

Iara Filipa David Vital

**Deteção, identificação e quantificação de
Legionella spp. em amostras de água: comparação da
técnica de PCR-RT com o Método Cultural.**

Orientador: Susana Maria Pereira Dias

Coimbra, 2019

Iara Filipa David Vital

**Deteção, identificação e quantificação de
Legionella spp. em amostras de água: comparação da
técnica de PCR-RT com o Método Cultural.**

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de
Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar

Orientador: Susana Maria Pereira Dias;

Coimbra, 2019

AGRADECIMENTOS

Nem posso acreditar que está a acabar esta grande etapa da minha vida. Ao terminar este trabalho não posso deixar de agradecer a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a sua elaboração e sobretudo para a minha formação, pois sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas, este não teria sido possível.

Queria agradecer ao laboratório Globalab, que me acolheu, e permitiu a realização deste trabalho. À minha orientadora externa, Dra. Joana Martins, pela sua disponibilidade, a sua forma exigente, crítica e criativa de arguir as ideias.

À Escola Superior Agrária Coimbra, e a todos os professores, que me acompanharam nesta jornada, por me proporcionarem o conhecimento, inspiração e conselhos ao longo da minha formação académica e profissional e que levarei para o futuro. A todos os amigos que fiz nesta Instituição, casa e que também fizeram parte da minha formação.

À minha orientadora interna, Susana Maria Pereira Dias, apoio e confiança, pelo seu empenho e dedicação a este trabalho, por estar sempre disponível, ainda que por vezes com os prazos apertados, a sugerir melhorias e a e incentivar-me.

Um especial agradecimento à minha mãe, Maria Vital, que me proporcionou a possibilidade de continuar os estudos. Obrigada pelo amor, pelo incentivo, por todo o apoio incondicional.

Ao meu pai, João David, que levo sempre comigo.

Aos meus irmãos, que mesmo não estando sempre presentes, proporcionaram-me momentos de alegria e fizeram com que as saudades de casa não fossem tão intensas.

Obrigada às minhas amigas de sempre, que mesmo estando fisicamente longe, fizeram-me sempre companhia. Estou muito grata por todas as conversas, pela compreensão, disponibilidade, amizade e palavras de incentivo.

E a todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização deste trabalho, e que não estão aqui referidos.

Muito obrigada!

RESUMO

Uma das bactérias mais perigosas transmitidas pela água é a do género *Legionella*. Infecções causadas por esta bactéria são consideradas atualmente um problema emergente de saúde pública e estão associados a altas taxas de mortalidade, justificando desta forma que o controlo microbiológico das águas seja essencial para garantir a saúde dos trabalhadores e segurança no trabalho em unidades fabris da área alimentar.

Na execução das obrigações legais referidas na Lei n.º 52/2018 é determinado que todos os estabelecimentos, independentemente de terem natureza pública ou privada, sejam obrigados a elaborar um Plano de Prevenção e Controlo de *Legionella* spp., incluindo por exemplo, procedimentos de tratamento, medidas de controlo adotadas e resultados obtidos nas análises efetuada.

Na monitorização da *Legionella* spp., destaca-se a importância das análises de rotina serem rápidas e precisas, permitindo detetar todas as células vivas, incluindo aquelas que não podem ser cultivadas.

Ao longo do estágio colheram-se um total de 14 amostras de água provenientes de diferentes origens: chuveiros, de furo de abastecimento e de água de processos (torres de refrigeração). Estas amostras foram submetidas à pesquisa e quantificação de *Legionella* spp. pela técnica RT-PCR (método já acreditado pela empresa) e pelo Método Cultural.

Constatou-se, através dos resultados obtidos, que o Método Cultural tende a subestimar a presença de *Legionella* spp. Este trabalho veio assim reforçar a importância do uso de métodos de biologia molecular e de métodos culturais, de forma complementar, na deteção, quantificação e identificação adequada dos microrganismos.

Palavras-chave: Água, *Legionella*, Método Cultural, Segurança no Trabalho, Técnica RT-PCR,

ABSTRACT

One of the most dangerous bacteria transmitted by water is *Legionella* spp.. Infections caused by this bacterium are currently considered an emerging public health problem and are associated with high mortality rates if not properly treated. As such, water microbiological control is essential, ensuring the health and safety at work.

In Portuguese Law 52/2018 is established that in all public or private organizations, it is required to applied a *Legionella* spp. prevention and control plan, including for example treatment procedures, control measures adopted and results obtained from the analyzes performed.

For monitoring *Legionella* spp. it is very important that routine analyzes use fast and effective methods, allowing the detection of all living cells, including those that cannot be cultured.

During the internship, a total of 14 water samples were collected from different matrices, such as showers, borehole supply and process water (cooling towers). These samples were subjected to research and quantification of *Legionella* spp. using the RT-PCR technique (method already accredited by the company) and Cultural Method.

From the results obtained we can see that the cultural method tends to underestimate the presence of *Legionella* spp. This work thus reinforces the importance of using molecular biology and cultural methods in a complementary way in the detection, quantification and proper identification of microorganisms.

Keywords: Water, *Legionella*, PCR method, Cultural method, Work safety.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Caracterização do género <i>Legionella</i>	3
1.1.1. Fatores que influenciam o crescimento da bactéria	3
1.1.2. Biofilmes.....	6
1.2. Infecções e sintomas provocados nos seres humanos	8
1.2.1. Ocorrência de surtos de doença causados pela <i>Legionella</i> spp.	10
1.3. Medidas de prevenção e controlo	12
1.4. Enquadramento legal	17
1.5. Métodos laboratoriais para pesquisa e identificação de <i>Legionella</i> spp. em amostras ambientais.....	20
1.5.1. Biologia Molecular (Real -Time PCR).....	20
1.5.2. Método Cultural.....	22
1.5.3. Legiolert TM	23
1.5.4. Legipid [®] Legionella fast detection	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Amostra e amostragem	25
2.2. Análise de legionela pelo método PCR em Tempo Real.....	26
2.3. Análise de legionela pelo Método Cultural	28
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Surtos de Legionela de grandes dimensões ocorridos desde o 1976 – 2017.	10
Figura 2 - Número de casos notificados de Doença dos Legionários, por ano de notificação, Portugal 1999-2017.....	11
Figura 3 - Intensidade de fluorescência versus o número de ciclos de PCR.....	21
Figura 4 – Placa de Petri com Meio de cultura seletivo BCYE.	23
Figura 5 – Garrafa esterilizada, usada na colheita.....	25
Figura 6 – Amostras de águas.	25
Figura 7 - Membrana de filtração de Policarbonato.....	27
Figura 8 - Membranas inseridas em eppendorf após filtração.	27
Figura 9 - Amostra de DNA, após processo de extração e purificação.....	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características da Doença dos Legionários e Febre Pontiac.....	9
Tabela 2 - Materiais e equipamentos utilizados para a análise de Legionella spp. pelo método de PCR.....	26
Tabela 3 - Limites de detecção, vantagens e desvantagem para cada um dos métodos de análise.....	29
Tabela 4 - Resultados obtido referentes às amostras colhidas a 11 de fevereiro e submetidas a análise segundo o Método Cultural e método PCR.....	30
Tabela 5 - Resultados obtido referentes às amostras colhidas a 13 de maio e submetidas a análise segundo o Método Cultural e método PCR.....	32

1. INTRODUÇÃO

O problema relacionado com as bactérias do género *Legionella* é ainda hoje caracterizado (pelo menos no nosso país), pelo facto dos microrganismos deste género bacteriano serem agentes causais de doenças do aparelho respiratório, como a Doença dos Legionários.

Esta bactéria tem como habitat natural ambientes naturais e artificiais. A partir dos ambientes naturais pode colonizar os sistemas artificiais de abastecimento de água, incorporando-se em sistemas de arrefecimento de água de processo industrial e em sistemas de climatização, de diferentes organizações incluindo as do sector alimentar, multiplicando-se sempre que encontre condições favoráveis (Diegues & Martins, 2013).

Para minimizar a proliferação de *Legionella* spp. e o risco associado de Doença dos Legionários, devem ser adotadas medidas de prevenção e de controlo físico-químico e microbiológico, promovendo e mantendo limpas as superfícies dos sistemas de água e de ar. Recomenda-se a realização de análises periódicas nos sistemas/pontos com risco elevado de contaminação por esta bactéria (Diegues & Martins, 2013).

Para deteção e enumeração da *Legionella* spp., o Método Cultural é definido como o método de referência, apesar das limitações. Este é geralmente conhecido como “*gold standard*” (padrão de referência) e permite identificar todas as espécies conhecidas do género *Legionella*. Esta é uma técnica demorada e complicada, devido à dificuldade no isolamento de *Legionella* spp., uma vez que há situações em que a bactéria pode ser viável, mas não cultivável. Essas dificuldades podem conduzir a falsos negativos, havendo uma subestimação da presença de *Legionella* nos sistemas, o que pode ter sérias consequências (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC, 2017).

Para combater essas dificuldades, a técnica de PCR é muito recomendada, pois é um teste rápido desenvolvido para detetar sequências genéticas específicas para todas as espécies do género *Legionella* e é altamente sensível (ECDC, 2017).

Através dos serviços de Segurança e Saúde de uma organização (art. 15º da Lei n.º 102/2009, de 10 de setembro, na sua atual redação), o empregador está obrigado a assegurar uma adequada vigilância dos seus trabalhadores, tendo em conta o facto destes serem expostos, ou potencialmente expostos, a perigos de natureza biológica, como as bactérias da família *Legionellaceae*.

O presente estudo pretendeu abordar a importância do controlo e prevenção da bactéria legionela, no âmbito da análise de risco associado à utilização de água em contexto de trabalho profissional.

No sentido de concretizar este estudo estendeu-se o seu objetivo à comparação entre a técnica de PCR em Tempo Real e o Método Cultural, pela análise dos resultados obtidos na pesquisa e quantificação de *Legionella* spp., em amostras de água de consumo humano, furos de abastecimento e águas de processos colhidas ao longo do período de estágio

O estudo desenvolvido no âmbito do estágio foi realizado no laboratório GLOBALAB - Ensaios Químicos e Microbiológicos, SA, cujo principal objetivo é a realização de análises microbiológicas e físico-químicas a águas e alimentos.

O Globalab garante o apoio qualificado e personalizado à medida das necessidades de cada cliente, garante a receção e tratamento das amostras em qualquer hora do dia e a qualquer dia da semana, permitindo ao cliente uma resposta eficaz e imediata em qualquer situação. O laboratório está acreditado segundo a norma ISO 17025, nos diferentes procedimentos analíticos, controlo de qualidade interno e externo. E, todos os ensaios realizados no Globalab são efetuados por pessoal qualificados, avaliados regularmente recorrendo a materiais de referência, ensaios de comparação interlaboratorial e ensaios em paralelo. Dispõe atualmente, de um quadro de 12 colaboradores. Uma equipa profissional e qualificada com experiências em várias áreas, o que permite efetuar o controlo analítico em águas, como águas de piscina, residuais, minerais e de nascente; subterrâneas/superficiais, balneares e águas para rega; na área alimentar, efetuando colheita de amostras em superfícies (ensaio acreditado segundo a ISO 18593:2004) e superfícies de carcaças (ensaio acreditado segundo a ISO 17604:2015), controlo analítico de produtos alimentares, estudos de validade dos produtos, valores nutricionais e caracterização para fins de rotulagem, entre outros análises.

Na prossecução do objetivo do estudo e presente estágio no laboratório, procurou-se também desenvolver competências laboratoriais ao realizar o acompanhamento das atividades correntes do laboratório onde o estágio foi efetuado, bem como o envolvimento na rotina laboratorial com todas as exigências de adaptação às múltiplas tarefas, execução das técnicas de análise e integração num ambiente empresarial.

1.1. Caracterização do género *Legionella*

O género *Legionella* é o único pertencente à família *Legionellaceae*. A família *Legionellaceae* pertence à γ -subdivisão das Proteobactérias e está inserida na ordem *Legionellales* (Palusińska-Szyszk & Cendrowska-Pinkosz, 2009). Esta ordem tem duas famílias: *Legionellaceae* e *Coxiellaceae*. Garrity *et al.* (1980) propôs que, com base na diferenciação das características fenotípicas e na homologia do DNA deveriam ser isolados três géneros dentro da família da *Legionellaceae*: *Legionella*, *Fluoribacter* e *Tatlockia*. No entanto, estudos recentes verificaram através da análise da sequência 16S do RNA ribossomal, que todas as espécies estão cerca de 95% relacionadas entre si, contradizendo assim a divisão da *Legionellaceae* (Khodr *et al.*, 2016).

Atualmente, o género *Legionella* inclui mais de 60 espécies e aproximadamente 70 serogrupos distintos, muitos dos quais considerados patogénicos. Destas espécies e serogrupos a *Legionella pneumophila* serogrupo 1 é a responsável pela maior parte dos casos de infeções (cerca de 95%) detetados (Diegues & Martins, 2013).

A *Legionella* spp. é uma bactéria naturalmente presente em ambientes aquáticos, como lagos, rios, nascentes, zonas de água estagnada e águas subterrâneas, e ambientes artificiais, como redes de abastecimentos/distribuição de água, redes prediais de água quente e água fria, ar condicionados e sistemas de arrefecimento (como as torres de refrigeração, condensadores evaporativos e humidificadores), condições criadas pelo Homem em que a água está estagnada. Surgem ainda em fontes ornamentais e tanques recreativos, como por exemplo jacuzzis (CUF, 2018; Instituto Português da Qualidade, 2018).

