



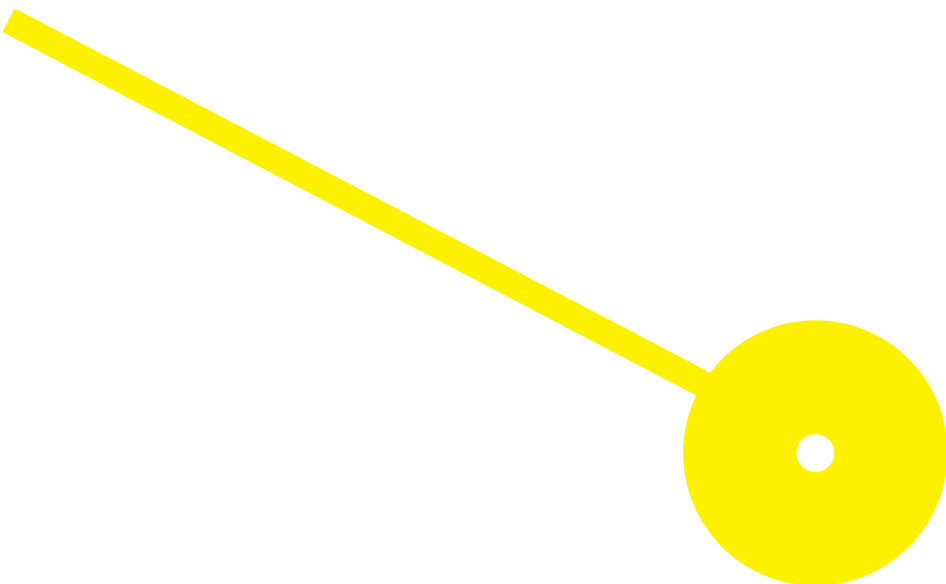
MESTRADO

Análises Clínicas e Saúde Pública - Microbiologia e Saúde Pública

# *Legionella* nas águas: Métodos Clássicos vs Biologia Molecular

Evelyne Lisandra dos Santos Carvalho

11/2021





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



## ***Legionella* nas águas – Métodos Clássicos vs Biologia Molecular**

### **Autor**

Evelyne Lisandra dos Santos Carvalho

### **Orientadores**

Doutor António Augusto Araújo Gomes/ Diretor Técnico da Biogerm SA  
Doutora Especialista Maria Manuela Amorim Silva e Sousa/ Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.Porto)  
Mestre Lara Vanessa Moura/Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica da Biogerm SA

**Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Área de Especialização Microbiologia e Saúde Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

## **Agradecimentos**

A presente fase do meu Mestrado em Microbiologia e Saúde Pública, aqui expressa neste Relatório De Estágio só se tornou realidade efetiva com o envolvimento de muitas pessoas e algumas entidades destacadamente, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|IPP). Não podendo enumerá-las de um modo particular, sobretudo para não incorrer em risco de omitir injustificadamente alguns, fica a referência de que todas elas foram determinantes para o sucesso deste Mestrado e do presente Relatório de Estágio, porque ao demonstrarem o seu inequívoco apoio, promoveram a minha resiliência necessária e absoluta, para que esta Tese se concretizasse.

Contudo, não posso deixar de expressar o meu profundo reconhecimento à Professora Doutora Maria Manuela Amorim, ao Professor Doutor António Araújo e à Professora Lara Rocha, por terem aceitado ser orientador e coorientador desta fase curricular do meu Mestrado. Reconheço que ambos possuem um profundo conhecimento da realidade clínica e laboratorial, bem como competências no âmbito do diagnóstico e terapêutica com aplicabilidade em saúde humana, animal, alimentar, ambiental e qualidade, ambos de revelada importância para o meu objeto de estudo. Por isso, foi um privilégio, poder contar com o apoio dos mesmos, com sentido crítico e muitos encontros e comentários, o que permitiram ao aprofundamento da temática objeto de estudo.

Agradeço aos meus pais e irmãos que mesmo longe sempre me apoiaram, e finalmente a todos os funcionários da Biogerm S.A., à minha colega Suellen e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento de competências para o sucesso na minha atividade profissional.

## Resumo

O Estágio realizou-se na empresa Biogerm, Laboratórios S.A., no setor de Análises Microbiológicas de Águas, por período de 6 meses. Teve como objetivo aprender metodologias e adquirir competências na área, e integrar e acompanhar a atividade de rotina laboratorial.

De entre a variedade de amostras e metodologias utilizadas realizamos ainda um estudo em que nos centramos na pesquisa e identificação de *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* em amostras de águas. A *Legionella* é uma bactéria bacilo gram-negativo, disseminada por todo o ambiente, principalmente no meio aquático, agente considerado oportunista e é o agente etiológico da Doença dos Legionários. Assim, realizou-se um estudo para comparar a técnica de PCR em tempo real e o método cultural, pela análise dos resultados obtidos na pesquisa e quantificação de *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* em amostras de águas de consumo humano e águas de processo colhidas e processadas no referido laboratório.

A investigação incidiu na revisão da literatura sobre o tema, na colheita e comparação de um total de 3.721 amostras de água, obtidas pelos métodos PCR em tempo real e cultural, na deteção de *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila*, sendo 48,9% águas de consumo humano e 51,1% águas de processo. As amostras foram colhidas no ano de 2020. Nestas amostras, foram detetadas presenças de bactérias viáveis e não viáveis.

Segundo algumas entidades da saúde, nomeadamente o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças e o Instituto Português de Qualidade as medidas de prevenção e controlo baseiam-se no desenvolvimento de planos de manutenção em cada equipamento e sistema passível da presença da *Legionella*.

**Palavras-chave:** Águas de consumo humano, Águas de processo, *Legionella*, PCR em tempo real, Método cultural.

## Abstract

The Internship took place at Biogerm – Laboratórios S.A., in the Water Microbiological Analysis sector, for a period of 6 months. Aimed at learning methodologies and acquiring skills in the area and following the laboratory routine.

Among the variety of samples and methodologies used, we also carried out a study in which we focused on the research and identification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples. *Legionella* is a gram-negative bacillus, spread throughout the environment, mainly in the aquatic environment, an agent considered opportunistic and the etiological agent of Legionnaires' Disease. Thus, a study was carried out to compare the real-time PCR technique and the cultural method, by analyzing the results obtained in the research and quantification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in samples of drinking water and process water collected and processed in that laboratory.

The investigation focused on the literature review on the subject, on the collection and comparison of a total of 3 721 water samples, obtained by real-time and cultural PCR methods, in the detection of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*, with 48.9% water for human consumption and 51.1% for process water. The samples were collected in 2020. In these samples, the presence of viable and non-viable bacteria was detected.

According to some health entities, namely the European Center for Disease Prevention and Control and the Portuguese Institute of Quality, prevention and control measures are based on the development of maintenance plans for each equipment and system subject to *Legionella*'s presence.

**Keywords:** Drinking water, Process water, Legionella, Real-time PCR, Cultural method.

## Índice

<b>1.</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Contextualização.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Caracterização de bactérias do género <i>Legionella</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.</b>	<b>Fatores que influenciam o crescimento da <i>Legionella</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4.</b>	<b>Infeções e sintomas provocados nos seres humanos .....</b>	<b>4</b>
<b>1.5.</b>	<b>Multiplicação de <i>Legionella</i> nos macrófagos alveolares humanos.....</b>	<b>5</b>
<b>1.6.</b>	<b>Mecanismos de infeção e replicação intracelular .....</b>	<b>6</b>
<b>1.7.</b>	<b>Reservatórios naturais e artificiais .....</b>	<b>7</b>
<b>1.8.</b>	<b>Deteção e quantificação de <i>Legionella</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.9.</b>	<b>Técnicas de deteção laboratorial de amostras ambientais de <i>Legionella</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.10.</b>	<b>Controlo e prevenção de <i>Legionella</i> nos sistemas de água.....</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.</b>	<b>Objetivo do Estágio.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.</b>	<b>Objetivo estudo de caso específico.....</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.</b>	<b>Amostragem .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.</b>	<b>Preparação de amostras de água para amplificação por PCR em tempo real.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.</b>	<b>Exame cultural de amostras de água.....</b>	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>17</b>
<b>5.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>20</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>22</b>
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>24</b>

