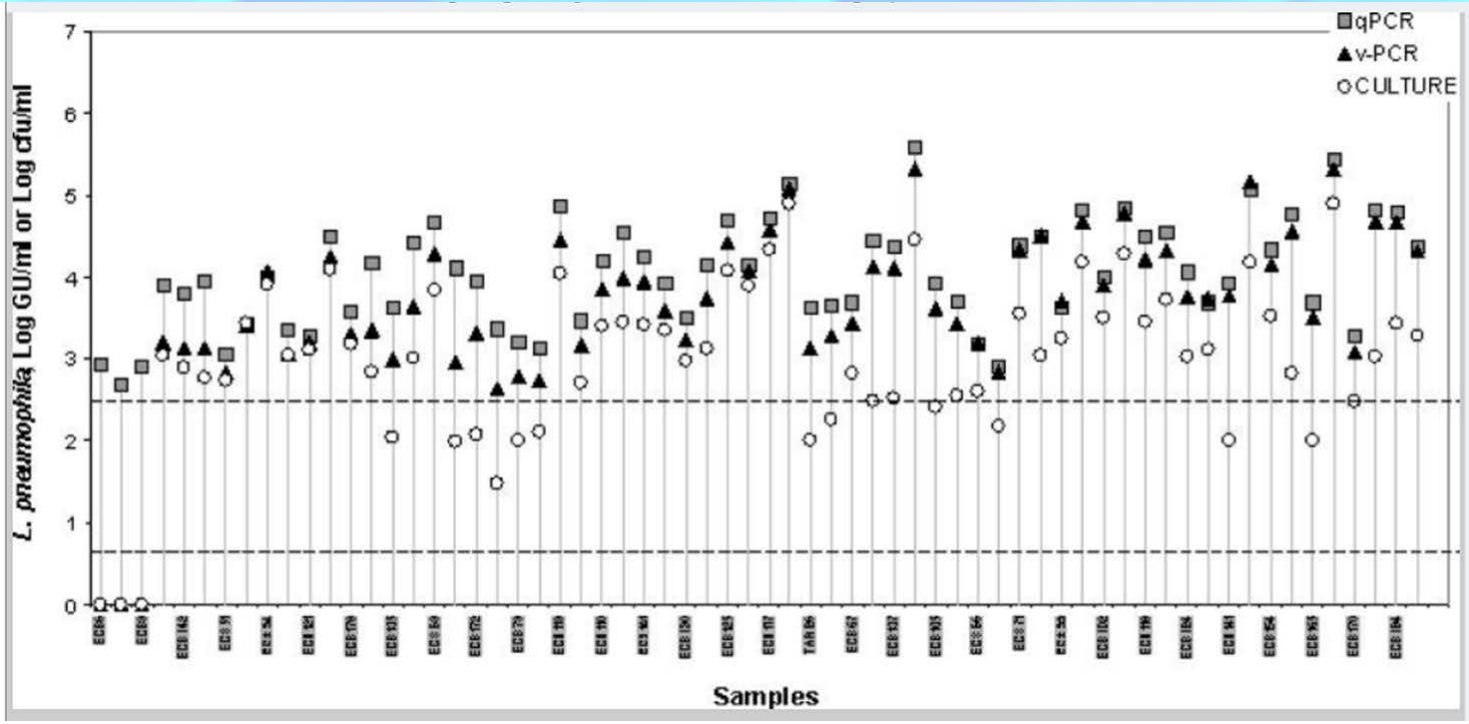
FIG. 2. Correlation between real-time PCR and culture for *L. pneumophila*. (A) Dilutions of *L. pneumophila* cultures. (B) Water samples.

Fuente: Applied and Environmental Microbiology, July 2005. Yáñez et al.

Laboratori Ambiental

Comparativa métodos I

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.



Fuente: Appl Environ Microbiol. 2009 Juny. Delgado-Viscogliosi et al.