Esta bactéria em forma de bacilo, Gram-negativa, é um patógeno intracelular facultativo que pode utilizar células eucarióticas, como protozoários aquáticos, para a sua multiplicação (Sheehan *et al.*, 2005).

1.1.1. Fatores que influenciam o crescimento da bactéria

A sobrevivência e multiplicação das bactérias do género *Legionella* são influenciadas por vários fatores nomeadamente, a temperatura, presença de nutriente, a interação com outros microrganismos e o pH.

A temperatura é um factor muito importante no crescimento desta bactéria. Quando as condições são favoráveis, particularmente a temperaturas entre 20°C e 45°C na presença

de depósitos (ferrugem), multiplica-se rapidamente, atingindo níveis anormais e de risco em sistema de circulação e fornecimento de água, podendo sobreviver a temperaturas entre 20°C e 70°C (CUF, 2018; Sheehan et al., 2005). No caso da *L. pneumophila* multiplica-se a temperaturas entre os 25 e 42°C, com um crescimento ideal a 35°C (Borella et al., 2005). No entanto, a temperaturas acima dos 50°C, a população deste patógeno, quando em cultura pura, rapidamente declina e, a 60°C, é incapaz de sobreviver. Bartram et al. (2007) afirmam que a 70°C esta bactéria é destruída quase instantaneamente, contudo, a temperaturas inferiores a 20°C conseguem sobreviver por algum período de tempo, mas não apresentam crescimento.

Num estudo realizado por Kusnetsov et al. (1996) descobriu-se que o crescimento de todas as estirpes testadas diminuiu quando foram atingidas temperaturas acima de 44-45°C, sendo a temperatura limite de crescimento entre 48,4 e 50°C. As estirpes de *Legionella* spp. estudadas produziram dióxido de carbono até uma temperatura de 51,6°C, sugerindo que as enzimas respiratórias sobrevivem a esta temperatura. Sistemas complexos de água, como água quente, sistemas de ar-condicionado e banheiras de hidromassagem estão numa faixa de temperatura que estimula o crescimento de *Legionella* spp.. Além disso, estes sistemas de água podem potencialmente produzir aerossóis, aumentando a propagação das bactérias (Bartram et al, 2007).

Para prevenir uma infeção provocada pela *Legionella* spp. é recomendável que a temperatura de armazenagem e distribuição de água seja abaixo dos 25°C e, idealmente, abaixo dos 20°C. A *Legionella* spp. consegue sobreviver por longos períodos a baixa temperatura, multiplicando-se quando a temperatura aumenta se as outras condições permitirem (Bartram et al, 2007).

A presença de nutrientes é fundamental para o crescimento destas bactérias, sendo a sua disponibilidade extremamente importante no ciclo de vida das espécies de legionela (Ambrósio, 2017). A elevada disponibilidade de nutrientes permite que as bactérias entrem na fase replicativa, permitindo uma rápida replicação e proliferação (Wood et al., 2015; Ambrósio, 2017). Por exemplo, a *L. pneumophila* tem um ciclo de vida bifásico distinto devido à disponibilidade de nutrientes (Wood et al. 2015), acrescentando que a água, por si só, é insuficiente para que esta bactéria consiga proliferar (Bartram et al, 2007). Foi possível constatar, através de estudos, que a *L. pneumophila* sobreviveu por um longo período de tempo, quando foi utilizada água destilada estéril e água da torneira estéril, mas não houve evidência de multiplicação. Isto permitiu inferir que seriam

necessários outros microrganismos para que a *Legionella* spp. se multiplicasse sendo que, ainda no mesmo estudo, quando foi utilizado água da torneira não estéril, a bactéria não só sobreviveu como se multiplicou. Estes resultados sugerem que o crescimento da *Legionella* spp. requer nutrientes já existentes na água da torneira (Yee & Wadowsky, 1982), sendo os aminoácidos considerados a sua principal exigência nutricional, funcionando como fonte de energia e carbono que permite a sua replicação e crescimento (Ambrósio, 2017).

Na sequência dos estudos anteriores verificou-se que os protozoários são um vetor importante para a sobrevivência e multiplicação das bactérias do género *Legionella*, revelando uma boa capacidade de adaptação ao seu meio intracelular. Num ambiente natural, *L. pneumophila* prolifera em protozoários dentro de fagossomas intracelulares, produzindo proteases com atividade citotóxica e causando, assim, destruição tecidual (Bartram *et al.*, 2007). A absorção pela ameba e a sobrevivência são conhecidas por afetar a temperatura, estado nutricional e disponibilidade de iões de ferro (como ião ferroso (Fe^{2+}) e o ião férrico (Fe^{3+})) do hospedeiro. Num estudo realizado, por Borella *et al.* (2005), verifica-se que a *Legionella* spp., quando cresce dentro da ameba, muda fenotipicamente, aparecendo de forma curta e não filamentosa. Para além das condições favoráveis para a multiplicação intracelular, os protozoários asseguram proteção à *Legionella* spp. de efeitos biocidas, processos de desinfeção térmica, condições adversas à sua sobrevivência e conferem-lhe uma maior resistência ao stresse.

A coevolução com múltiplas espécies de protozoários resultou no desenvolvimento de mecanismos que permitem que a bactéria ocupe uma ampla gama de hospedeiros e, consequentemente, consiga infetar células humanas (Abdel-Nour *et al.*, 2013).

As bactérias deste género *Legionella* são tolerantes a acidez, podem suportar exposição a pH igual a 2 por um período curto de tempo (Bartra *et al.*, 2007). O valor de pH entre 5 e 8,3 é ótimo para a sua proliferação (Sheehan *et al.*, 2005). A existência de um biofilme nas superfícies em contacto com a água, processos de corrosão ou incrustação, utilização de materiais porosos e de derivados de silicone nas redes prediais, potenciam também o crescimento (Novais & Peixe, 2014).

1.1.2. Biofilmes

Os biofilmes consistem em ecossistemas microbianos heterogêneos extremamente complexos, onde os microrganismos estão incorporados numa matriz polimérica extracelular (EPS), que lhe providencia estabilidade, estrutura, nutrientes e proteção (Ambrósio, 2007). A matriz EPS é responsável pela coesão (unir células umas às outras) e adesão (à superfície) do biofilme e é composta essencialmente por polissacarídeos e proteínas (Simões et al., 2010). Os biofilmes podem encontrar-se em todos os meios onde existem bactérias: no ambiente industrial, natural ou clínico. Precisam essencialmente de um ambiente hidratado e uma quantidade mínima de nutrientes para se desenvolverem (Serra, 2003).

A presença de biofilmes é comum na indústria alimentar e afirmam-se como um sério problema a enfrentar, pois funciona como fonte de contaminação permanente, pondo em causa a qualidade e segurança dos produtos e a vida útil dos equipamentos (Faria, 2010). O design do equipamento, a escolha dos materiais das superfícies, a correta utilização e seleção dos detergentes, a formação dos operadores e as boas práticas de fabrico constituem estratégias importantes na prevenção e controlo da formação de biofilmes (Kumar & Anand, 1998; Faria, 2010).

Os biofilmes que se formam nas superfícies ou utensílios e entram em contato com o alimento são os principais responsáveis pela contaminação no produto final. As consequências dessa contaminação, podem levar à rejeição do produto final, perdas económicas ou mesmo doenças causadas por intoxicação alimentar, contraídas a partir da deterioração de alimentos contaminados por exemplo, por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Campylobacter jejuni* e *Bacillus* spp. (Téllez, 2010).

Para além de surgirem problemas associados à saúde pública e à deterioração do produto, os biofilmes são responsáveis por bloqueios mecânicos que prejudicam os processos de transferência de calor e aumentem a taxa de corrosão das superfícies (Kumar & Anand, 1998). Adicionalmente, a formação de biofilmes em redes de distribuição de água na indústria alimentar, ao obstruir os canos, diminui a velocidade e a capacidade de carga, resultando numa maior utilização de energia (Téllez, 2010).

Na indústria dos laticínios e outras indústrias do ramo alimentar, durante a separação do leite, ou a clarificação de sumos de fruta, são utilizados sistemas de ultrafiltração e

osmose inversa. Esses filtros possuem poros muito pequenos que estão continuamente em contato com o alimento. Mesmo que a adsorção microbiana seja mínima pode ocorrer bloqueio dos poros e causar obstrução do filtro. Esta obstrução ocorre devido à formação do biofilme. No final do processo, verifica-se uma redução do fluxo, e conseqüentemente, perda de desempenho e produto (Serra, 2003).

Os biofilmes podem crescer dentro de tubos de qualquer líquido, água potável, óleos, produtos químicos, etc. A presença destes nas torres de refrigeração pode reduzir a transferência e a eficiência do calor, e favorecer a corrosão de superfícies metálicas, problemas que não são tão frequentes na indústria alimentar. Assim, são necessários procedimentos de limpeza eficazes para prevenir os danos perigosos e dispendiosos que os biofilmes bacterianos podem causar (Serra, 2003; Téllez, 2010).

No ambiente aquático os biofilme aparecem e acumulam-se em todas as superfícies submersas, naturais ou artificiais. Microrganismos, como a *L. pneumophila*, formam biofilmes como forma de resistir a condições adversas, como temperaturas extremas ou a escassez de nutrientes (Bartram et al., 2007; Abdel-Nour et al., 2013).

Em sistemas aquáticos artificiais, as células de *Legionella* spp. ao associarem-se a biofilmes conseguem sobreviver, pois a matriz que compõe um biofilme, como referido anteriormente, é capaz de fornecer proteção e um gradiente específico de determinados nutrientes (Fields et al., 2002; Bartram et al., 2007; Cunha, 2013). A disponibilidade destes nutrientes complexos nos biofilmes, levou investigadores a postular teorias acerca da possibilidade dos biofilmes suportarem a sobrevivência e a replicação da *Legionella* spp. fora da célula hospedeira. Este conceito é plausível, visto que a maioria das bactérias intracelulares facultativas é capaz de se multiplicar extracelularmente, em ambientes específicos (Fields et al., 2002; Quirino, 2011). A interação de biofilmes de espécie múltipla, com outros microrganismos (como protozoários), são um dos fatores mais influentes para a colonização e persistência no meio ambiente. Por conseguinte, o facto dos protozoários estarem presentes em fontes de água tem sido considerado um factor de risco para surtos de *L. pneumophila*. De facto, existe relação direta entre a quantidade de *L. pneumophila* e a presença de protozoários nos biofilmes (Abdel-Nour et al., 2013).

Adicionalmente, esta bactéria é também capaz de crescer através da matéria orgânica que está em decomposição por outros microrganismos, replicando-se indiretamente (Abdel-Nour et al., 2013; Declerck, 2010).

Como referem Bartram et al. (2007), são vários os fatores que aumentam a probabilidade de ocorrência de biofilmes, dos quais se destacam: i) a presença de nutrientes; ii) o desgaste e corrosão; iii) a temperatura da água; iv) a água estagnada ou fraco fluxo de água nos entroncamentos dos canos dos sistemas e nos tanques de armazenagem.

Ainda a este propósito, Bartram et al. (2007) referem que os materiais utilizados na montagem dos sistemas também podem aumentar o risco de crescimentos dos biofilmes, podendo mesmo beneficiar a proliferação de microrganismos. Substâncias naturais, como juntas de borrachas, podem fornecer substratos ricos em nutrientes adequados para a proliferação de microrganismos. Os microrganismos conseguem inclusive crescer nas superfícies de sistemas revestidos com cobre, que têm uma resistência inerente à colonização, se a superfície tiver sido sujeita a corrosão.

1.2. Infecções e sintomas provocados nos seres humanos

A espécie *L. pneumophila* é a mais frequentemente associada à infeção no homem e dela conhecem-se quinze serogrupos, sendo o serogrupo 1 o mais frequente, seguindo-se-lhe o serogrupo 6. Das outras espécies, também aparecem com alguma frequência a *L. bozemanii* e a *L. longbeachae* (Marques et al., 2003).

A infeção por *Legionella* spp. pode apresentar-se como uma infeção subclínica, como infeção multissistémica com quadro predominante de pneumonia (Doença dos Legionários), a qual frequentemente justifica internamento hospitalar, ou ainda como uma forma respiratória não pneumónica, autolimitada e que se assemelha a uma síndrome gripal e que se denomina Febre de Pontiac (Marques et al., 2003). A Doença dos Legionários consiste numa pneumonia bacteriana potencialmente fatal e, visto que pertence ao grupo de pneumonias atípicas e abarca um largo espectro de manifestações clínicas, é necessária confirmação de diagnóstico por métodos laboratoriais. A Febre de Pontiac consiste numa doença gripal ligeira, sem o desenvolvimento de pneumonia (Khodr et al., 2016).

A Tabela 1 lista os sintomas mais comuns da Doença dos Legionários e da febre de Pontiac.

Tabela 1 - Principais características da Doença dos Legionários e Febre Pontiac.

(adaptado de Bartram et al. (2007)).