## **Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos**

**BCYE+AB** – Buffered Charcoal Yeast Extract suplementado com Ferro e L-cisteína

**BCYE-cys** – Buffered Charcoal Yeast Extract sem L-cisteína

**CDC** – Centers for Disease Control and Prevention

**°C** – Graus Celsius

**DDO** – Doenças de Declaração Obrigatória

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**ECDC** – Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (do inglês European Center for Disease Prevention and Control)

**ESS** – Escola Superior de Saúde

**GVPC** – Glicina, Vancomicina, Polimixina B, Cicloheximida

**L** – Litro

**ISO** – Organização Internacional para Padronização (do inglês International Organization for Standardization)

**IPP** – Instituto Politécnico do Porto

**ONU** – Organização das Nações Unidas

**PCR** – Reação em cadeia polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)

**pH** – Potencial hidrogeniónico

**SPP** – Várias espécies

**Sg.** – Serogrupo

**UFC/L** – Unidade formadora de colónia por Litro

**uL** – MicroLitro

**UV** – UltraVioleta

**VBNC** – Viável, mas não cultivável

**VCL** – Vacúolo Contendo Legionella

## Índice de Figuras

Figura 1: Número de casos notificados de Doença dos Legionários, por ano de notificação, Portugal 1999–2016 .....	2
---	---

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos métodos PCR em tempo real e do Cultural segundo o INSA.....	20
--	----

## Índice de Gráficos

Gráfico 1: Número de amostras de águas de consumo humano e águas de processo analisadas no local do estágio.....	17
Gráfico 2: Resultados obtidos pelos dois métodos aplicados (PCR em tempo real e Método Cultural) na deteção de <i>Legionella</i> spp. e <i>Legionella pneumophila</i> nas amostras de água de consumo humano.....	18
Gráfico 3: Resultados obtidos pelo Método Cultural na deteção de <i>Legionella</i> spp. e <i>Legionella pneumophila</i> nas amostras de água de consumo humano .....	18
Gráfico 4: Resultados obtidos pelos dois métodos aplicados (PCR em tempo real e Método Cultural) na deteção de <i>Legionella</i> spp. e <i>Legionella pneumophila</i> nas amostras de água de processo.....	19

## 1. Introdução

Como requisito para a conclusão do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública – ramo de Microbiologia e Saúde Pública, realizou-se um estágio curricular com duração de 350 horas, na base da qual deve ser apresentado em Relatório de Estágio, na área de especialização em Microbiologia e Saúde Pública.

Este estágio foi realizado na empresa Biogerm – Laboratórios S.A., que é um laboratório de referência na área da Saúde Pública com análises microbiológicas e químicas, no controlo da qualidade alimentar, águas e ambiente contemplando as mais recentes e avançadas metodologias.

A Biogerm – Laboratórios S.A., possui laboratórios em Portugal Continental e ilha da Madeira, com serviço de entregas e transporte em todo o país. Dispõe de uma equipa profissional e qualificada distribuídos pelos laboratórios de preparação de meios de cultura, pela microbiologia alimentar e águas, pela biologia molecular, química instrumental e clássica.

Organizou-se este Relatório de Estágio abordando a aquisição de conhecimentos e competências no laboratório de análises de águas e desenvolvimento de projeto sobre o tema de *Legionellas* águas, com recurso a métodos clássicos e métodos de biologia molecular. Assim, o presente relatório, na sua vertente mais relevante e consentâneo com o seu objeto de estudo, encontra-se estruturado em 10 partes, destacando-se 11 pontos fundamentais, acrescidos da análise de resultados, discussão e conclusão.

### 1.1. Contextualização

Em 1976 as bactérias do género *Legionella* foram consideradas causadoras de numerosos surtos de pneumonia grave. No primeiro surto que ocorreu na 58ª Convenção da Legião Americana na Philadelphia, sendo essa a razão do nome Doença dos Legionários, faleceram 29 dos 182 casos identificados (1). Como os sistemas de água de grandes edifícios, como hospitais, estão mais sujeitos à contaminação por *Legionella*, existe um perigo potencial para os doentes, nessas estruturas da saúde. Vários estudos do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostraram uma clara associação entre a presença de *Legionella* em sistemas de água quente e a ocorrência de legionelose. Este problema torna-se particularmente importante em doentes imunocomprometidos. Torneiras de água e chuveiros, têm sido frequentemente identificados como fontes prováveis de infeção, embora o modo exato de transmissão da *Legionella* não seja claro (2).

Em Portugal, a doença foi detetada pela primeira vez em 1979 e pertence à lista das Doenças de Declaração Obrigatória (DDO). Após ter sido considerada insuficiente a vigilância da Doença dos Legionários, unicamente através da notificação obrigatória de doenças transmissíveis, foi criado em 2004 o Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários em Portugal (3). Nos últimos anos foram notificados, em média, cerca de 190–200 casos por ano (4). Os surtos associados a *Legionella* ocorridos em Portugal, foram reportados nos anos de: 2000 – Surto na Região Norte com 11 casos nas festas do Concelho de Vizela ( possível origem fonte ornamental), 2006 em Vila Nova de Gaia com 20 casos, 2009 surto ocorrido na Póvoa do Varzim- Vila do Conde com 8 casos, 2012 com 25 casos em Fafe, 2014 na Vila Franca de Xira nas Torres de arrefecimento Industrial com o maior número de casos (403 casos) e 14 óbitos, em 2016 no Hospital de São Francisco de Xavier com 58 casos e 5 óbitos com origem de Torres de arrefecimento e em 2018 no Hospital da CUF Descobertas 15 casos com origem em sistema de AQ (41).

Outro surto associado a *Legionella* também ocorrido em Portugal, foi reportado muito recentemente já durante o mês de Outubro de 2020 nos concelhos de Matosinhos e Vila do Conde, que, tal como a Póvoa de Varzim, tendo sido confirmados 88 casos registando-se até ao momento 15 mortes associadas (origem dos sistemas de refrigeração) (40).

Na figura 1 estão representados o número de casos notificados de Doença dos Legionários em Portugal, no período de 1999–2016 (5).

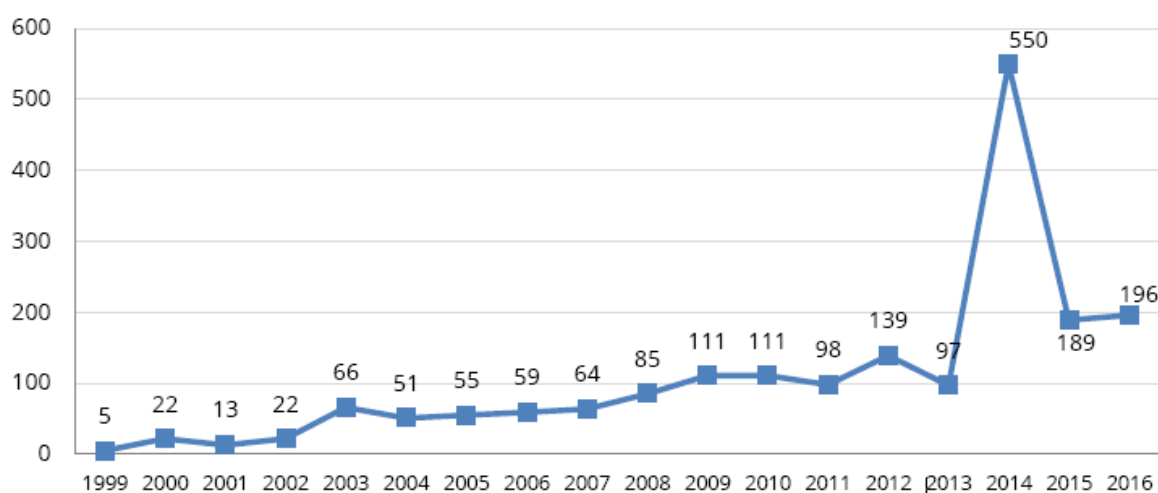


Figura1: Número de casos notificados de Doença dos Legionários, por ano de notificação, Portugal 1999–2016

## **1.2. Caracterização de bactérias do gênero *Legionella***

As bactérias do gênero *Legionella spp.* são bacilos gram-negativos pertencentes à família *Legionellaceae*. São aeróbios, não esporulados, podendo algumas estirpes possuir mobilidade, por um ou mais flagelos laterais ou polares (6). Não apresentam enzimas como a urease, oxidase e nitrato redutase.