Comparativa métodos II

	ISO 11731	PCR convencional	RT-PCR	RT-PCR viables
Personas cualificación	**	****	****	****
Equipos (inversión)	*	**	***	****
Fungible (coste)	*	**	***	***
Horas técnico	*	***	**	**
Coste/análisis	1	x2?	x2?	x3?
Resultados (días)	10-12	1 (horas)	1 (horas)	1 (horas)

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

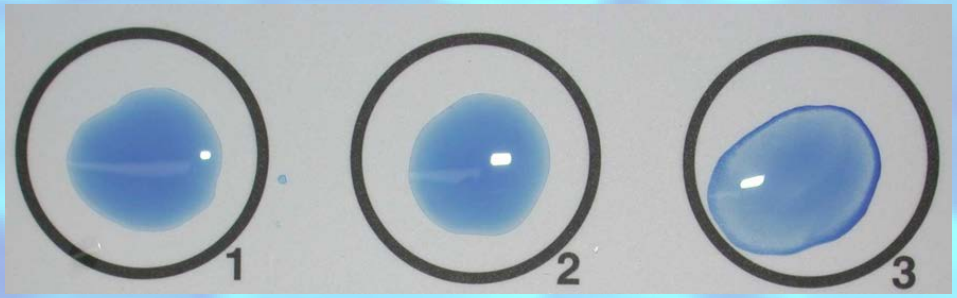
Comparativa métodos III

Resultado final	ISO 11731	PCR convencional	RT-qPCR	RT-qPCR viables
Presencia/ ausencia	SI	SI	SI	SI
Viables	≈SI cultivables	SI	SI	SI
Descarta No viables	SI	NO	NO	SI
Recuento	SI	NO	SI	SI
Expresión resultado	UFC/litro	Presencia/ ausencia	UG/l Unidades Genómicas/ Litro	UG/l Unidades Genómicas/ Litro
Tiempo	Largo	Corto	Corto	Corto
Método Oficial	SI	NO	NO	NO

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

Ejemplo interpretación: desinfección

	ISO 11731	PCR convencional	RT-qPCR	RT-qPCR viables
Antes	Positivo con recuento	positivo	Positivo con recuento	Positivo con recuento
Después	Cultivo negativo	positivo	Positivo con recuento	Negativo



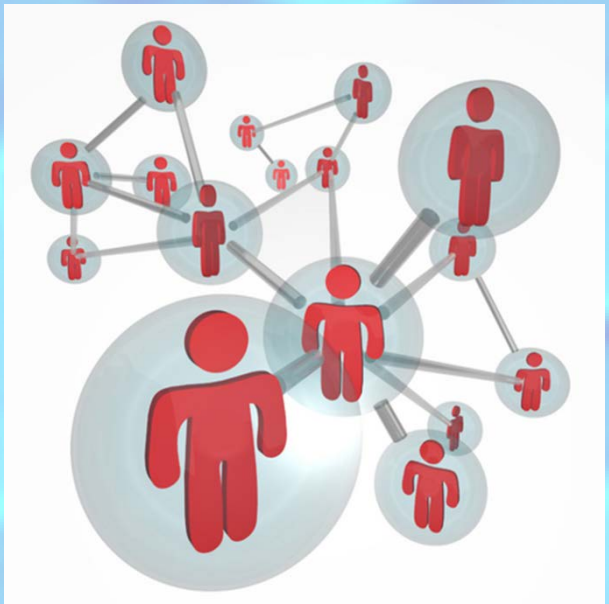
1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

Conclusiones

1. Microbiología clásica.
2. Marco legal I.
3. Marco legal II.
4. Métodos moleculares.
5. PCR (cualitativa vs cuantitativa).
6. NF T90-471 2010.
7. Cerrar diseño.
8. Comparativa métodos I.
9. Comparativa métodos II.
10. Comparativa métodos III.
11. Ejemplo interpretación.
12. Conclusiones.

ISO 11731	PCR convencional	RT-qPCR Cuantitativa	RT-qPCR Cuantitativa viables
10 días	1 día	1 día	1 día

oficial → ¿No oficial?



LinkedIn

Legionella España

Laboratori Ambiental

www.aiguesdeterrassa.net

amanero@aiguesdeterrassa.net

Tel. 93 736 28 31