CARACTERÍSTICAS	DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS	FEBRE DE PONTIAC
Período de incubação	2 a 10 dias (podendo atingir 3 semanas)	5 horas a 3 dias (mais frequente 24 a 48 horas)
Duração	Várias semanas	2 a 5 dias
Taxa de fatalidade	Provoca mortalidade, dependendo da suscetibilidade: de 5–30% Em pacientes hospitalizados pode atingir 40–80%	Normalmente não provoca mortalidades
Taxa de incidência	Na população em geral: 0,1–5% Nos hospitais: 0,4–14%	Superior a 95%
Sintomas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Febre alta ▪ Dor de cabeça ▪ Tosse seca não produtiva ▪ Às vezes expectoração sangue-listrada ▪ Arrepios ▪ Dor muscular ▪ Dificuldade em respirar, dor no peito ▪ Diarreia (25–50% dos casos) ▪ Vômito, náusea (10–30% de casos) ▪ Manifestações do sistema nervoso central, tais como confusão e delírio (50% dos casos) ▪ Insuficiência renal 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gripe (sem pneumonia) ▪ Perda de força (astenia), cansaço ▪ Febre alta e calafrios ▪ Dor muscular (mialgia) ▪ Dor de cabeça ▪ Dor nas articulações (artralgia) ▪ Diarreia ▪ Náusea, vômito (em pequena proporção de pessoas) ▪ Respiração difícil (dispneia) e tosse seca
Tratamento	Utilização de antibióticos	Nenhum tratamento específico

A infecção transmite-se por inalação de aerossóis de água de gotículas de vapor de água contaminada por *Legionella* spp. (Instituto Português da Qualidade, 2018), isto é, quando as pessoas respiram uma névoa ou vapor (pequenas gotículas de água no ar), que contém a bactéria (Marques et al., 2003), possibilitando a sua deposição nos alvéolos pulmonares. Se as gotículas contaminadas por *Legionella* spp. forem de tamanho suficientemente pequeno (<5,0 µm), elas podem alcançar os alvéolos. Assim que a bactéria entra nos alvéolos, será ingerida por macrófagos pulmonares. No entanto, se a legionela não for destruída (digerida) por fagocitose, irá crescer dentro dos macrófagos (de uma maneira semelhante ao crescimento da *Legionella* spp. dentro da ameba e dos protozoários) (Association of Water Technologies (AWT), 2019). As pessoas também podem contrair a doença ao respirar gotículas pulverizadas por um sistema de água (como dispositivos de arrefecimento, tanques de água quente, sistemas de encanamento ou chafarizes), que não tenham sido limpos ou desinfetados adequadamente (Marques et al., 2003). Sendo a

temperatura do corpo humano, favorável para o crescimento, a *Legionella* spp. irá multiplicar-se e eventualmente causar lise celular (ruptura) das células do macrófago. Isto, sobrecarregará o sistema imunológico do hospedeiro e ocorrerá doença. Não são conhecidos casos de propagação da doença de pessoa, para pessoa, nem através da ingestão de água contaminada (AWT, 2019).

1.2.1. Ocorrência de surtos de doença causados pela *Legionella* spp.

O primeiro surto associado a esta bactéria foi identificado em 1976, durante uma convenção da *American Legion*, num hotel em Filadélfia. Em 1977, foi possível o isolamento da bactéria. A doença ficou conhecida por Doença dos Legionários ou legionelose e a bactéria denominou-se como *Legionella*. Foi diagnosticada a 300 pacientes e a taxa de mortalidade atingiu 50% (CUF, 2018; Quirino, 2011).

Apesar de não ser possível avaliar com precisão a incidência da Doença dos Legionários desencadeada por *Legionella* spp. a um nível global, visto que, existem várias diferenças nas técnicas de diagnóstico e de investigação utilizadas em cada país, verifica-se a existência de um aumento extremamente significativo nos valores de incidência recolhidos durante a última década, em vários países Europeus e nos Estados Unidos da América, onde a Doença dos Legionários possui um processo de notificação obrigatória (Quirino, 2011). A Figura 1 indica alguns surtos de legionela de grandes dimensões ocorridos desde o ano de 1976 até ao ano de 2017.

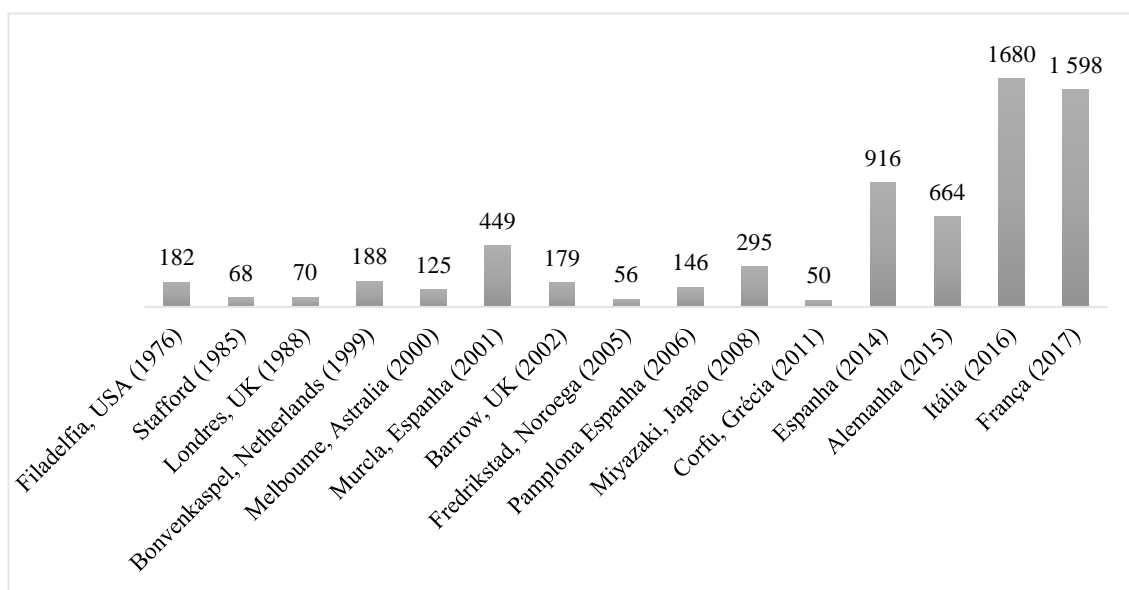


Figura 1 - Surtos de *Legionella* de grandes dimensões ocorridos desde o 1976 – 2017.

(adaptado de Ambrósio, 2017; Relatório anual “Legionnaires’ disease” dos respetivos anos)

Em Portugal a Doença dos Legionários foi descrita pela primeira vez em 1979 e está incluída na lista de doenças transmissíveis de declaração obrigatória desde 1999 (Portaria n.º 1071/98, de 31 de Dezembro), não se conhecendo com rigor os números respeitantes à sua incidência em cada ano, mas havendo convicção de que esta patologia é subdiagnosticada (Marques et al., 2003). Contudo, desde essa altura até fins de 2015, foram notificados 1679 casos, predominantemente associados a alojamentos em unidades hoteleiras. No ano de 2014, quando ocorreu o surto de Vila Franca de Xira, foram notificados 532 casos, ou seja, cerca de 32% de todos os casos reportados entre 2000 e 2015 (Instituto Português da Qualidade, 2018). Este foi o segundo maior surto de Doença dos Legionários registado até à data, evidenciando o impacto das condições climáticas e fenótipos bacterianos em torre de resfriamento (George et al., 2016).

Nos últimos anos têm sido notificados, em média, cerca de 190-200 casos por ano (Instituto Português da Qualidade, 2018). Em abril de 2004, a Direção-Geral da Saúde (DGS) criou o Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários, com o objetivo de reforçar a vigilância epidemiológica integrada, que prevê a notificação clínica dos casos às autoridades de saúde e a notificação laboratorial ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, associando a componente clínica, laboratorial e epidemiológica (Direção-Geral da Saúde, s.d).

Na Figura 2 está representado graficamente o número de casos notificadas de Doença dos Legionários em Portugal entre 1999-2017.

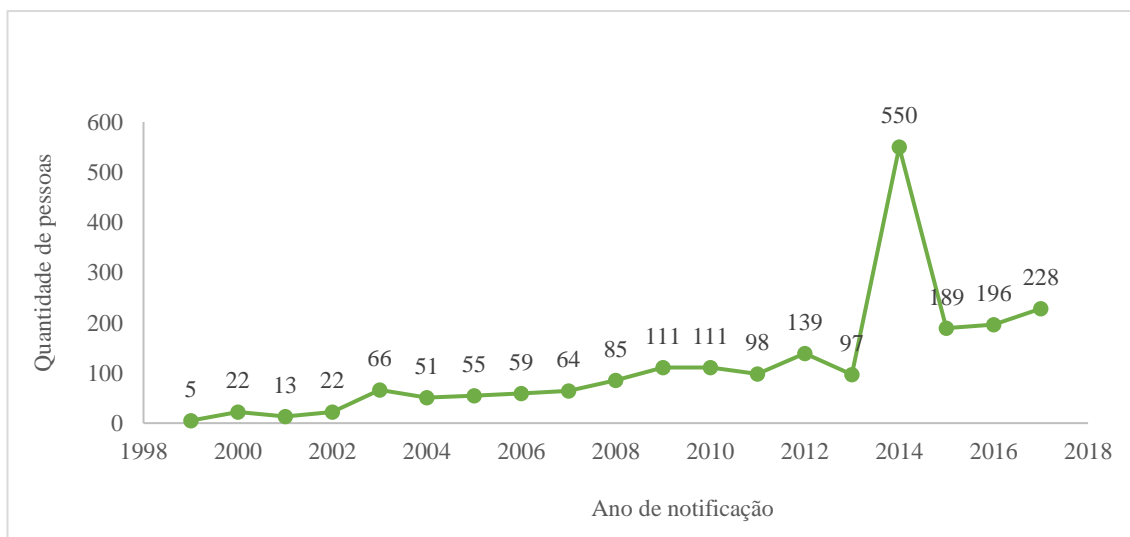


Figura 2 - Número de casos notificados de Doença dos Legionários, por ano de notificação, Portugal 1999-2017

Fonte: Gaspar, C., Augusto, G., Albuquerque, M., Nascimento, M., Vicêncio, P., & Nogueira, P. (2017). Doenças de Declaração Obrigatória 2013-2016, Volume II-Regiões; European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019).

De acordo com informações veiculadas pela CUF (2018), os surtos de legionelose adquiridos em comunidade eram esporádicos, e não transmissíveis de pessoa para pessoa. Contudo, no caso ocorrido em 2014, em Portugal, sugere-se que a infeção bacteriana, muitas vezes mortal, pode, em casos caros, passar de pessoa para pessoa (Correia et al., 2016). Apesar deste estudo averiguar uma nova abordagem sobre uma potencial preocupação de transmissão de pessoa, para pessoa, da Doença dos Legionários, é importante perceber que o principal modo de transmissão continua a ser via inalação de aerossóis infetados nas torres de refrigeração, ar condicionado e unidades de ventilação (Glatter, 2016 citado por Health Day, 2016).

1.3. Medidas de prevenção e controlo

Como referido anteriormente, o género *Legionella* é frequentemente encontrado em ambientes naturais e ambientes artificiais, condições criadas pelo Homem em que a água está estagnada, resultando num risco de contaminação individual e, podendo causar surtos da doença (CUF, 2018; Instituto Português da Qualidade, 2018).

A adequação de medidas de controlo capazes de prevenir o desenvolvimento microbiológico é fundamental, particularmente no que respeita a alguns parâmetros como a deteção de *Legionella* spp.. Deste modo, é importante que seja realizada uma avaliação de riscos e posteriormente um plano de controlo/prevenção que garanta um controlo eficaz, juntamente com as medidas corretivas necessárias em todas as partes do sistema ou equipamento, e que englobe ainda um plano de limpeza e desinfeção de todas as instalações (EDPC, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2018).

Considera-se como princípio estratégico fundamental, evitar a criação de condições e factores que propiciem o crescimento de bactérias do género *Legionella* (EDPC, 2017), pois uma vez que a água já esteja contaminada o processo de tratamento é muito mais difícil.

Segundo a EDPC (2017) e o Instituto Português da Qualidade (2018) para serem eficazes as ações preventivas devem ser exercidas desde a conceção das instalações até à sua operação e manutenção. Recomendam-se, de um modo geral, as seguintes práticas:

- Uso de tratamentos adequados para o tratamento da água;
- Assegurar um bom fluxo de água, evitando a estagnação da água, ou de armazenamento prolongado, nos diferentes sistemas;

- Impedir os processos de corrosão e incrustação através da implementação de mecanismos de combate a estes fenómenos;
- Controlar e monitorizar regularmente a qualidade da água do processo, quanto ao residual de biocida, ao pH, à dureza, à alcalinidade;
- Manter o sistema limpo para evitar o acumulado de sedimentos que possam abrigar bactérias.

As medidas de controlo utilizadas para impedir a proliferação da bactérias podem variar consoante as concentrações detetadas nos sistemas e equipamentos, podendo mesmo ter que ocorrer alterações às medidas previamente estabelecidas, sendo necessário recorrer a técnicas de desinfeção e tratamentos de choque (Ambrósio, 2017).

Com intuito de eliminar/reduzir o risco de legionelose é necessário minimizar as concentrações de *Legionella* spp. nos sistemas afetados e evitar a transmissão da bactéria existente nos sistemas, para indivíduos suscetíveis. Para tal, propõem-se por exemplo sistemas de Análises de Perigos e Controlo de Pontos Crítico (HACCP), utilizados principalmente em indústrias alimentares, como uma medida de controlo da qualidade (Springston & Yocavitch, 2017).