Atualmente existem mais de 60 espécies incluídos nesse gênero e aproximadamente 70 serogrupos distintos e a *Legionella pneumophila* serogrupo 1 é a responsável por cerca de 95% dos casos detetados de infecções.

Essas bactérias estão disseminadas por todo o ambiente, principalmente no meio hídrico que é o seu habitat preferencial como ambientes de água doce naturais, ambientes artificiais, como redes de abastecimentos e distribuição de água, redes prediais de água quente e fria, ar condicionados, sistemas de arrefecimento, tanques recreativos e fontes ornamentais, com exceção da espécie *Legionella longbeachae* que normalmente é encontrada nos solos (7).

## **1.3. Fatores que influenciam o crescimento da *Legionella***

Os principais fatores que influenciam o crescimento e multiplicação das bactérias *Legionella* consistem na presença de nutrientes, interação com outros microrganismos, pH e a temperatura. A presença de nutrientes é um dos fatores fundamentais principalmente no ciclo de vida das espécies de *Legionella*. A elevada quantidade de nutrientes permite que as bactérias entrem na fase replicativa proporcionando assim uma rápida proliferação (8). A sua principal exigência nutricional são os aminoácidos e o carbono pois funcionam como fonte de energia e permitem o seu crescimento e a sua replicação (9).

A interação com outros microrganismos, como por exemplo os protozoários, é importante para a multiplicação e sobrevivência da *Legionella* no meio ambiente pois apresentam uma boa capacidade de adaptação no seu meio intracelular (10, 8). Para além das condições para a multiplicação intracelular, os protozoários são responsáveis pela proteção da *Legionella spp.* de efeitos biocidas, processos de desinfecção térmica, condições adversas à sua sobrevivência e conferem-lhe uma maior resistência ao stress. No ambiente natural a *Legionella pneumophila* prolifera dentro dos fagossomas intracelulares dos protozoários, produzindo enzimas com atividade citotóxica causando destruição tecidual (11).

O pH e a temperatura também têm um papel importante no crescimento das espécies de *Legionella*. Na presença de ferrugem e numa temperatura entre 20°C e 45°C apresenta uma multiplicação rápida alcançando níveis insólitos e de risco no sistema de circulação de água, podendo sobreviver a temperaturas de 20° a 70°C (12, 13), exceto a *Legionella pneumophila* que em temperaturas superiores a 60°C é incapaz de sobreviver e em temperaturas inferiores a 25°C não cresce nem sobrevive por um longo período de tempo (14). Em relação aos níveis de pH, as bactérias do gênero *Legionella* apresentam um bom crescimento nos valores de pH entre 6 a 8 e a *Legionella pneumophila* apresenta crescimento apenas nos valores entre 5,5 e 9,2 (15, 16).

#### **1.4. Infecções e sintomas provocados nos seres humanos**

A espécie mais frequentemente associada à infecção no homem é a *Legionella pneumophila* serogrupo 1 seguido do serogrupo 6. Estão associadas a infecções bacterianas principalmente do trato respiratório inferior, designadas como “legioneloses” (17).

A infecção por *Legionella* spp. apresenta 3 formas: infecção subclínica, infecção multissistêmica (com quadro predominante de pneumonia denominado doença dos Legionários, a qual frequentemente justifica internamento hospitalar) e a forma respiratória não pneumônica denominado de febre de Pontiac que se assemelha a uma síndrome gripal (18).

A legionelose extrapulmonar também é uma das outras infecções multissistêmicas que ocorre principalmente em doentes imunodeprimidos, verificando a presença de *Legionella* em casos de pancreatite, pielonefrite, endocardite, miocardite e pericardite, sendo o coração o órgão extrapulmonar mais afetado (19).

A Doença dos Legionários é uma forma de pneumonia bacteriana geralmente contraída ao inalar aerossóis de reservatórios contaminados com *Legionella*. Após a exposição tem um período de incubação de 2 a 10 dias. Os principais sintomas são cefaleias, dores musculares, febre, tosse seca e leve, dificuldades respiratórias e falta de apetite. Os indivíduos com doenças pulmonares crônicas, como por exemplo fumadores e idosos, possuem maior suscetibilidade a contraírem esta infecção e as complicações podem ir desde insuficiência renal e respiratória até à falência de vários órgãos, podendo até ser fatal (20).

A febre de Pontiac é uma forma leve da doença dos Legionários, apresenta um período de incubação de 5 horas a 3 dias (21). É caracterizado por sintomas de gripe aguda e leve, sem a ocorrência de pneumonia, mialgia, febre, náuseas e geralmente não está associada a casos de mortalidade. Estes sintomas duram de 2 a 7 dias no geral.

A transmissão da *Legionella pneumophila* para os seres humanos ocorre através da inalação de aerossóis contaminados gerados através de alguns sistemas artificiais de água feitos pelo ser humano, como por exemplo os sistemas de distribuição de água potável, os sistemas de ar condicionado e torres de refrigeração (22). Um dos processos fundamentais para a transmissão de *Legionella pneumophila* é a formação de aerossóis, sendo que o tamanho destes também tem uma grande importância, pois os aerossóis precisam ser relativamente pequenos para que ocorra a deposição nos alvéolos pulmonares e grandes o suficiente para conter as bactérias virulentas (23). Quando atingirem os alvéolos pulmonares, as bactérias proliferam no interior dos macrófagos alveolares, desencadeando assim infecções bacterianas como a doença dos Legionários (20).

Em relação à transmissão de *Legionella pneumophila* entre seres humanos foi recentemente investigado por Correia e colaboradores (2016) (24) um caso provável durante o surto ocorrido em Vila Franca de Xira no ano de 2014. Porém, persistem muitas questões relativamente à ocorrência da transmissão entre humanos.

### **1.5. Multiplicação de *Legionella* nos macrófagos alveolares humanos**

Os macrófagos alveolares são células que têm como função desenvolver respostas imunológicas contra microrganismos e agentes estranhos. Contudo, alguns microrganismos como *Legionella pneumophila* desenvolvem vários mecanismos com o objetivo de evitar as respostas imunológicas conferidas pelos macrófagos, permitindo assim que estas bactérias sobrevivam e proliferam no seu interior (8). Como citamos anteriormente a infecção ocorre quando o homem inala ou aspira aerossóis de dimensões pequenas contaminados com *Legionella pneumophila* onde estas atingem os pulmões humanos.

No momento em que as bactérias entram nos pulmões elas invadem os macrófagos alveolares e as células epiteliais e através de alguns mecanismos semelhantes aos que utilizam para invadir os seus hospedeiros naturais conseguem sobreviver e multiplicar no interior dos mesmos (25). No interior dos macrófagos alveolares a *Legionella pneumophila* integra um compartimento celular originado do retículo endoplasmático da célula hospedeira, designado Vacúolo contendo *Legionella* (VCL). Através do VCL evitam a digestão feita pelos lisossomas sobrevivendo aos mecanismos de defesa dos macrófagos alveolares, e procedem ao seu crescimento e multiplicação (25, 26).

A multiplicação e a proliferação da *Legionella pneumophila* no meio intracelular dos macrófagos alveolares humanas dão origem a um processo de inflamação e destruição dos tecidos pulmonares desencadeando assim o desenvolvimento de infecções bacterianas como a doença dos Legionários ou a febre de Pontiac (20, 27).

### **1.6. Mecanismos de infecção e replicação intracelular**

Quando a *Legionella pneumophila* alcança a célula hospedeira ela é absorvida por fagocitose ou pinocitose para o seu meio intracelular, evidenciando que a mobilidade das bactérias também está envolvida no processo de entrada (20).

Normalmente as células hospedeiras eliminam os microrganismos detetados no seu meio intracelular através dos lisossomas por um processo de digestão que ocorre em meio ácido contendo enzimas hidrolíticas (27). Porém, assim que a *Legionella pneumophila* entra no meio intracelular do hospedeiro vai conseguir evitar o seu reconhecimento e a digestão efetuada pelos lisossomas integrando um novo VCL (8).

No interior do VCL, a *Legionella pneumophila* vai diferenciar-se na sua fase replicativa, conseguindo multiplicar-se induzida pela presença de nutrientes como os aminoácidos. Ao mesmo tempo a membrana do VCL vai atrair vários componentes celulares como é o caso da mitocôndria e dos ribossomas, ficando rodeada por vesículas derivadas do retículo endoplasmático da célula hospedeira, tornando-se assim muito semelhante á membrana do reticulo endoplasmático a nível de espessura e da composição proteica, passando assim despercebido ao sistema imunitário celular (8).