Atualmente, existe uma grande variedade de técnicas utilizadas para controlar a proliferação de *Legionella* spp.. Os métodos convencionas de desinfeção da água, que englobam a desinfeção térmica, uso de ionização com cobre e prata, irradiação com ultravioleta e adição de cloro, têm sido amplamente investigados. Contudo, como cada método de desinfeção apresenta vantagens e desvantagens, ainda não foi identificado um método ótimo (Püle, 2016).

- **Desinfeção térmica**

Este método consiste no aumento de temperatura da água presente no equipamento de armazenamento do sistema de água potencialmente contaminado com *Legionella* spp.. A água deverá atingir temperaturas entre os 70°C e os 80°C, devendo-se garantir este valor nos pontos mais críticos do sistema, para que ocorra a eliminação das bactérias presentes (ECDC, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2018).

Estudos indicam que para eliminar a *Legionella* spp. a temperaturas próximas dos 60 °C o tratamento deve demorar aproximadamente 25 minutos. Já a temperaturas superiores a 70 °C, o tratamento deve ocorrer durante 10 minutos (ECDC, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2018).

Uma das principais vantagens da desinfecção térmica é não requer um equipamento específico para que o tratamento seja realizado rapidamente, desde que haja capacidade de mandar o calor suficiente no sistema. Sendo notável em situações de surto, quando a legionela deve ser erradicada do sistema de distribuição de água imediatamente. Em contrapartida, apresenta-se como um procedimento demorado e envolve muito pessoal para controlo e monitoração de diversos locais, temperaturas em todo o sistema e tempos de descarga (Püle, 2016), ainda o consumo de água e de energia é elevado, comprometendo os objetivos de eficiência energética dos edifícios (Instituto Português da Qualidade, 2018).

Quando não for possível estabelecer as temperaturas recomendadas nos vários processos de desinfecção térmica, uma vez que o sistema não consegue manter de uma forma constante as temperaturas afetando a eficácia do tratamento, deve recorrer-se à desinfecção química (Püle, 2016; Instituto Português da Qualidade, 2018).

- **Adição de Cloro**

A adição de cloro é frequentemente usada para controlar a *Legionella* spp. quando a desinfecção térmica não é uma opção viável (Springston & Yocavitch, 2017). Este método reduz e controla o crescimento da bactéria nos sistemas de água, contudo as concentrações residuais de cloro devem ser contínuas para que afete as atividades respiratórias e os ácidos nucleicos das bactérias, levando à sua inativação, e assim manter sistema controlado (Püle, 2016; Springston & Yocavitch, 2017).

É fundamental monitorizar regularmente os teores de cloro residual livre, devendo o valor de pH da água ser preferencialmente inferior a 8 e a temperatura inferior a 30°C, caso contrário a eficácia diminui, sendo necessário alterar as dosagens (Instituto Português da Qualidade, 2018). Os níveis residuais de cloro podem variar dependendo da qualidade da água, do caudal envolvido e da quantidade de biofilme no sistema (ECDC, 2017).

Nos sistemas de distribuição de água potável os valores recomendados deverão estar compreendidos entre 0,2 e 0,4 mg/L, nos circuitos de água das torres de refrigeração entre 0,5 e 1 mg/L, e nos sistemas de água climatizada deverá estar entre os 0,8 e os 2 mg/L (Instituto Português da Qualidade, 2018).

Uma das principais vantagens da adição de cloro é a sua elevada eficácia nas zonas de caudal elevado, deixa um residual de desinfetante na água que perdura ao longo do tempo, tratamento económico e de fácil instalação (Instituto Português da Qualidade, 2018). No

entanto, existem vários problemas com a adição de cloro nos sistemas de água, como em níveis elevados pode resultar em sabores e odores desagradáveis, além de irritar a pele, os olhos e as mucosas. O cloro é muito corrosivo e reduzirá a vida útil das tubagens. Além disso, as reações entre a escala de corrosão do cloro e do ferro podem resultar em perdas significativa cloro livre no sistema de distribuição (Springston & Yocavitch, 2017).

- **Adição de Dióxido de cloro (ClO₂)**

O dióxido de cloro (ClO₂) é considerado uma alternativa à desinfecção por cloro, quer no tratamento de água para consumo humano, quer no tratamento da água para processos industriais, tendo em conta que além do poder de desinfecção elevado não potencia os fenómenos de corrosão dos materiais das redes desde que nas concentrações adequadas (0,2 a 0,4 mg/L) (Instituto Português da Qualidade, 2018).

Contudo é muito instável não conseguindo apresentar um nível residual regular e constante. Apresenta uma resistência a valores de pH mais elevados do que a apresentada pelo cloro, e é muito eficaz a invadir e dispersar os biofilmes presentes (ECDC, 2017).

- **Ionização cobre/prata**

Segundo o Instituto Português da Qualidade (2018), a carga positiva dos iões de cobre (Cu⁺ e Cu²⁺) e da prata (Ag⁺), formam uma ligação eletrostática com a carga parcialmente negativa das membranas celulares, afetando os processos de difusão através das membranas e desta forma proporcionando o colapso da bactéria. A concentração de iões presentes na água irá depender da intensidade da corrente aplicada nos elétrodos (ECDC, 2017).

A eficácia desta técnica não é afetada pela temperatura elevada da água, ou seja, pode ser utilizado em sistemas de água quente. Contudo, quando os valores de pH são superiores a 8, a sua eficácia é mais reduzida devido à precipitação dos iões de cobre (Ambrósio, 2017).

- **Recurso ao Ozono (O₃)**

A utilização de tratamento com recurso ao ozono, é outro método que tem sido usado para o controlo da legionela na construção de sistema de água (Springston & Yocavitch, 2017), pois é um oxidante extremamente ativo e eficaz para eliminação da legionela (Instituto Português da Qualidade, 2018). Este oxidante inativa a bactéria através da produção de

radicais livres de hidroxilo e superóxido afetando a permeabilidade, a atividade enzimática e o DNA das células bacterianas (Püle, 2016).

Embora o ozono seja um oxidante muito mais poderoso que o cloro, não é eficiente o suficiente para controlar as bactérias legionelas em sistemas aquáticos quando utilizado sozinho, pois tem um período de vida curto e decompõe-se de novo em oxigênio, sendo necessário um segundo desinfetante para manter o valor residual na água (Püle, 2016; Instituto Português da Qualidade, 2018).

Recomenda-se que no ponto de injeção se atinjam concentrações de ozono de 1 a 2 mg/L, produzindo uma redução da presença de legionela de 5 Log (Springston & Yocavitch, 2017).

- **Desinfecção por Luz Ultravioleta (UV)**

A irradiação com luz ultravioleta (UV) é um método alternativo para a desinfecção da água (ECDC, 2017). O sistema de tratamento por UV, preventivo, consiste na transferência de energia eletromagnética de uma lâmpada de arco de mercúrio, afetando o material genético dos organismos. Assim, quando a radiação UV penetra na estrutura da célula, através da membrana celular, destrói a estrutura de DNA e a capacidade de multiplicação da célula (Instituto Português da Qualidade, 2018).

O comprimento de onda que conduz a uma eliminação mais eficaz dos microrganismos, encontra-se no intervalo entre 250 a 270 nm, (Instituto Português da Qualidade, 2018).

O equipamento UV é relativamente fácil de instalar e não tem efeitos adversos no sabor ou na potabilidade da água e não danifica as tubagens (ECDC, 2017). No entanto, é fundamental que este sistema tenha uma manutenção contínua de forma a evitar os fenómenos de incrustação na estrutura que, conseqüentemente, afetam todo o sistema de tratamento. Além disso, a luz UV não fornece nenhum tipo de proteção residual e não tem efeito sobre *Legionella* spp. ou biofilmes que possam estabelecer-se em locais dentro do sistema de distribuição de água (Springston & Yocavitch, 2017), e portanto, os efeitos deste método por si só são insuficientes, não garantindo uma proteção em todo o sistema (Instituto Português da Qualidade, 2018).

Para tal, a sua utilização deve ser combinada com outros métodos de desinfecção térmica e adição de cloro periódica para controlar a legionela presente no sistema (Püle, 2016).

1.4. Enquadramento legal

Em 1986 foi criado pela Comunidade Europeia o EWGLI - *European Working Group for Legionella Infections*, ao qual Portugal pertence desde o início e que tem como objetivo assegurar a vigilância e prevenção da Doença dos Legionários na Europa. O EWGLI representa um centro de informação e controlo epidemiológico, o qual congrega também o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico, manutenção e tratamento, em articulação com outros organismos internacionais (Mansilha et al., 2007). A partir de 2010 o EWGLI passou todas as competências para o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) (Instituto Português da Qualidade, 2018).

Em Portugal, a análise de *Legionella* spp. é referenciada, no âmbito da qualidade da água, na Portaria n.º 1220/2000 dos Ministérios da Economia e da Saúde, de 29 de dezembro, que define as regras relativas às condições a que as águas minerais naturais e as águas de nascente, na captação, devem obedecer para poderem ser consideradas bacteriologicamente próprias. Segundo a referida Portaria, para poder ser considerada bacteriologicamente própria a água deverá estar isenta de *L. pneumophila* em 1 litro de amostra analisada e o valor de referência para o número total de *Legionella* não *L. pneumophila* é de 100 UFC/L (unidades formadoras de colónias por litro).

Devido às preocupações associadas aos efeitos da qualidade do ar, foi implementada em 2006 a política de qualidade do ar interior, que surgiu na sequência da transposição para o direito interno da Diretiva n.º 2002/91/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2002, relativa ao desempenho energético dos edifícios, com a publicação do Decreto-Lei n.º 78/2006, de 4 de abril, que aprovou o Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios (SCE), do Decreto-Lei n.º 79/2006, de 4 de abril, que aprovou o Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios (RSECE), e do Decreto-Lei n.º 80/2006, de 4 de abril, que aprovou o Regulamento das Características de Comportamento Térmico dos Edifícios (RCCTE) (Agência Portuguesa do Ambiente, s.d)

Complementando, apesar de em Portugal existam normas reguladoras da qualidade do ar, no entanto, nenhuma é específico para áreas de manipulação de alimentos, mas o Decreto-Lei n.º 79/2006, sobre climatização e qualidade do ar interior refere, no artigo 29.º respeitante a Requisitos de Qualidade do Ar, no ponto 9, que em “*edifícios com sistemas de climatização em que haja produção de aerossóis, nomeadamente onde haja torres de arrefecimento ou humidificadores por água líquida, ou com sistemas de água quente para*

chuveiros onde a temperatura de armazenamento seja inferior a 60°C, as auditorias incluem também a pesquisa 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”.

Neste contexto, surge o Decreto-Lei n.º 118/2013, de 20 de agosto, que veio substituir os anteriores diplomas legais, transpondo a referida diretiva n.º 2010/31/EU, e integra o Regulamento de Desempenho Energético de Edifícios de Habitação (REH) e o Regulamento de Desempenho Energético dos Edifícios de Comércio e Serviços (RECS) (Instituto Português da Qualidade, 2018). Posteriormente, foi publicada a Portaria n.º 353- zA/2013 de 4 de dezembro, a qual estabelece os valores mínimos de caudal de ar novo por espaço, bem como os limiares de proteção e as condições de referência para os poluentes do ar interior dos edifícios de comércio e serviços e, onde indica os valores de concentração de referência de *Legionella* spp. sendo também expressos em UFC/L. Na referida Portaria a concentração da bactérias deve ser inferiores a 100 UFC/L, com exceção da pesquisa em tanques de torres de refrigeração em que os valores de concentração devem ser inferiores a 1000 UFC/L. Verificar ainda que a espécie *L. pneumophila* não deverá estar presente.

Ainda, nos termos da alínea a) do n.º 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar n.º 14/2012, de 26 de janeiro, foi emitida a Orientação n.º 020/2017 de 15/11/2017 que informa que o procedimento analítico recomendado para a pesquisa e *Legionella* spp. em amostras pode ser através:

- a) Análise por PCR em Tempo Teal para *L. pneumophila* e *Legionella* spp. por método acreditado pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC), segundo a Norma ISO /TS 12869:2012 - *Water quality -- Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)*. Este método permite a pesquisa quantitativa, sendo os resultados expressos em volume de amostra filtrado (unidades genómicas (UG) por volume amostra filtrado).
- b) Método Cultural, em meio de cultura específico, método acreditado pelo IPAC segundo a Norma ISO 11731:2017 *Water quality – Enumeration of Legionella*. Este método permite a deteção e a quantificação de *Legionella* (células viáveis e

cultiváveis) em amostras de água bem como a identificação do serogrupo de *L. pneumophila* e de algumas espécies de *Legionella* spp. não pneumophila.

Mais recentemente, foi criada a Lei nº 52/2018 de 20 de agosto, que estabelece o regime de prevenção e controlo da Doença dos Legionários e procede à quinta alteração ao Decreto-Lei nº 118/2013 de 20 de agosto. Através desta, poderá considerar-se que o trabalhador está ou pode estar exposto a legionela no local de trabalho quando labora com equipamentos de transferência de calor associados a sistemas de aquecimento, ventilação e ar condicionado ou a unidades de tratamento do ar, desde que possam gerar aerossóis de água. Visando a proteção dos trabalhadores a este agente biológico prevê a elaboração de um plano de prevenção e controlo de legionela. Este deve ser feito com base numa análise de risco, em que são identificados os pontos críticos de proliferação de legionela, deve estabelecer programas de manutenção, limpeza, desinfeção, monitorização, tratamento contendo os registos, frequência de amostragem e resultados obtidos nas análises efetuadas.