O VCL confere a proteção para que as bactérias não sejam identificadas pelo sistema imunitário e também garante as condições necessárias para a sua multiplicação, disponibilizando uma boa quantidade de nutrientes. E, são por esses motivos por ele ser é extremamente importante para o ciclo de vida intracelular de *Legionella pneumophila* (27).

Com o passar do tempo a disponibilidade dos nutrientes no interior do VCL vai tornando-se reduzida obrigando a transição das bactérias da fase replicativa para a fase transmissiva, diferenciando-se numa forma intracelular madura que possui altos níveis de virulência e mobilidade (20). Em seguida, são libertadas para o citoplasma deixando a célula hospedeira através da morte celular. Ao saírem para o meio extracelular podem invadir um novo hospedeiro iniciando assim um novo ciclo de vida no seu interior (20). A bactéria *Legionella pneumophila*

possui uma elevada capacidade de adaptação ao estilo de vida intracelular no interior de várias células hospedeiras (25).

### **1.7. Reservatórios naturais e artificiais**

Os reservatórios naturais são basicamente constituídos por ambientes de água doce, como rios, lagos, lagoas, águas termais e também nos solos, onde a espécie *Legionella longbeachae* tem sido detetada. Para além dos reservatórios naturais, os microrganismos *Legionella* também estão presentes em diversos sistemas de água artificiais construídos pelo homem, tais como: redes de distribuição de água potável, fontes, chuveiros, torres de refrigeração, sistemas de ar condicionado ou sistemas de água quente (6, 28). Sabendo que os sistemas de água artificiais, principalmente os que são mal concebidos, instalados e monitorizados pelo homem, podem proporcionar condições favoráveis de crescimento e aumento repentino na concentração de *Legionella*, fazendo com que estes sistemas sejam focos de infeção para os seres humanos (29). Enquanto os reservatórios naturais raramente estão associados a focos de infeção de *Legionella*, pois as condições existentes no meio ambiente não permitem que ocorra uma elevada proliferação, sendo as águas termais a única exceção onde geralmente as temperaturas rondam os 35 °C (30).

### **1.8. Detecção e quantificação de *Legionella***

Para a deteção da *Legionella* é necessário ter em consideração que uma amostra retirada de um sistema de água, consiste apenas numa pequena quantidade do volume total desse sistema. A obtenção de um resultado negativo para a sua presença ou baixos níveis de concentração, não significa que todo o sistema esteja controlado pois as bactérias *Legionella* não apresentam uma distribuição uniforme, podendo assim variar a sua presença e concentração de zona para zona (31). Um resultado positivo para a deteção de *Legionella*, não significa que ocorra a transmissão para o meio ambiente e conseqüente infeção para os seres humanos (4).

Os valores de referência para as concentrações de *Legionella* spp são (4, 32):

- a) **Torres de refrigeração** - Valores de concentração inferiores a 1000 ufc/L, o equipamento está considerado controlado, contudo deverá rever-se os procedimentos de manutenção do sistema para tentar diminuir os níveis o máximo possível;

- b) **Sistemas de água quente e água fria** – Valores de concentração inferiores a 100 ufc/L. O sistema encontra-se controlado, no entanto deverão ser revistos os procedimentos de manutenção dos sistemas com o intuito de reduzir a concentração;
- c) **Equipamentos médicos geradores de aerossóis (utilizados para terapia respiratória)**  
– Valores de 0 ufc/L, onde não deve ser detetada a presença de *Legionella* devido ao elevado risco de transmissão.

Esses valores de referência estão de acordo com a legislação Portuguesa publicada em Diário da República, na Portaria nº 353-A/2013 de 4 de dezembro de 2013, onde se indica que os valores de concentração de referência de *Legionella* são expressos em ufc/L, valores esses que nas matrizes de água necessitam de ser inferiores a 100 ufc/L, exceto as torres de refrigeração em que os valores de concentração devem ser inferiores a 1000 ufc/L. Lembrando ainda que a espécie *Legionella pneumophila* não deve estar presente.

### **1.9. Técnicas de deteção laboratorial de amostras ambientais de *Legionella***

O método recomendado, e também o mais utilizado, para a deteção de *Legionella* a partir de amostras de água é o método cultural em meios seletivos seguindo a norma ISO 11731:2017 (4, 32). De acordo com a Norma ISO 11731:2017 *Water quality – Enumeration of Legionella* de 2017 o método utilizado para analisar amostras de água pode ser a partir de processos de filtração de membrana, diluição ou inoculação direta nos meios de cultura seletivos, dependendo da origem e das características das amostras de água recolhidas. Com o objetivo de abrandar o crescimento dos microrganismos interferentes na análise da amostra são submetidos pré-tratamentos térmicos ou ácidos. Nos tratamentos térmicos a amostra é colocada num recipiente esterilizado em banho-maria a uma temperatura de 50°C por 30 minutos. Quando se trata de tratamentos ácidos pode ser realizado diretamente na membrana de celulose onde é adicionado 30 ml de solução ácida com um valor de pH de 2,2 por 5 minutos. A filtração através de membrana é o processo mais utilizado para a deteção de *Legionella* em amostras ambientais, visto que a concentração de *Legionella* presente na amostra é geralmente desconhecida. O equipamento utilizado para este tipo de filtração, deve possuir a capacidade para filtrar volumes de água entre 10 e 1000 ml. Existem dois métodos distintos para realizar a filtração de membrana:

- a) Método de filtração de membrana e adição direta da membrana nos meios seletivos de cultura;
- b) Método de filtração de membrana seguido de processo de lavagem.

No método de filtração de membrana e adição direta da membrana nos meios seletivos de cultura, a amostra deve ser filtrada utilizando membranas de nitrato de celulose com porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$  ou 0,45  $\mu\text{m}$ . Para finalizar o processo de filtração, a membrana é retirada com o auxílio de uma pinça esterilizada e colocado diretamente no meio de cultura.

Na técnica de filtração seguida de procedimento de lavagem, a amostra é filtrada recorrendo-se a membrana de policarbonato com uma porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ . No final da filtração a membrana é transferido num recipiente esterilizado para proceder à lavagem, onde é necessário adicionar entre 5 e 10 ml de diluente esterilizado. Seguidamente, o concentrado é dividido em 3 porções: uma sem tratamento, uma com tratamento ácido e outra com tratamento térmico.

Após a realização dos métodos de filtração de membrana as amostras são inoculadas em meios de cultura seletivos para o crescimento de *Legionella*. Os meios seletivos usados para inocular as amostras são o meio agar BCYE, BCYE-cys, e os meios altamente seletivos, BCYE+AB e agar GVPC (Glicina, Vancomicina, Polimixina B, Cicloheximida). O tempo de incubação indicado varia entre 7 e 10 dias à 36°C. No final deverá ser verificado se houve crescimento, observando a presença de colónias de *Legionella*, que apresentam normalmente uma tonalidade esbranquiçada. Para a diferenciação das espécies de *Legionella* presentes, os meios são observados através de uma lâmpada ultravioleta que emite fluorescência com um comprimento de onda de 360 nanómetros. As espécies são facilmente diferenciadas quando são submetidas à luz ultravioleta (UV). Em relação a *Legionella pneumophila* ela apresenta uma coloração esverdeada quando é submetida à radiação UV. Para finalizar deverá ser realizada a confirmação das colónias de *Legionella* através da inoculação no meio BCYE e no meio BCYE-cys, que não contém L-cisteína, durante 5 dias à 36°C. No final deverão ser consideradas as colónias que apresentam crescimento no meio BCYE e que não exibem crescimento no meio BCYE-cys (33). O método de cultura seletivo é o mais utilizado para a deteção de *Legionella* em amostras de água ambientais apesar de possuir algumas limitações que podem interferir com os resultados obtidos, como por exemplo o longo período de duração do ensaio, a incapacidade para deteção de bactérias em estado VBNC, a baixa sensibilidade e a constante perda de viabilidade das amostras (8).