Através da Lei n.º 102/2009, de 10 de setembro, estabelece o regime jurídico da promoção da segurança e saúde no trabalho, alterada e republicada pela Lei n.º 3/2014 de 28 de janeiro, esclarece que o serviço de segurança e saúde de uma organização tem por objetivo garantir que são disponibilizadas as devidas condições de segurança e saúde aos seus trabalhadores, e tomar as devidas precauções. Neste aspeto, no artigo 15.º da referida lei o empregador está obrigado a assegurar que os níveis de exposição aos agentes químicos, físicos e biológicos e aos fatores psicossociais nos locais de trabalho não constituem risco para a segurança e saúde do trabalho. Os agentes biológicos estão presentes em diversos sectores. Muitas atividades profissionais favorecem o contacto com os agentes biológicos. A agricultura, indústria e comércio alimentar, indústria farmacêutica, trabalho em hospitais, limpeza pública, laboratórios, são exemplos de casos que podem favorecer riscos profissionais associados a agentes biológicos (Rodrigues, 2006).

A preocupação com as condições de trabalho e com a saúde dos trabalhadores obriga as organizações a adotar medidas que visem proteger o trabalhador a nível de segurança e saúde no trabalho. No caso de exposição à bactéria legionela, estão em risco todas as instalações e processos tecnológicos que utilizam água na produção ou no local de trabalho, possibilitando criação de meios e transmissão gotículas de água (aerossóis) que serão inaladas, causando um risco razoavelmente previsível de exposição (Health and Safety Executive, 2013).

A redução do risco de contaminação pode ser efetuada através do controlo e monitorização da qualidade de água, desta forma a probabilidade de crescimento e propagação das bactérias diminui, reduzindo a probabilidade de contaminação da água. A amostragem e análise para deteção e quantificação da *Legionella* spp. é uma ferramenta importante para verificar se o sistema está sob controlo.

1.5. Métodos laboratoriais para pesquisa e identificação de *Legionella* spp. em amostras ambientais

Os sintomas clínicos da infeção por *Legionella* spp. são indistinguíveis dos sintomas provocados por outras causas de pneumonia. De modo a controlar a presença de *Legionella* spp. nos sistemas de água, avaliar a eficácia dos processos de tratamento, bem como contribuir para a investigação epidemiológica, é necessário efetuar colheitas de amostras representativas da água e/ou de biofilme existente nos diferentes locais, as quais devem permitir a realização das respetivas análises (ECDC, s.d).

Dada a crescente incidência de legionelose em todo o mundo, é importante ter acesso a vários métodos precisos para detetar e identificar a *Legionella* spp.. Os métodos microbiológicos efetuados para realizar da análise dependem de vários elementos, incluindo o grau de urgência de análise, o tipo de instalação e quantidade de dados desejado ou necessário (Hulboy, 2016). Para detetar e identificar bactéria legionela em amostras de água, podem ser aplicadas método como: o PCR em Tempo Real, Método Cultural, Legiolert e Legipid (Pizarro, 2018).

1.5.1. Biologia Molecular (Real -Time PCR)

A técnica de PCR (Reação de Polimerase em cadeia), em tempo real (RT-PCR) é uma nova abordagem da técnica de PCR que permite controlar o progresso de amplificação, enquanto ocorre em tempo real. Esta técnica rege-se segundo a Norma ISO/TS 12869:2012, *Water quality -- Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction* (qPCR).

Durante a amplificação o número de produtos de PCR aumenta, aumentado assim o sinal de fluorescência. Existem três distintas em todas as curvas de amplificação que definem o processo de qPCR: Fase exponencial, linear e Plateau. Idealmente, durante a fase

exponencial, os produtos de PCR irão duplicar em cada ciclo, se a eficiência for perfeita, ou seja, 100%.

Em cada corrida e através de um *software* específico deverá determinar-se graficamente o *threshold cycle* (C_T) (Figura 3). C_T é um valor ajustável (gerado automaticamente pelo *software* do equipamento) que deverá situar-se acima do ruído de fundo e significativamente abaixo da fase de *plateau* da curva de amplificação. Por outras falavas, C_T representa o limiar que separa a amplificação positiva do ruído de fundo para que a fluorescência da reação seja detetável (Heid et al., 1996). Os valores de C_T são inversamente proporcionais à quantidade de DNA inicial de uma amostra, assim, quanto menor o valor de C_T for, maior será a quantidade de DNA detetada. As fases de amplificação deteção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real, minimizando o erro potencial (Heid et al., 1996; Oliveira, 2010).

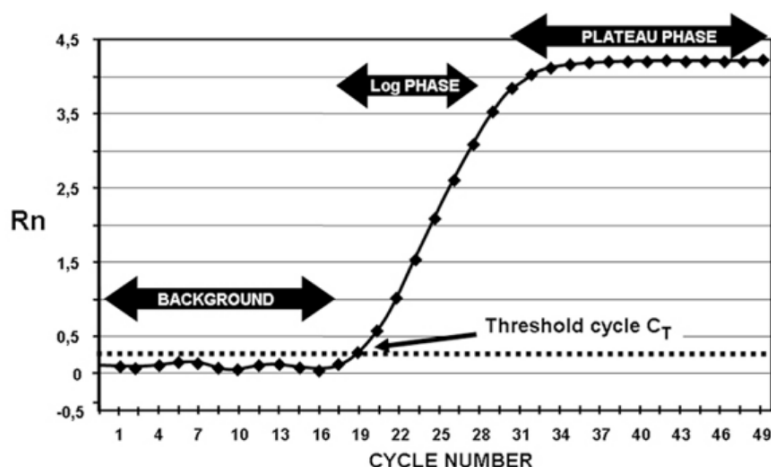


Figura 3 - Intensidade de fluorescência versus o número de ciclos de PCR.

Fonte: Prada-Arismendy, J., & Castellanos, J. E. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. Colombia Médica, 42(2), 243-258. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342011000200016

As vantagens da utilização do RT-PCR, para fins de quantificação, são inúmeras face a outras metodologias. Para além de ter simplificado e acelerado os procedimentos laboratoriais de PCR, aumentou a informação obtida das amostras, incluindo quantificação e diferenciação de rotina dos produtos de amplificação (Ma et al., 2006). O facto deste método permitir uma deteção rápida de *Legionella* spp. (inferior a 24 horas), ao quantificar DNA bacteriano presente na amostra, pode ser útil nas investigações de potenciais fontes de infeção, permitindo rapidamente efetuar ações corretivas (EDPC, 2017). É um método de fácil utilização/execução, com valores de sensibilidade elevados,

maior especificidade, reduz o risco de contaminação cruzada (Dorak, 2007), e permite detetar, de forma fiável, pequenas diferenças de expressão entre amostras (Carneiro, 2014).

A técnica de RT-PCR possui algumas desvantagens. Uma delas é o facto de poderem resultar falsos-positivos e falsos-negativos. Os falsos-positivos podem ser resultantes de produtos amplificados em reações anteriores e que contaminam reagentes, tubos, bancadas e pipetas, sendo por este motivo importante uma desinfeção prévia dos utensílios e equipamentos, que estarão em contato com os reagentes amostras a analisar. Relativamente aos falsos-negativos, estes podem ocorrer caso o DNA não tenha sido extraído corretamente, inibindo assim a amplificação. Para tal, a extração do DNA, purificação e remoção de inibidores deve ser realizado de forma correta (Benites, 2016). Importa também salientar que o custo inicial do equipamento e reagentes necessários para a amplificação é elevado. Para além disso, dada a elevada sensibilidade da técnica, torna-se imperativo a necessidade de técnicos qualificados para um correto delineamento experimental e conhecimento sobre técnicas de normalização, para que as conclusões sejam corretamente extrapoladas (Pizarro & Rodrigues, 2013). A expressão dos resultados obtidos pelo método de RT PCR é um constrangimento face aos valores legislados. Por RT PCR a expressão de resultados é feita em UG/L (unidades Genómicas/L), dificultando assim a interpretação dos resultados obtidos e a verificação do cumprimento legal que impõe valores em UFC/L. (EDPC, 2017).

1.5.2. Método Cultural

O isolamento em cultura de *Legionella* spp. é considerado o “*gold standard*” (padrão de referência) para o diagnóstico de legionelose em termos de definição, sendo ainda, uma técnica que apresenta maior especificidade para o diagnóstico (Fields et al., 2002).

A Norma ISO 11731:2017 “*Water quality – Enumeration of Legionella*” substitui a ISO 11731:1998 e ISO 11731-2:2004 e descreve o Método Cultural de deteção de *Legionella* spp. em amostras ambientais.

No que se refere ao crescimento *in vitro* estas bactérias não apresentam crescimento nos meios de cultura habitualmente utilizados em laboratório, para tal, o diagnóstico através desta metodologia requer a utilização de um meio de cultura específico, conhecimentos técnicos especializados para a identificação de colónias e um adequado processamento das amostras (Carneiro, 2014). O meio de cultura mais utilizado pela metodologia descrita

nesta Norma para a cultura de microrganismo do género *Legionella* é o agar “*Buffered Charcoal Yeast Extract*” (BCYE) enriquecido com α -cetogluturato, sais de ferro e L-cisteína (ISO 11731:2017; Fields et al., 2002) (Figura 4).

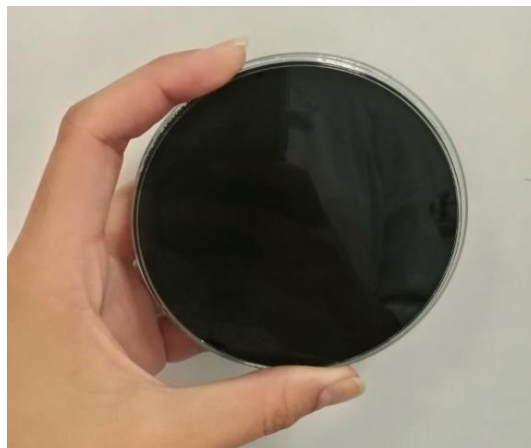


Figura 4 – Placa de Petri com Meio de cultura seletivo BCYE.

Este método possui vantagens tais como, permitir isolar e quantificar as diferentes espécies e estirpes de legionela, possibilitando uma comparação de estirpes clínicas com estirpes ambientais e, como referido, apresenta uma sensibilidade próxima de 60% e a especificidade de 100% (Ferreira, 2019).

Contudo, o Método Cultural possui algumas limitações que podem interferir com os resultados obtidos, incluindo a presença de células viáveis não cultiváveis, perda de viabilidade de bactérias após a colheita, períodos prolongados de incubação de 7 a 10 dias (Gruas et al., 2013), e ainda o facto de se caracterizar por ser um método complexo e exigente em tempo, meios de cultura, reagentes e experiência técnica (Ferreira, 2019).

1.5.3. Legiolert™

Legiolert™ é um método de cultura alternativo, desenvolvido pela IDEXX Laboratories que deteta apenas *Legionella pneumophila* em amostras de água. Esse ensaio baseia-se na tecnologia de deteção de enzimas bacterianas que sinalizam a presença da *L. pneumophila* através da utilização de um substrato presente no reagente do Legiolert™. As células bactéria crescem rapidamente e reproduzem-se através de suplementos ricos em aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes (IDEXX, s.d).

Quando *L. pneumophila* está presente numa amostra de água, o substrato muda de cor e adquire uma tonalidade marrom e/ou turbidez (Rech et al., 2017). A quantificação através

deste método apresenta um resultado em número mais provável por volume, e o período de incubação é de 7 dias e não requer quaisquer passos de confirmação (IDEXX, s.d; Petrisek & Hall, 2018).

Através de um estudo realizado por Rech et al., (2017) compreende-se que este método possui vantagens em relação ao método tradicional, salientando a facilidade de execução que proporciona o fluxo de trabalho e a eficiência do laboratório, e apresenta-se como um ensaio robusto à interferência de outros microrganismos. Ainda, noutro estudo realizado por Petrisek e Hall (2018), afirmam que o método Legiolert™ é mais sensível ao analisar água potável e possui uma especificidade muito alta, mostram ainda que, o Legiolert™ apresenta-se como um método eficaz e eficiente para a deteção de *L. pneumophila*, e não necessita de confirmação. Possui desvantagens como o facto de apenas detetar a *L. pneumophila* e não permitir detetar células viáveis, mas não cultiváveis (Hulboy, 2016).

1.5.4. Legipid® Legionella fast detection

O Legipid®, método desenvolvido pela Biótica®, baseia-se em técnicas inovadoras de captura das partículas imunomagnéticas e do ensaio imunoenzimático para a deteção e quantificação de microrganismos. Esta técnica é designada CEIA do inglês *Immunomagnetic Capture and Enzyme Immunoassay*. O alvo microbiano é capturado pelas partículas imunomagnéticas e separado do resto da amostra de água para ser analisado por ensaio imunoenzimático. Apresenta-se como um teste simples e fiável para a deteção de *Legionella* spp. em amostra de água da torneira, natural e industrial, conseguindo resultados em apenas uma horas (Tecnilab, 2016). A obtenção de resultados rápidos permite um melhor controlo e rápida identificação do risco biológico real. Apresenta uma sensibilidade de 98% e especificidade 93% (Biotica, 2015).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostra e amostragem

A colheita das amostras foi realizada de acordo com o procedimento operativo de microbiologia (POM) 9 – “Colheita de amostras para Análise de *Legionella*”, e efetuada por técnicos do laboratório utilizando equipamento de proteção individual adequado.

Foram colhidas, na mesma indústria alimentar, nas datas de 11 de fevereiro e 13 de maio de 2019 um total de 14 amostras de diferentes matizes. Sendo 2 amostras provenientes de águas de consumo humano (chuveiros), 2 amostras de furo abastecimento e 10 proveniente água de processos (torres de refrigeração). Todas foram analisadas para averiguação de contaminação por *Legionella* spp. e *L. pneumophila* pelo método PCR em Tempo Real e Método Cultural.

Colheram-se 2 L de cada amostra, em garrafas esterilizadas (Figura 5 e 6), devidamente identificadas, sendo realizado o registo na folha de “relatório de colheita” (Anexo I. Relatório de colheita e requisição). Adicionalmente, quando efetuado a colheita de amostras de águas em chuveiros, o técnico de amostragem encheu a garrafa até metade, com fluxo inicial. Desmontou a cabeça do chuveiro e realizou a recolha de biofilme, friccionando as superfícies do interior do chuveiro com uma zaragatoa (estévil). A zaragatoa foi colocada dentro da garrafa contendo a amostra com o cuidado de rejeitar a porção da haste que esteve em contacto com as mãos.

Após o procedimento de recolha de água, as amostras foram condicionadas em malas térmicas com acumuladores térmicos próprios devidamente limpos e transportadas para o laboratório para serem analisadas.

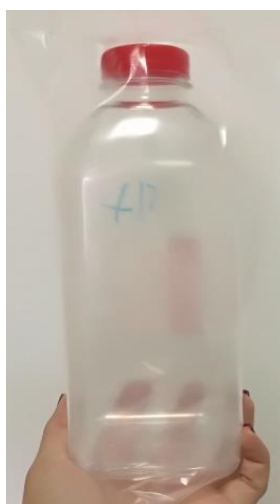


Figura 5 – Garrafa esterilizada, usada na colheita



Figura 6 – Amostras de águas.

2.2. Análise de legionela pelo método PCR em Tempo Real

Para a realização da pesquisa e quantificação de *Legionella* spp. pelo método de PCR foram utilizados os equipamentos e materiais listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Materiais e equipamentos utilizados para a análise de *Legionella* spp. pelo método de PCR.

MATERIAIS	EQUIPAMENTOS	KIT UTILIZADO
Copos de filtração de 100 mL	Rampa de filtração	SureFast® PREP Aqua - Congen
Pinça estéril	Bomba de filtração	Comercial - Congen-SureFast® <i>Legionella pneumophila</i> PLUS (100 React.)
Membranas de policarbonato	Centrifugador de tubos <i>falcon</i>	
Tubos de <i>ependorf</i> e <i>falcon</i>	Centrifugadora de tubos <i>ependorf</i>	
Suporte para tubo de <i>ependorf</i> e <i>falcon</i>	Placa de aquecimento de tubos de <i>ependorf</i>	SureFast® <i>Legionella</i> PLUS (100 React.)
Pipetador e pipetas	Vortex	
	Câmara de operações de PCR	

DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

Segundo a Norma ISO/TS 12869:2012, *Water quality -- Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)*, a detecção e quantificação de *Legionella* spp. ou *L. pneumophila* por PCR deve ser realizada em três fases:

- Concentração de amostras de água por filtração;
- Extração de DNA do filtro;
- Amplificação, detecção e quantificação de uma ou mais sequências de DNA de espécies pertencentes ao gero *Legionella* e/ou espécie *L. pneumophila* por qPCR em tempo real.

Filtrara-se volumes adequados das amostras de água utilizando-se membranas de filtração de Policarbonato (Figura 7), com porosidade de 0,45 µm. Quando o processo de filtração foi concluído, a membrana foi dobrada e, com o auxílio de uma pinça esterilizada, foi transferida para um tubo de *ependorf* de 1,5 mL (Figura 8), seguindo-se a extração de DNA do filtro.

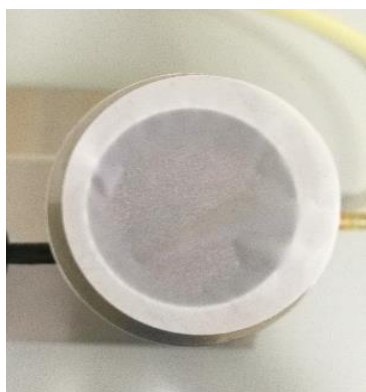


Figura 7 - Membrana de filtração de Policarbonato.



Figura 8 - Membranas inseridas em eppendorf após filtração.

O processo de extração do DNA (que envolve a libertação e purificação) foi realizado com recurso ao kit SureFast® *PREP Aqua – Congen*, seguindo rigorosamente o protocolo do fabricante (Figura 9). De acordo com a Norma ISO/TS 12869:2012, o DNA das amostras foi diretamente extraído da membrana de filtração através da lise dos microrganismos, purificando o DNA enquanto são eliminados os inibidores da PCR. A purificação enzimática pode ser realizada após, ou em simultâneo, com a extração de DNA.



Figura 9 - Amostra de DNA, após processo de extração e purificação.

Após a extração do DNA das amostras, efetuou-se a análise por RT-PCR. Adicionalmente, sempre que as amostras foram analisadas num período próximo de 2/3 horas, estas foram armazenadas a temperaturas de 4°C, ou a -18°C, se o período foi de 24 horas.

Para a análise por RT-PCR procedeu-se à fase de amplificação, deteção e quantificação de DNA, utilizando kits específicos para a quantificação direta de uma sequência específica de DNA de *Legionella* spp. com recurso ao *SureFast® Legionella PLUS – Congne* e de *L. pneumophila*.

Assim, atendendo ao que o cliente pretendeu, através do *software “Fast 7500 Real-Time PCR”* planificou-se a placa de 96 poços e escolheu-se para cada amostra o que se

pretendeu analisar (*Legionella* spp, ou *Legionella pneumophila*), tendo em atenção que, para cada caso é selecionado o par correspondente de IPC, isto é *Legionella* spp. com IPC spp. ou *Legionella pneumophila* com IPC *pneumophila*. Foi utilizado um ciclo de temperaturas universais: uma pré-incubação, durante 1 minuto a temperatura de 95°C, seguida de 45 ciclos com desnaturação a 95°C durante 10 segundos e *annealing* durante 15 segundos, a 60°C.

Cada kit inclui duas “*Reaction Mix* (1,1 mL), uma “*Taq Polymerase*” (11 µL) e um “*Positive Control*” (200 µL) e todos os reagentes foram armazenados a uma temperatura -20°C e protegidos da luz.

Seguindo rigorosamente o protocolo do fabricante, deu-se início à corrida de amplificação e, em cada corrida, obteve-se automaticamente a curva de amplificação (Anexo II. Exemplo de curvas de amplificação). A corrida de amplificação corre com controlo de qualidade interno associado, nomeadamente o branco do processo (permitindo verificar a não contaminação no processo de extração e amplificação) e com o controlo positivo da amplificação (padrão positivo da amplificação).

2.3. Análise de legionela pelo Método Cultural

Para realização da análise segundo o Método Cultural foram enviadas as mesmas amostras para um laboratório acreditado pela IPAC, no qual se procedeu a deteção e quantificação de legionela. O método de análise utilizado rege-se pela Norma ISO 11731:2017 *Water quality – Enumeration of Legionella*.

De um modo geral, a Norma ISO 11731:2017 possibilita diferentes abordagens para tratamento e preparação das amostras. Assim, na escolha do método, deverá ser feita uma estimativa da concentração esperada de microrganismos interferentes, com base na experiência ou origem da amostra. Desta forma, a referida norma providencia uma matriz de decisão (Anexo III. Matriz de decisão (ISO 11731:2017), que sumariza as possibilidades de amostras, métodos, tipo de tratamentos e meios de cultura a utilizar.

Através da matriz de decisão, o 1º passo é caracterizar a amostra segundo a origem e as características da água a analisar. Esta pode ser caracterizada como:

- Matriz A – Águas com baixos interferentes (ex: águas de consumo)
- Matriz B – Águas com alto interferentes (ex: águas de processos)

- Matriz C – Águas com interferentes extremamente altos (ex: águas residuais/superficiais)

E, devido à complexidade das diferentes matrizes, cabe ao laboratório determinar qual o método mais adequado para cada amostra colhida.

O 2º passo é determinar o limite de deteção desejado e através disso seleccionar um ou mais métodos a utilizar para a análise. Verifica-se que as amostras podem ser analisadas por inoculação direta, filtração por membrana ou filtração por membrana com eluição. A Tabela 3 apresenta, segundo a matriz de decisão, o limite de deteção, vantagens e desvantagem para cada um dos métodos.

Tabela 3 - Limites de deteção, vantagens e desvantagem para cada um dos métodos de análise

(Adaptado da Norma ISO 11731:2017)

	INOCULAÇÃO DIRETA	FILTRAÇÃO POR MEMBRANA (INOCULAÇÃO DIRETA)	FILTRAÇÃO POR MEMBRANA (SEGUIDA DE ELUIÇÃO)
Limite de deteção	Ex: volume inoculado 0,1 mL <u>Limite de deteção</u> é de 10 000 ufc/L	Ex: volume filtrado de 10 mL <u>Limite de deteção</u> é de 100 ufc/L	Ex: volume filtrado de 500 mL, concentrado preparado com 5 mL de diluente e volume inoculado 0.1 mL <u>Limite de deteção</u> é de 100 ufc/L
Vantagens	Facilidade na contagem; Boa recuperação	Método fácil de executar; Baixo limite de deteção	Facilidade na contagem; Baixo limite de deteção
Desvantagens	Alto limite de deteção	Difícil de contar (devido ao crescimento excessivo de microrganismos interferente)	Recuperação mais baixa (comparativamente aos outros dois métodos); Método demorado

O 3º passo implica perceber quais os tratamentos necessários a realizar tendo em conta a matriz e método considerado. Para tal, pode ser realizado o tratamento térmico, ácido, combinado (ácido e térmico), ou analisar a amostra sem qualquer tratamento. Cada tratamento implica um procedimento específico (tais procedimentos estão descritos na Norma). A Norma informa ainda que, além destes tratamentos necessários em cada método, pode ser aplicado outro opcional, que se considere adequado.

O 4º passo é a escolha do meio de cultura. Além do meio de cultura indicado em cada método cultural pode ainda ser aplicado outro opcional que se considere adequado.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Nas tabelas 4 e 5 estão resumidos os resultados obtidos pelos dois métodos aplicados (PCR-RT e Método Cultural) na detecção de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* nas amostras de água colhidas a 11 de fevereiro e 13 de maio, respetivamente.

Tabela 4 - Resultados obtido referentes às amostras colhidas a 11 de fevereiro e submetidas a análise segundo o Método Cultural e método PCR.

CÓDIGO DO PONTO	PONTO DE AMOSTRAGEM	MÉTODO UTILIZADO	PARÂMETRO	DATA DE COLHEITA	RESULTADO TRATADO	
1	Água de consumo humano	Chuveiros	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Não Detetado UFC/L
				<i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	Não Detetado UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	Não Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Não Detetado/1L
2	Furo abastecimento	PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	Não Detetado/1L	
			Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Não Detetado/1L	
3	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Não Detetado UFC/L
				<i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	Não Detetado UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	Não Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Não Detetado/1L
4	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	1500 UFC/L
				<i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	1500 UFC/L
PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	Detetado/1L			
	5	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019
<i>Legionella</i> spp.					11/02/2019	Não Detetado UFC/L
PCR-RT				Pesquisa de <i>Legionella</i> spp.	11/02/2019	Não Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Não Detetado/1L

Continuação da tabela 4 - Resultados obtido referentes às amostras colhidas a 11 de fevereiro e submetidas a análise segundo o Método Cultural e método PCR.

CÓDIGO DO PONTO	PONTO DE AMOSTRAGEM	MÉTODO UTILIZADO	PARÂMETRO	DATA DE COLHEITA	RESULTADO TRATADO	
6	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Não Detetado UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	11/02/2019	Não Detetado UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	11/02/2019	Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Detetado/1L
7	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	500 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	11/02/2019	500 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	11/02/2019	Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	11/02/2019	Detetado/1L

Tabela 5 - Resultados obtido referentes às amostras colhidas a 13 de maio e submetidas a análise segundo o Método Cultural e método PCR.

CÓDIGO DO PONTO	PONTO DE AMOSTRAGEM	MÉTODO UTILIZADO	PARÂMETRO	DATA DE COLHEITA	RESULTADO TRATADO	
1	Água de consumo humano	Chuveiros	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
2	Furo abastecimento		Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
3	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
4	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
5	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L

Continuação da tabela 5 - Resultados obtido referentes às amostras colhidas a 13 de maio e submetidas a análise segundo o Método Cultural e método PCR.

CÓDIGO DO PONTO	PONTO DE AMOSTRAGEM	MÉTODO UTILIZADO	PARÂMETRO	DATA DE COLHEITA	RESULTADO TRATADO	
6	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L
7	Águas de processos	Torre de refrigeração	Cultura	<i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
				<i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	<100 UFC/L
			PCR-RT	Pesquisa de <i>Legionella spp.</i>	13/05/2019	Detetado/1L
				Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i>	13/05/2019	Não Detetado/1L

A Direção-Geral da Saúde (2013) considera que a existência de uma análise positiva de *Legionella* na água não indica que ocorra imediatamente a Doença dos Legionários. Do mesmo modo, uma análise negativa, apesar de poder levar a uma falsa sensação de estabilidade e de segurança, não garante a ausência da bactéria no sistema.