Um método alternativo para a deteção de *Legionella* através de amostras ambientais de água é o método de PCR em tempo real que assegura uma alta especificidade e uma rápida deteção. A utilização deste método deverá ser efetuada de acordo com a Norma ISO 11731:2017 (32). O PCR em tempo real consiste na deteção e quantificação de *Legionella* spp. e de *Legionella pneumophila* nas amostras de água através da amplificação de sequências do DNA bacteriano, quantificando o número de cópias presentes na amostra (32). O método de PCR em tempo real ultrapassa muitas das limitações do método de cultura, porém possui as suas próprias desvantagens. Uma das desvantagens deste método é que ele não diferencia as bactérias viáveis das não viáveis, porque determina toda a quantidade de DNA bacteriano de *Legionella* presente na amostra (34). Devido a esta limitação o resultado das concentrações presentes poderá estar acima do esperado. Por este motivo este método não é muito indicado para monitorizar os níveis de *Legionella* presentes em alguns sistemas e equipamentos, já que não garante que os resultados de quantificação da concentração obtida sejam fidedignos para analisar se as medidas de controlo implementadas estão ou não a ser eficazes.

Contudo, o PCR em tempo real por permitir uma rápida deteção de *Legionella* (inferior a 24 horas), e ao quantificar todo o DNA bacteriano presente na amostra pode ser extremamente importante para as investigações epidemiológicas ambientais, possibilitando eliminar rapidamente possíveis fontes suspeitas se o resultado obtido para a presença de *Legionella* for negativo (8, 32). Uma outra desvantagem do método de PCR em tempo real, é a expressão dos resultados obtidos, pois a unidade de medida para a concentração de *Legionella* presente é expressa em ug/L, dificultando a interpretação dos resultados de acordo com as várias diretrizes em que os níveis de *Legionella* são contabilizados em ufc/L (32).

#### **1.10. Controlo e prevenção de *Legionella* nos sistemas de água**

Quando se trata de medidas preventivas depende do conhecimento das causas que provocam a contaminação. As medidas de prevenção baseiam-se no desenvolvimento de planos de manutenção em cada equipamento e sistema passível da presença desta bactéria que garantem um controlo seguro em todas as partes do sistema ou equipamento, assim como um plano de desinfeção e limpeza regular (32).

Segundo o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e o Instituto Português da Qualidade (IPQ) 2014, no geral, as medidas de controlo que devem ser empregados nos equipamentos e sistemas de água são (31, 32):

- a) Monitorização regular do controlo microbiológico e parâmetros como o pH, temperatura, quantidade de biocida;
- b) Evitar que ocorram processos de corrosão;
- c) Monitorizar periodicamente as concentrações de *Legionella* presentes;
- d) Aplicar tratamentos de manutenção através de biocidas;
- e) Evitar zonas de baixo fluxo ou mesmo estagnação de água, realizar mecanismos que desenvolvam uma boa circulação da água nessas zonas.

Um dos processos importantes para avaliar se o equipamento ou o sistema está controlado, e também para prevenir um possível risco de transmissão para os humanos, é a monitorização periódica das concentrações de *Legionella* presentes nos diversos sistemas e equipamentos de risco. A monitorização periódica das concentrações de *Legionella* presentes deve ser feita pelo menos de três em três meses nas torres de refrigeração e nos sistemas de água quente, porém, ainda segundo o ECDC poderá ter que ser efetuada com maior regularidade de acordo com as seguintes situações:

- a) Em situações de serem detetadas amostras positivas de *Legionella* é necessária uma monitorização com maior frequência permitindo avaliar se os métodos implementados estão a conseguir reduzir a presença de *Legionella* e para verificar se o sistema ou equipamento se encontra controlado;
- b) Em situações em que se verifica que não estão a ser implementados corretamente os planos de prevenção e controlo;
- c) Se após a realização da análise de risco do equipamento, a mesma indicar que devem ser aplicadas a monitorizações com maior frequência, como por exemplo devido à proximidade de populações com maior suscetibilidade;
- d) Em situações de investigações epidemiológicas a nível ambiental para identificação do foco de infeção.

As medidas de controlo aplicadas para impossibilitar a proliferação de *Legionella* podem variar de acordo com as concentrações detetadas nos vários sistemas e equipamentos podendo mesmo ter que ocorrer alterações às medidas previamente estabelecidas, bem

como em casos de risco elevado ou associação a surtos de *Legionella* ser necessário recorrer a técnicas de desinfeção e tratamentos de choque (4, 32).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo do Estágio**

Desenvolver competências laboratoriais para acompanhar e realizar as técnicas de PCR em tempo real e método cultural para pesquisa de *Legionella spp* e *Legionella pneumophila* nas 2 matrizes, bem como o envolvimento na rotina laboratorial com todas as exigências de adaptação às múltiplas tarefas.

### **2.2. Objetivo estudo de caso específico**

O objetivo deste trabalho é comparar a técnica do PCR em tempo real e o método cultural pela análise dos resultados obtidos na pesquisa e quantificação de *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* em amostras de águas de consumo humano e águas de processo colhidas e processadas pela Biogerm S.A.

### **3. Métodos**

Os métodos de ensaio utilizados foram devidamente executados por técnicos especializados da Biogerm – Laboratórios S.A. seguindo o documento normativo elaborado por um organismo setorial integrando representantes do setor técnico em questão.

#### **3.1. Amostragem**

A colheita das amostras foi realizada de acordo com o procedimento operativo de microbiologia – “Colheita de amostras para análise de *Legionella*”, e efetuada por técnicos especializados do laboratório, utilizando equipamento de proteção individual adequado.

Foram colhidas amostras de água, durante o ano de 2020, um total de 3 721 amostras de diferentes matrizes. Destas, 1 823 amostras são provenientes de águas de consumo humano e 1 898 amostras são provenientes de águas de processos. Todas foram analisadas para averiguação de contaminação por *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* pelo método PCR em tempo real e método cultural.

Colheram-se 1L de cada amostra, em garrafas esterilizadas, devidamente identificadas. Após o procedimento de recolha de água, as amostras foram acondicionadas em malas térmicas com acumuladores térmicos próprios devidamente limpos e transportadas para o laboratório para serem analisadas.

#### **3.2. Preparação de amostras de água para amplificação por PCR em tempo real**

Para a amplificação por PCR em tempo utilizamos o kit qqualyfast® da Bioside que tem como princípio a amplificação de sequências de DNA específicas pertencentes às espécies do género *Legionella* e da espécie *Legionella pneumophila* e a co-amplificação simultânea de um controle de inibição de amplificação. Todos os reagentes são pré-dosados e liofilizados nos tubos de reação, permitindo o armazenamento à temperatura ambiente. Um total de 15 µL de DNA extraído foi adicionado a cada tubo contendo reagentes liofilizados. Um total de 15 µL de solução livre de DNA foi adicionado a controlos positivos e negativos e à escala de calibração (padrão externo). O qqualyfast® *Legionella* contém sondas com um inibidor não fluorescente e a referência passiva não está presente. Foi preparado um número de tubo de reação pronto para uso, correspondendo ao número de amostras testadas e adicionou-se um tubo como controlo negativo.

Fez-se alíquotas de 15 uL das amostras de DNA extraídas em cada tubo de reação e, a seguir, adicionou-se 15 uL de solução livre de DNA no tubo selecionado como controle negativo. Por fim, foi adicionado 15 uL de solução livre de DNA no tubo de controle positivo. Os tubos foram fechados e centrifugados para evitar bolhas.

Depois de colocar as amostras no termociclador para PCR em tempo real, iniciou-se a execução da análise. No final da execução da análise, os dados de cada poço foram analisados por meio do software Thermalcycler, de acordo com as instruções relatadas no manual do usuário para verificar a presença da *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila*.

### 3.3. Exame cultural de amostras de água

Para realização da análise das amostras segundo o método cultural, procedeu-se em laboratório, a detecção e quantificação de *Legionella*. O método de análise utilizado rege-se pela Norma ISO 11731:2017 *Water quality – Enumeration of Legionella*. Basicamente, a Norma ISO 11731:2017 viabiliza diferentes abordagens para tratamento e preparação das amostras. Assim, a escolha do método foi feita a partir de uma estimativa da concentração esperada de microrganismos interferentes, com base na origem da amostra. Desta forma, a referida norma providencia uma matriz de decisão que sumarizou as possibilidades de amostras, métodos, tipo de tratamentos e meios de cultura a utilizado.