Observando os resultados obtidos das amostras analisadas segundo os dois métodos, pode-se constatar que, um resultado negativo pela metodologia de PCR é praticamente certo que será igualmente um resultado negativo pelo Método Cultural. Tal é afirmado pela ECDC (2017) e em estudos realizados por Joly et al. (2006) e Yaradou et al. (2007) e acontece nas amostras cujo código do ponto é 1, 2, 3, 5 (amostras colhidas dia 11/02/2019). Yaradou et al. (2007) obtiveram resultados negativos em 45 amostras para consumo humano utilizando a técnica de PCR sendo que 9 dessas amostras apresentaram um resultado positivo em cultura. Nenhuma das 46 amostras provenientes de torres de refrigeração, com resultado negativo em PCR, apresentou resultado positivo em cultura, concluindo que resultados negativos pela técnica PCR são bastante úteis como indicadores de risco, principalmente em amostras de torres de refrigeração.

Dois meses mais tarde, nas amostras 1, 2, 3, 5 colhidas no dia 13/05/2019, no mesmo local, não foi detetada *Legionella* spp. em 1L, pelo método de PCR. Pelo Método Cultural, as mesmas amostras apresentaram valores abaixo dos valores limite indicados na Portaria nº 353-A/2013, (100 UFC/L, 1000 UFC/L em tanques de torres de arrefecimento), pelo que é possível afirmar que todas as amostras analisadas cumprem os valores legalmente estabelecidos.

A existência de amostras que apresentam um resultado positivo no método PCR, e “Não Detetado” para *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* pelo Método Cultural, pode ser explicada pelo facto da técnica de PCR possuir uma maior sensibilidade, sendo possível a obtenção de resultados positivos, em situações em que o Método de Cultural, menos sensível, não deteta. Pode-se concluir que foi detetado DNA da bactéria nas amostras, mas que esta não está viável ou está num estado não cultivável, podendo estar, por exemplo, associada a protozoários e/ou biofilmes, factores importantes que permitem que a bactéria sobreviva em ambientes adversos, mas que dificultam o crescimento da bactéria em cultura, sugerindo que o Método Cultural tende a subestimar a presença de legionela. Com base num estudo realizado por Villari et al. (1998) que, através da comparação dos dois métodos, confirmam que resultados positivos pelo método PCR devem ser sempre reavaliados pelo Método Cultural, devido aos factores referidos e porque apenas o

Método Cultural permite confrontar com os limites legais impostos. Toplitsch et al. (2018) afirmam também que as bactérias encontradas em biofilmes são extremamente resistentes aos tratamentos frequentemente usados nas torres de refrigeração e a exposição aos biocidas influencia o estado viável, mas não cultivável. Neste estudo, em 21 amostras analisadas em torres de refrigeração pela técnica de PCR, detetou-se o DNA em 12, enquanto que 18 apresentaram um resultado negativo pelo Método Cultural e apenas 3 apresentaram um resultado positivo em ambos os métodos.

Tendo em conta as amostras colhidas no dia 11/02/19, 4 e 7 (Torre de refrigeração) verificou-se que estas apresentaram resultados positivos nos dois métodos, ou seja, foi detetado DNA da bactéria e que esse DNA encontrado, correspondia a células viáveis e cultiváveis no Método Cultural. Na amostra 7 de 11/02/2019 foram obtidos valores superiores a 100 UFC/L de *Legionella* spp. e detetada a presença de *L. pneumophila* que segundo a lei deve estar ausente.

Trone e Hartemann (2008), afirmam que em amostras de água são necessários estudos adicionais para uma correta interpretação em especial na técnica quantitativa em tempo real. Yaradou et al. (2007) confirmam ainda que, em amostras de torres de refrigeração, os resultados pela técnica de PCR são importantes para uma monitorização rápida e permitem suspeitar a presença de células viáveis, mas não cultiváveis.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação microbiológica de água representa um grande problema. O constante progresso de sistemas e equipamentos de água, geradores de aerossóis ocasionam o aumento de infecções causadas pelas bactérias patogénicas do género *Legionella* que, se inalada, pode causar a chamada “Doença dos Legionários”, constituindo um problema de saúde pública.

Revela-se de extrema importância adotar medidas de prevenção e de controlo físico-químico e microbiológico, bem como aplicar tratamentos adequados para minimizar o crescimento de *Legionella* spp, promovendo e mantendo limpas as superfícies dos sistemas de água e de ar.

Embora existam vários métodos de desinfeção para eliminação das bactérias do género *Legionella* em sistema de águas, cada um apresenta vantagens e desvantagens não tendo ainda sido identificado um método ótimo. Esta situação torna muitas vezes necessário combinar diferentes técnicas de desinfeção, sendo que, numa perspetiva futura, será fundamental o desenvolvimento de novas tecnologias/métodos capazes de garantir uma maior eficácia no controlo da multiplicação desta bactéria, a título preventivo, pois uma insuficiente desinfeção posterior, pode levar facilmente ao aparecimento de surtos de legionelose.

As metodologias de análise para a pesquisa, identificação e quantificação de *Legionella* spp. em amostras de água são uma ferramenta útil para o controlo e prevenção desta bactéria, sendo importante que os testes de rotina para a sua monitorização sejam rápidos e precisos e permitam detetar todas as células vivas, incluindo aquelas que não podem ser cultivadas.

Neste contexto, foram abordados neste estudo dois métodos de análise, o Método Cultural normalizado pela ISO 11731 e o método por PCR normalizado pela ISO 12869. Caso a deteção por RT PCR seja positiva é importante complementar a análise pela técnica de sementeira, para a confirmação da possibilidade dessas células serem viáveis e cultiváveis. No entanto, o método cultural é um processo demorado, complexo, e muitas vezes a bactéria encontra-se em concentrações muito baixas ou dentro de protozoários ou integrando biofilmes, encontrando-se desta forma, num estado não cultivável, que não permite a sua deteção.

Torna-se indispensável a utilização de métodos que além de fornecerem uma resposta mais rápida, possam também detetar bactérias viáveis mas não cultiváveis. A técnica de PCR acaba por ser um método acessório que permite mais informação, mas que não fornece resultados enquadráveis na legislação existente, pois não existe uma correlação entre unidades genómicas (UG) e unidades formadora de colónias (ufc), e a Legislação Portuguesa impõe valores para *Legionella* spp. nestas unidades.

O presente estudo permitiu verificar que o Método Cultural deverá ser aplicado em paralelo com a análise de PCR- TR de forma a que haja mais informação fiável e real sobre a presença/ausência desta bactéria e contribuiu para reforçar a ideia de que, sempre que possível, deverá aconselhar-se o cliente a monitorizar a presença da bactéria pelas duas metodologias. A análise de DNA permitirá obter resultados rápidos sobre a confirmação da presença/ausência da bactéria nas instalações, a análise pelo Método Cultural permitirá perceber se a bactéria está viável e potencialmente infecciosa e em que níveis se encontra para poder confrontar com a exigência legal.

De forma a poder responder às imposições da Legislação Portuguesa e tentar dar uma resposta global ao seu cliente, o laboratório está, neste momento, em processo de implementação do Método Cultural segundo a ISO 11731:2017, apesar das limitações que apresenta, para posteriormente obter a acreditação dos mesmos parâmetros de acordo com a Norma de Referência. Desta forma poderá responder de uma forma completa e integral no âmbito da avaliação de risco da presença de bactéria do género *Legionella*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D. E., & Guyard, C. (2013). Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *International journal of molecular sciences*, *14*(11), 21660-21675. <https://doi.org/10.3390/ijms141121660>
- Almeida, C. M. C. D. (2013). *Controlo de qualidade interno: elaboração de um programa de Controlo de Qualidade Interno segundo as boas práticas da Qualidade*. Dissertação de Mestrado. Universidade Atlântica e Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa.
- Ambrósio, L. A. F. M. (2017). *Legionella: Transmissão e controlo*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Portugal.
- Anand C. M., Skinner, A. R., Malic, A., & Kurtz, J. B. (1983). Interaction of *L. pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *Journal of Hygiene*, *91*(2), 167-178. <https://doi.org/10.1017/S0022172400060174>
- Association of Water Technologies (AWT) (2019). *Legionella 2019: A Position Statement and Guidance Document*.
- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., Pond, K., & Surman-Lee, S. (Eds.). (2007). *Legionella and the prevention of legionellosis*. World Health Organization.
- Benites, A. J. (2016). *Implementação e validação do método de deteção de alérgenos em alimentos por PCR em tempo real no Laboratório SGS*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade nova de Lisboa, Portugal
- Benoliel, M. J., Fernando, A. L., & Diegues, P. (2018). *Prevenção e Controlo de Legionella nos Sistemas de água*. Instituto Português da Qualidade em parceria com a EPAL, Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. 3ª Edição 2018.
- Biotica (2015). *LEGIPID fast detection - Catalogue LEGIPID*. Acedido a setembro 13, 2019. Disponível em: <https://www.slideshare.net/biotica/catalogue-legipid-english>.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., & Messi, P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: Environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review*, *11*(SUPPL.), 355–380. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11011-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11011-4)
- Botelho, A. R. B. P. M. (2016). *Execução de ensaios microbiológicos e atividades conexas nas áreas alimentar, ambiental e técnica, em contexto empresarial (laboral)-Laboratório MicroChem*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de ciências, Universidade do Porto, Portugal
- Carneiro, C. V. N. (2014). *Estudo da expressão génica da Legionella Pneumophila após cultura em acanthamoeba castellanii*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Portugal

- Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., ... & Guerreiro, M. (2016). Probable person-to-person transmission of Legionnaires' disease. *New England Journal of Medicine*, 374(5), 497-498.
- CUF. (2018). *Legionella: o que deve saber*. Acedido a Abril 20, 2019. Disponível em: <https://www.saudecuf.pt/mais-saude/artigo/legionella-o-que-deve-saber>
- Cunha, C. I. G. S. (2013). *Estudo da expressão génica da legionella pneumophila estirpe paris após co-cultura em acanthamoeba castellanii*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Médicas, Lisboa, Portugal.
- Declerck, P. (2010). Biofilms: The environmental playground of Legionella pneumophila. *Environmental Microbiology*, 12(3), 557–566. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02025.x>
- Decreto-Lei 79/2006 de 4 de Abril. Aprova o Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios. *Diário da República n.º 67/2006, Série I-A*. Ministério das Obras Públicas, Transportes e Comunicações, Lisboa.
- Diegues, P., & Martins, V. (2013). *Prevenção da Doença dos Legionários*. Direção-Geral da Saúde. Lisboa.
- Direção-Geral da Saúde (s.d) *Doença dos Legionários. Orientações Programáticas*. Acedido a Maio 19, 2019. Disponível em: <https://www.dgs.pt/doenca-dos-legionarios/orientacoes-programaticas.aspx>
- Dorak, M. T. (2007). *Real-time PCR*. New York: Taylor & Francis Group.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (s.d). *Legionnaires' disease outbreak investigation toolbox. Microbiology: Legionella laboratory diagnosis and detection*. Acedido a Maio 02, 2019. Disponível em: <https://legionnaires.ecdc.europa.eu/?pid=221>
- Eisenreich, W., & Heuner, K. (2016). The life stage-specific pathometabolism of Legionella pneumophila. *FEBS Letters*, 590(21), 3868–3886. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12326>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2017). *European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by Legionella species*. Acedido a Maio 02, 2019. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Legionella%20GuidelinesFinal%20Updated%20for%20ECDC%20corrections.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. *Annual epidemiological report for 2017*. Stockholm: ECDC; 2019.
- Faria, M., S., L. (2010). *Avaliação dos conceitos e procedimentos de limpeza e desinfecção em estabelecimentos alimentares*. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal
- Ferreira, F., C. (2019). Amostragem e Análises laboratoriais de Legionella em sistemas de água-Métodos disponíveis, vantagens e inconvenientes. *Workshop: Prevenção e*

Controlo de Legionella nos Sistemas de Água. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IPQ. Acedido a Maio 10, 2019. Disponível em: http://www1.ipq.pt/PT/IPQ/historico_eventos/Documents/2019/Prevencao%20e%20Controlo%20de%20Legionella%20nos%20Sistemas%20de%20Agua/3_LegionelaIPQ_FILIPA_C_FERREIRA_INSA.pdf

Fields, B., S., Benson, R., F., Besser, R., E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews*, 15(3):506-26. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>

Garrity, G., Brown, A., Vickers, R. (1980). Tatlockia and Fluoribacter: Two new genera of organisms resembling Legionella pneumophila. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30(4), 609-614. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-4-609>

Gaspar, C., Augusto, G., Albuquerque, M., Nascimento, M., Vicêncio, P., & Nogueira, P. (2017). *Doenças de Declaração Obrigatória 2013-2016*, Volume II-Regiões.