Através da matriz de decisão, primeiramente foi caracterizada a amostra segundo a origem e as características da água a analisar:

- a) **Matriz A** – Águas com baixos interferentes (águas de consumo);
- b) **Matriz B** – Águas com alto interferentes (águas de processo).

De seguida foi feito a determinação do limite de detecção desejado e através disso selecionou-se um ou mais métodos a utilizar na análise. Posteriormente, verificou-se se as amostras podiam ser analisadas por inoculação direta, filtração por membrana ou filtração por membrana com eluição.

O passo seguinte foi perceber os tratamentos necessários para realizar, tendo em conta a matriz e método considerado. Para tal, foi realizado o tratamento térmico, ácido, combinado (ácido e térmico), e foi também analisada a amostra sem nenhum tipo de tratamento. A aplicação dos tratamentos térmico e ácido tem como o objetivo reduzir o crescimento de microrganismos interferentes. No tratamento térmico da amostra, o tubo estéril com 1 mL de amostra foi colocado

em banho-maria a  $50\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, e no tratamento ácido diluiu-se um volume de amostra em nove de solução ácida e deixado em repouso por cerca de 5 minutos.

A sementeira foi efetuada em placas de BCYE e GVPC da marca Oxoid. Após a inoculação, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias.

As colónias presuntivas foram confirmadas através de repicagem para BCYE que permitiu a análise do requisito de L-cisteína para o crescimento de *Legionella spp.*

Após o período de incubação de 2 a 5 dias, as colónias que cresceram em BCYE foram consideradas como sendo *Legionella spp.* A identificação da espécie destas colónias é possível através do uso de um teste de aglutinação Latex. Neste caso, o teste utilizado é o *Legionella* Latex Test da Oxoid. Neste teste usou-se partículas latex de poliestireno azul sensíveis a anticorpos que se aglutinaram na presença de antigénios específicos da parede celular da *Legionella*. Foi possível a identificação separada da *Legionella pneumophila* serogrupo 1, serogrupos 2 e 14 através deste método.

#### 4. Resultados

Em relação ao número de amostras de águas de consumo humano e de processos analisadas no local de estágio, estão representados na Gráfico 1. Num total de 3.721 amostras colhidas, 48,9% (n=1823) são amostras de águas de consumo humano e 51,1% (n=1898) são águas de processo, para a deteção de *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* por PCR em tempo real.

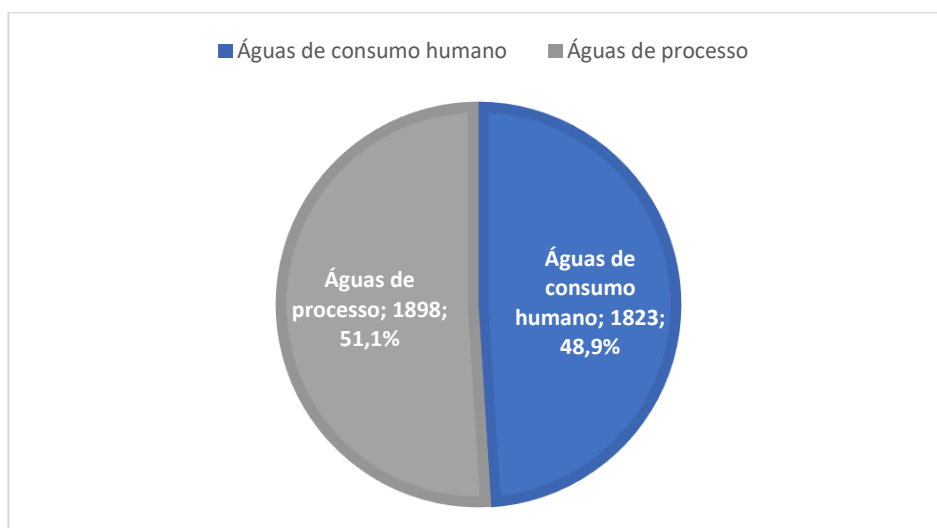


Gráfico 1: Número de amostras de águas de consumo humano e águas de processo analisadas no local do estágio

Em relação a águas de consumo humano foram analisados um total de 1823 amostras pelo método PCR em tempo real e 16,18% das amostras acusaram presença de *Legionella*. Destas amostras foram detetadas em 95,6% (n=282) *Legionella spp.*, e 4,6% (n=13) *Legionella pneumophila* (Gráfico 2).

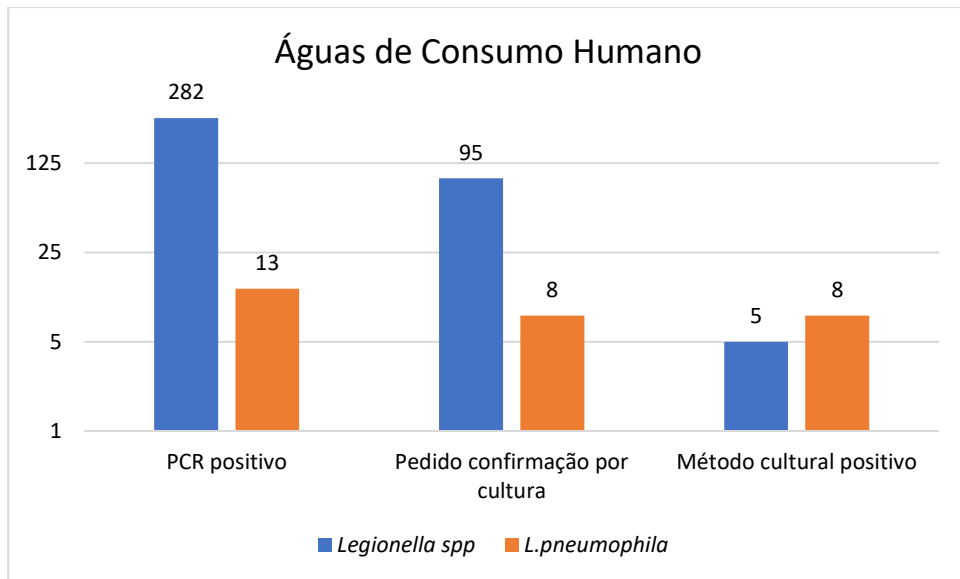


Gráfico 2 : Resultados obtidos pelos dois métodos aplicados (PCR em tempo real e Método Cultural) na detecção de *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* nas amostras de água de consumo humano

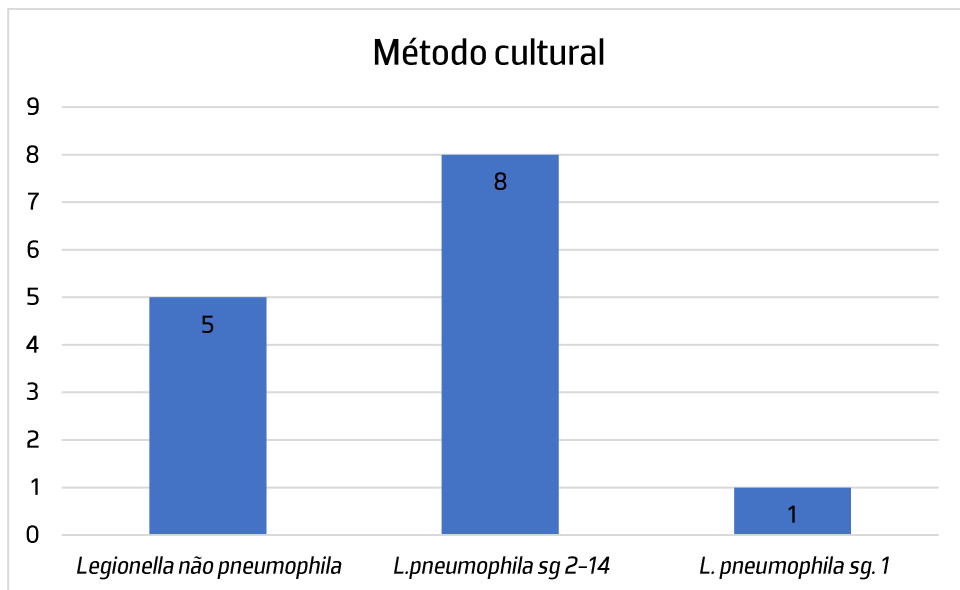


Gráfico 3: Resultados obtidos pelo Método Cultural na detecção de *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* nas amostras de água de consumo humano

Das 295 amostras de águas de consumo humano, 113 foram analisados pelo método cultural e foram positivas 95% para *Legionella spp.* e 8% para *Legionella pneumophila*. Das amostras positivas para *Legionella spp.*, 5,3% foram confirmadas no método cultural (detetadas *Legionella não pneumophila*). E em relação às 8 amostras positivas para *Legionella pneumophila* 100%

delas foram confirmadas no método cultural (detetadas *Legionella pneumophila* sg. 2-14 e *Legionella pneumophila* sg. 1).

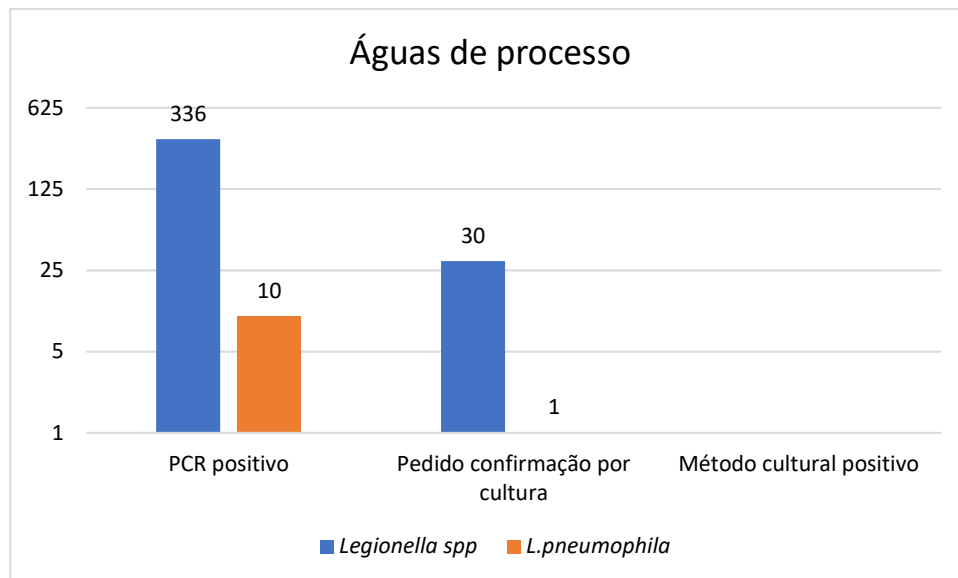


Gráfico 4: Resultados obtidos pelos dois métodos aplicados (PCR em tempo real e Método Cultural) na detecção de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* nas amostras de água de processo

Em relação as amostras de águas de processo foram analisadas um número maior em relação às águas de consumo humano (uma diferença de 2,2%). De 1898 amostras analisadas pelo método de PCR em tempo real foi detetado a presença de *Legionella* em 18,23% das amostras, sendo que 97,1% (n=336) dessas eram *Legionella spp* e apenas 2,9% (n=10) eram *Legionella pneumophila* (Gráfico 4).

Das amostras de águas de processo, das 346 amostras positivas no método PCR em tempo real apenas 9% (31 amostras, sendo que 30 eram positivas para *Legionella spp* e 1 para *Legionella pneumophila* no PCR em tempo real) delas foram analisadas pelo método cultural e não foi detetado nenhuma bactéria.

## 5. Discussão

Os resultados sugerem que o método cultural assim como o PCR em tempo real, apresentam vantagens e limitações:

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos métodos PCR em tempo real e do Cultural segundo o INSA (1)

Métodos	Vantagens	Desvantagens
PCR em tempo real	<ul style="list-style-type: none"><li>• Capacidade de resposta em poucas horas;</li><li>• Elevada sensibilidade.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elevado custo;</li><li>• Necessidade de pessoal técnico qualificado para a correta interpretação dos resultados obtidos;</li><li>• Não existência de correlação entre UG (unidades genómicas) e UFC (Unidades formadoras de colónias)</li></ul>
Método Cultural	<ul style="list-style-type: none"><li>• Capacidade de isolar as diferentes estirpes de <i>Legionella</i>;</li><li>• Possibilidade de descobrir o agente etiológico nos IE;</li><li>• Possibilidade de comparação de estirpes clínicas com estirpes ambientais.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Método exigente em tempo, meios de cultura, reagentes e experiência técnica.</li><li>• Menos sensível que o PCR em tempo real.</li></ul>

Nem todas as amostras de água positivas pelo método de PCR em tempo real foram confirmadas pelo método de cultura por opção do cliente, visto que não existe regulamentação que obrigue a fazer esta confirmação e também pelo método cultural exigir mais tempo (de 7 a 10 dias), optando assim por intervir logo com medidas de controlo e prevenção.

Segundo a Direção-Geral da Saúde (2013) a existência de um resultado positivo de *Legionellas* águas não indica necessariamente que ocorra a doença dos Legionários. Da mesma forma que um resultado negativo, apesar de talvez transmitir uma falsa sensação de estabilidade e de segurança, não garante a ausência da bactéria no sistema (36).

Analisando os resultados obtidos das amostras processadas pelos dois métodos, pode-se admitir que um resultado negativo pelo método do PCR em tempo real é certo que será também negativo pelo método Cultural. Tal é afirmado pela ECDC (2017) e em estudos realizados por Joly et al. (2006) e Yaradou et al. (2007) (32, 37, 38). Yaradou et al. (2007) apresentaram resultados negativos no PCR em 46 amostras provenientes de torres de refrigeração e nenhuma delas apresentou resultado positivo em cultura, concluindo que resultados negativos pela técnica PCR em tempo real são importantes para indicar o risco, principalmente em amostras de torres de refrigeração. A presença de amostras que apresentam resultados positivos no método PCR em tempo real, e “Não Detetado” para *Legionella spp.* e *Legionella pneumophila* pelo Método Cultural é explicado pelo fato do PCR em tempo real ter elevada sensibilidade, detetando bactérias viáveis e não viáveis, sendo possível obter resultados positivos, em casos em que o método de cultural não deteta, pois é menos sensível e só deteta bactérias num estado cultivável.

Assim, verificamos que foram detetadas a presença de bactérias do género *Legionella* nas amostras, mas que algumas se encontram num estado não viável ou não cultiváveis. Essas últimas podem ou não estar associadas a protozoários e/ou biofilmes, possibilitando que a bactéria sobreviva em ambientes adversos diminuindo o seu crescimento da mesma no método cultural podendo não ser detetável. Trone e Hartemann (2008), afirmam que em amostras de água são necessários estudos adicionais, realçando a importância de confirmar pelo método cultural os detetados pelo método PCR, para uma correta interpretação em especial na técnica quantitativa em tempo real. Yaradou et al. (2007) afirmam ainda que, nas amostras de torres de refrigeração, os resultados pelo método de PCR são importantes para uma monitorização rápida e permitem suspeitar a presença de células viáveis, mas não cultiváveis (38).

Quanto aos serogrupos de *Legionella pneumophila*, o serogrupo 2-14 foi encontrado com maior frequência (n=8) nas águas de consumo humano, superior à frequência do serogrupo 1 (n=1). A *Legionella pneumophila* sg.1 é a mais importante pela sua patogenicidade para o Homem, responsável por 80 a 90% das infeções humanas e encontrada em maioria dos pacientes com a Doença dos Legionários (39).

Derivado as variáveis apresentadas na deteção da *Legionella*, torna-se ainda mais importante o controlo de vigilância da mesma, de forma sistemática, para garantirem maior fiabilidade possível nos resultados e poderem salvaguardar de possíveis surtos.

## 6. Conclusão

O presente trabalho exposto neste relatório, foi possível pelo estágio realizado na Biogerm – Laboratórios S.A. no período de janeiro a julho e orientado pelo professor Dr. António Araújo. Este estágio contribuiu indubitavelmente para perceber que as contaminações microbiológicas de água pelas bactérias patogénicas do género *Legionella* constitui um problema de saúde pública. As aplicações de tratamentos para minimizar o crescimento e a proliferação de *Legionella* juntamente com medidas de controlo físico e químico e também de prevenção microbiológica revelam-se de extrema importância para combater este problema.

Apesar de existir uma variedade de técnicas de desinfeção para minimizar/eliminar as bactérias do género *Legionella* nos sistemas de águas, cada uma delas apresentam vantagens e desvantagens não tendo ainda sido identificado um método padrão de ouro de desinfeção. Nestes casos é necessária uma combinação de várias técnicas diferentes que garantem uma maior eficácia no controlo desta bactéria, visto que uma desinfeção precária, pode levar rapidamente ao surgimento de surtos de legionelose.

As técnicas de pesquisa, identificação e quantificação de *Legionella* em amostras de água mostram-se bastante úteis no controlo e prevenção desta bactéria, dando importância a rapidez e precisão dos testes de rotina para a sua monitorização e que permitam detetar tanto as células viáveis quanto aquelas que não podem ser cultivadas. Neste caso, foi abordado neste relatório o método PCR em tempo real normalizado pela ISO 1173 que por ser um método bastante rápido e sensível deteta células viáveis e não viáveis mostrando também a importância da confirmação da possibilidade dessas células serem cultiváveis e viáveis com o método cultural em caso de PCR em tempo real positivo. No entanto, o método cultural mostra-se bastante complexo e demorado além de existirem situações em que a bactéria se encontra em concentrações mínimas ou associado a protozoários ou biofilmes, tornando-se não cultivável, impossibilitando a sua deteção.

E por fim, pode-se constatar que os objetivos definidos inicialmente foram cumpridos. Tal constatação adveio do fato de que a partir dos resultados obtidos ter permitido analisar as duas técnicas de pesquisa e quantificação de *Legionella* de forma a conhecer e compreender as vantagens e desvantagens de cada uma delas bem como o desenvolvimento das competências laboratoriais a partir da realização das duas técnicas e o acompanhamento da rotina laboratorial. Este trabalho, sem ter a mínima pretensão de ser considerado como algo perfeito ou completo, permite a reflexão e mais uma perspetiva no campo da investigação sobre a problemática das

bactérias *Legionella*, que deve ser um trabalho contínuo que deve acompanhar o processo das mudanças que ocorrem em todo o campo da microbiologia.

## Referências Bibliográficas

- 1) Pizarro C, Rodrigues R. Amostragem e Análise de Legionella em Sistemas de Água. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge..
- 2) A C England, D W Fraser, B D Plikaytis, T F Tsai, G Storch, C V Broome. Sporadic legionellosis in the United States: the first thousand cases. 1981.
- 3) Ministério da Saúde. Portaria nº 1071/98. Tabela das doenças de declaração. Diário da República, 1ªsér. B. 1998 Dezembro 3..
- 4) Benoiel, MJ, ALAC Fernando, and P. Diegues. Prevenção e Controlo de Legionella nos Sistemas de Água. 2018.
- 5) Gaspar, C., Augusto, G., Albuquerque, M., Nascimento, M., Vicêncio, P., & Nogueira, P. Doenças de Declaração Obrigatória. 2017.
- 6) Gomez-Valero, L., Rusniok, C., & Buchrieser, C. Legionella pneumophila: Population genetics, phylogeny and genomics. Infection, Genetics and Evolution. 2009: p. 727-739.
- 7) Ambrósio, L. A. F. M. Legionella: Transmissão e controlo. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Portugal. 2017.
- 8) Nogueira, R., Utecht, K. U., Exner, M., Verstraete, W., & Rosenwinkel, K. H. Strategies for the reduction of Legionella in biological treatment systems. Water Science and Technology. 2016: p. 816-823.
- 9) Khodr, A., Kay, E., Gomez-Valero, L., Ginevra, C., Doublet, P., Buchrieser, C., & Jarraud, S. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella. Infection, Genetics and Evolution. 2016: p. 108-122.
- 10) Bartram J, Chartier Y, Lee JV, et al. Legionella and the prevention of legionellosis. World Health Organization. 2007.
- 11) CUF. Legionella: o que deve saber.; 2018. Available from: <https://www.saudecuf.pt/mais-saude/artigo/Legionella-o-que-deve-saber>.
- 12) Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., & Messi, P. Water ecology of Legionella and protozoan: Environmental and public health perspectives. 2005: p. 355-380.

- 13) Sheehan, K. B., Henson, J. M. and Ferris, M. J. Legionella species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1). 2005: p. 507–511.
- 14) Subbaram, K., Kannan, H., & Masadeh, M. M. A. Isolation, identification, characterization and antibiotic sensitivity profile of pathogenic Legionella pneumophila isolates from different water sources. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016: p. 411–415.
- 15) Springston, J. P., & Yocavitch, L. Existence and control of Legionella bacteria in building water systems: A review. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2017.
- 16) Maiwald M., Kissel K., Srimuang S., von Knebel D. M., and Sonntag H. G. Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of Legionellas in hospital water samples. *Journal of Applied Bacteriology*. 1994 Março: p. 216–225.
- 17) Palusińska-Szyszk, M., & Cendrowska-Pinkosz, M. Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2009.
- 18) Marques, M., Froes, F., Brum, G. e Esteves, A. Doença dos legionários: Protocolo de diagnóstico. Centro Regional de Saúde Pública de Lisboa e Vale do Tejo. 2003.
- 19) Jamie Bartram, Yves Chartier, John V. Lee, Kathy Bond, Susanne Surman-Lee. Legionella and the prevention of legionellosis. World Health Organization. 2007.
- 20) Eisenreich, W., & Heuner, K. The life stage-specific pathometabolism of Legionella pneumophila. *FEBS Letters*. 2016: p. 3868–3886.
- 21) Pontiac OFd.. [cited 2021 Agosto 7. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Ing=PT&Expert=99748](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=PT&Expert=99748).
- 22) Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., ... Abubakar, I. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014: p. 1011–1021.
- 23) Allegra, S., Leclerc, L., Massard, P. A., Girardot, F., Riffard, S., & Pourchez, J. Characterization of aerosols containing Legionella generated upon nebulization. *Nature Publishing Group*. 2016 Setembro: p. 1–8.
- 24) Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., ... Gomes, J. P. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *New England Journal of Medicine*. 2016: p. 497–498.

- 25) Finsel, I., & Hilbi, H. Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: how to kill one bird with many stones. *Cellular Microbiology*. 2015: p. 935–950.
- 26) Sherwood, R. K., & Roy, C. R. Autophagy Evasion and Endoplasmic Reticulum Subversion: The Yin and Yang of *Legionella* Intracellular Infection. *Annual Review of Microbiology*. 2016: p. 413–433.
- 27) Xu, L., & Luo, Z. Q. Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection*. 2012: p. 157–167.
- 28) Montagna, M. T., de Giglio, O., Cristina, M. L., Napoli, C., Pacifico, C., Agodi, A., Pasquarella, C. Evaluation of *Legionella* air contamination in healthcare facilities by different sampling methods: An Italian multicenter study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017.
- 29) Moore, G., & Walker, J. Chapter Seventeen – Presence and Control of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Hospital Water Systems. 2014.
- 30) Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*. 2010 Fevereiro 25: p. 557–566.
- 31) European technical guidelines for the prevention, control and investigation of infections caused by *Legionella* species. [Online].; 2017 [cited 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-technical-guidelines-prevention-control-and-investigation-infections>.
- 32) Instituto Português de Qualidade. Prevenção e Controlo de *Legionella* nos Sistemas de Água. 2nd ed.; 2014.
- 33) European Centre for Disease Prevention and Control. European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by *Legionella* species; 2017.
- 34) Norma ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*; 2017.
- 35) Ditommaso, S., Ricciardi, E., Giacomuzzi, M., Arauco Rivera, S. R., & Zotti, C. M. *Legionella* in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? *Molecular and Cellular Probes*. 2015: p. 7–12.
- 36) Direção Geral da Saúde. Doença dos Legionários. Orientações Programáticas. [Online].; 2013 [cited 2021. Available from: <https://www.dgs.pt/doenca-dos-legionarios/orientacoes-programaticas.aspx>.

- 37) Joly P, Falconnet P. A., Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, et al. Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006: p. 2801–2808.
- 38) Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, et al. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl Environ Microbiol.* 2007: p. 1452–1456.
- 39) Peixe L, Novais C. Legionella: FACTOS ESSENCIAIS E INFORMAÇÕES PRÁTICAS. Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia-FFUP.
- 40) Diegues P. RISCOS DE LEGIONELLA EM SISTEMAS PREDIAIS E SURTOS. Direção-Geral da Saúde, Divisão de Saúde Ambiental e Ocupacional. 2019 Abril.