George, F., Shivaji, T., Pinto, C. S., Serra, L. A. O., Valente, J., Albuquerque, M. J., ... & Marques, T. (2016). A large outbreak of Legionnaires' Disease in an industrial town in Portugal. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34(3), 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2016.10.001>

Gruas, C., Álvarez, I., Lara, C., García, C. B., Savva, D., & Arruga, M. V. (2013). Identification of Legionella spp. in environmental water samples by ScanVIT-Legionella™ method in Spain. *Indian journal of microbiology*, 53(2), 142-148. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0363-6>

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Health and Safety Executive (2013) Legionnaires' disease The control of legionella bacteria in water systems. *Approved Code of Practice and guidance on regulations*. L8 (Fourth edition). Disponível em: <https://www.kent.ac.uk/estates/files/maintenance/L8%20Code%20of%20Practice.pdf>

Health Day (2016) *Legionnaires' Disease Can Transmit Person-to-Person*, Case Suggests, Acedido a Maio 19, 2019. Disponível em: <https://consumer.healthday.com/infectious-disease-information-21/misc-infections-news-411/legionnaires-disease-can-transmit-person-to-person-case-suggests-707718.html>;

Hulboy D. L. (s.d). *Monitoring Legionella to Address a Growing Problem*. Acedido a Maio 20, 2019. Disponível em: <https://www.abraxiskits.com/wp-content/uploads/2016/12/Monitoring-Legionella-to-Address-a-Growing-Problem.pdf>

ISO 11731:2017 *Water quality – Enumeration of Legionella*

Joly, P., Falconnet, P.A., Andre, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, F.M., Etienne, J. et al. (2006). Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4), 2801-2808. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2801-2808.2006>.

- Yaradou, D.F., Hallier-Soulier, S., Moreau, S., Poty, F., Hillion, Y., Reyrolle, M., Andre´, J., Festoc, G. et al. (2007) Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl Environ Microbiol* 73(5), 1452–1456. <https://doi.org/10.1128/AEM.02399-06>
- Khodr, A., Kay, E., Gomez-Valero, L., Ginevra, C., Doublet, P., Buchrieser, C., Jarraud, S., (2016) Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 108–122 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.033>
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 9-27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)
- Kusnetsov, J.M. Ottoila, E. and Martikainen, P. J. (1996). Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(4), 341-347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03517.x>
- Lopes, C., B. (2014). *Legionella – transmissão e prevenção*. *Pathologika*. Acedido a abril 20, 2019. Disponível em: <https://pathologika.com/legionella-transmissao-e-prevencao/>
- Ma, H., Shieh, K. J., Chen, G., Qiao, T., & Chuang, M. Y. (2006). Application of real time polymerase chain reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, 2(3), 1-5.
- Mansilha, C. R., Coelho, C. A., Maria A. R., & ANA, M. H. (2007). Prevalência da *Legionella pneumophila* em águas de diferentes proveniências das regiões norte e centro de Portugal no período de 2000 a 2006. *Rev Port Saúde Pública*, 25(2), 65-80.
- Marques, M., Froes, F. Brum, G. e Esteves A. C. S. (2003). *Doença dos legionários: Protocolo de diagnóstico*. Centro Regional de Saúde Pública de Lisboa e Vale do Tejo.
- Norma ISO /TS 12869:2012 - *Water quality -- Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)*
- Novais, C., & Peixe, L. (2014). *Legionella: Factos essenciais e informações práticas*. Faculdade de farmácia, Universidade do Porto, Portugal.
- Oliveira, T. M. D. S. (2010). *PCR em tempo real: métodos e aplicações*. Dissertações de Mestrado. Universidade de Aveiro.
- Omiccioli, E., Schiavano, G. F., Ceppetelli, V., Amagliani, G., Magnani, M., & Brandi, G. (2015). Validation according to ISO/TS 12869: 2012 of a molecular method for the isolation and quantification of *Legionella* spp. in water. *Molecular and cellular probes*, 29(2), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.12.004>
- Orientação nº 020/2017 de 15/11/2017. Doença dos Legionários: Diagnóstico laboratorial de Doença dos Legionários e pesquisa de *Legionella* em amostras ambientais.

- Palusińska-Szys, M., & Cendrowska-Pinkosz, M. (2009). Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 57(4), 279-290.
- Petrisek, R., & Hall, J. (2018). Evaluation of a most probable number method for the enumeration of Legionella pneumophila from North American potable and nonpotable water samples. *Journal of water and health*, 16(1), 25-33. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.118>
- Pizarro, C., & Rodrigues, R. (2013). Amostragem e Análise de Legionella em Sistemas de Água. In *Workshop "Prevenção e Controlo de Legionella nos Sistemas de Água"*, 30 janeiro 2013. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IPQ.
- Portaria n.º 1071/98, de 31 de Dezembro. Aprova a tabela das doenças de declaração obrigatória, ordenada de acordo com o código da 10.ª Revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID), e utilizando a respetiva nomenclatura nosológica, conforme a Deliberação n.º 131/97, de 27 de Julho. *Diário da República n.º 301/1998, Série I-B*. Ministério da Saúde. Lisboa.
- Portaria n.º 1220/2000 de 29 de Dezembro. Estabelece regras relativas às condições a que as águas minerais naturais e as águas de nascente, na captação, devem obedecer para poderem ser consideradas bacteriologicamente próprias. *Diário da República n.º 299/2000, Série I-B*. Ministérios da Economia e da Saúde.
- Portaria n.º 353-A/2013 de 4 de dezembro. Estabelece os valores mínimos de caudal de ar novo por espaço, bem como os limiares de proteção e as condições de referência para os poluentes do ar interior dos edifícios de comércio e serviços novos, sujeitos a grande intervenção e existentes e a respetiva metodologia de avaliação. *Diário da República n.º 235/2013, 1.º Suplemento, Série I*. Ministérios do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia, da Saúde e da Solidariedade, Emprego e Segurança Social. Lisboa
- Prada-Arismendy, J., & Castellanos, J. E. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Médica*, 42(2), 243-258.
- Püle, D. (2016). Conventional and Alternative Disinfection Methods of Legionella in Water Distribution Systems – Review. *Construction Science*, 19(1), 21–26. <https://doi.org/10.1515/cons-2016-0007>
- Quirino, J. P. R. D. S. (2011). *Doença dos Legionários: Uma revisão crítica*. Trabalho apresentado para obtenção da Licenciatura em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciência da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto. Portugal.
- Rech, M. M., Swalla, B. M., & Dobranic, J. K. (2018). Evaluation of Legiolert for Quantification of Legionella pneumophila from Non-potable Water. *Current microbiology*, 75(10), 1282-1289. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1522-0>
- Rodrigues, C. (2006). Higiene e Segurança do Trabalho – Manual Técnico do Formador. *Nufec-Núcleo de Formação, Estudos e Consultoria*. Disponível em: https://elearning.iefp.pt/pluginfile.php/49026/mod_resource/content/0/p780/Manual_Tecnico_do_Formando_Higiene_e_seguranca_do_Trabalho.pdf

- Rodrigues, R. (2017). Análises laboratoriais de água: métodos disponíveis, vantagens e inconvenientes. In *Workshop “Prevenção e Controlo de Legionella nos Sistemas de Água”*, Comissão Setorial para a Água/Instituto Português da Qualidade, 11 maio 2017.
- Serra, P., G. (2003). *Estudio de biofilms: Formación y consecuencia*. Escola de prevenção i seguretat integral. Acedido a Abril 20, 2019. Disponível em: http://www.adiveter.com/ftp_public/A1070308.pdf
- Sheehan K. B., Henson J. M., Ferris M. J. (2005). Legionella species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 507-511. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.507-511.2005>
- Simões, M., Simões L. C. and Vieira M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43(4): 573-583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
- Springston, J. P., & Yocavitch, L. (2017). Existence and control of Legionella bacteria in building water systems: A review. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(2), 124-134. <https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1229481>
- Tecnilab (2016). *Legipid – Legionella Fast Detection*. Acedido a setembro 13, 2019. Disponível em: <https://www.analitica.tecnilab.pt/media/118/File/documentacao/legipid.pdf>
- Teixeira, P., Rodrigues, D., Romeu, M. J. L., & Azeredo, J. (2015). O impacto de biofilmes microbianos na higiene e segurança alimentar. *Boletim de biotecnologia*, (6), 31-34. <http://hdl.handle.net/1822/35326>.
- Téllez, S. (2010). Biofilms and their impact on food industry. *Visavet outreach journal*. Health surveillance centre. Complutense university. Madrid.
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>
- Villari, P., Motti, E., Farullo, C., & Torre, I. (1998). Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of Legionella pneumophila in water. *Letters in applied microbiology*, 27(2), 106-110. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00389.x>
- Wood, R. E., Newton, P., Latomanski, E. A., & Newton, H. J. (2015). Dot/Icm effector translocation by Legionella longbeachae creates a replicative vacuole similar to that of Legionella pneumophila despite translocation of distinct effector repertoires. *Infection and Immunity*, 83(10), 4081–4092. <https://doi.org/10.1128/IAI.00461-15>
- Yee R.B., Wadowsky R.M. (1982). Multiplication of Legionella pneumophila in unsterilized tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1330-1334.

ANEXOS

ANEXO I . RELATÓRIO DE COLHEITA E REQUISIÇÃO

Relatório de Colheita/Requisição



Colheita efectuada: Laboratório Requerente Data _____

Nome: _____ Cliente facturação: _____

Morada _____ NIF _____ Tel. _____

Nº	T. A.	I. A.	R Local	Tº Lab.	E	Nº RE
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			
			Hora: TºC: Cloro:			

Legenda T.A. - Tipo de Amostra; I.A. - Identificação da Amostra; R- Resultados; E - Ensaio; RE- Relatório Ensaio

Condições Climáticas:

Observações:

Eq. Cloro: _____ Lote Frasco estéril _____ Material Estéril _____ Termómetro _____

Recepção no Laboratório/ Data _____ Hora _____ TºC Transporte _____

Devolução Amostra: Sim Não

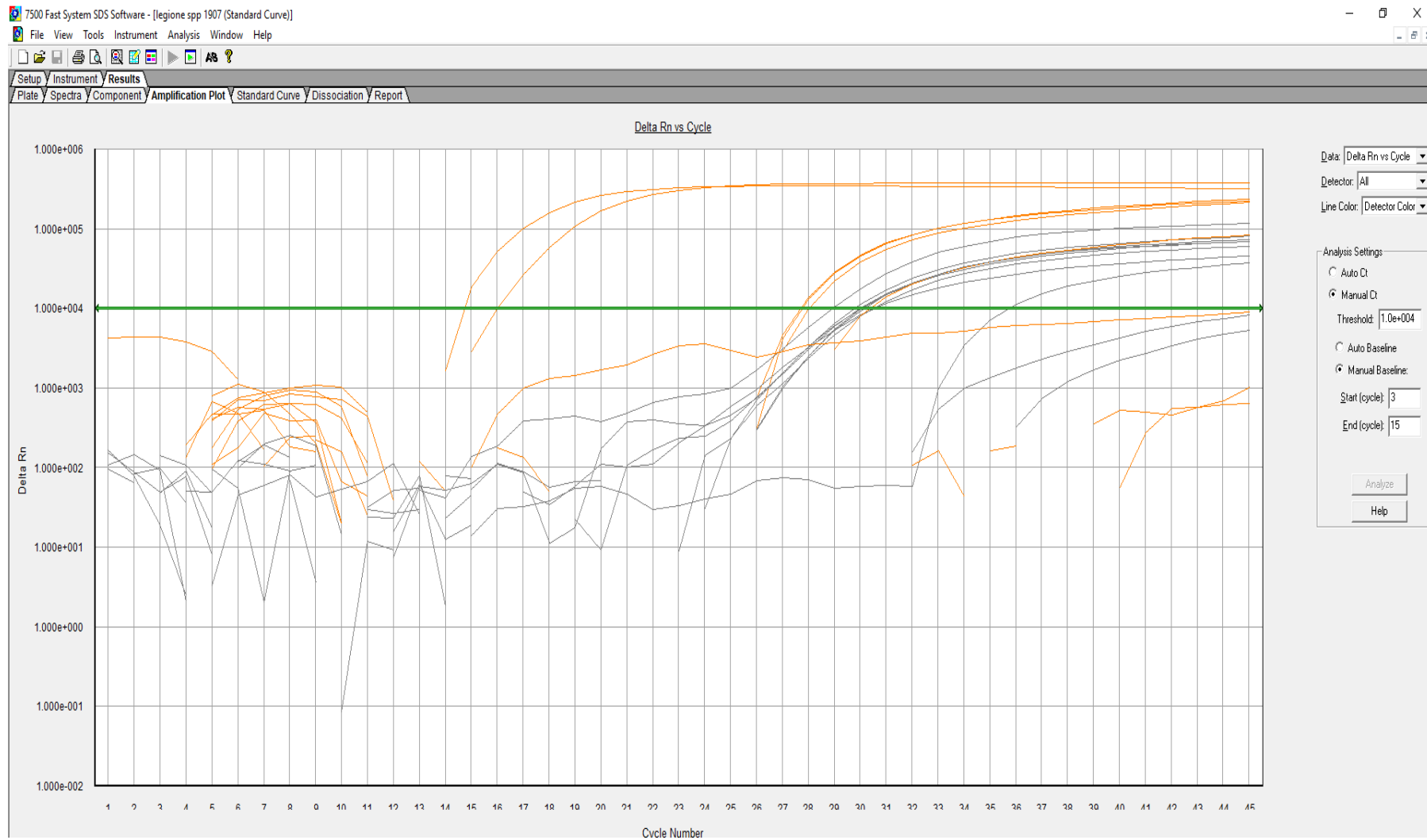
Pago: Sim Não

Ass. Requerente _____

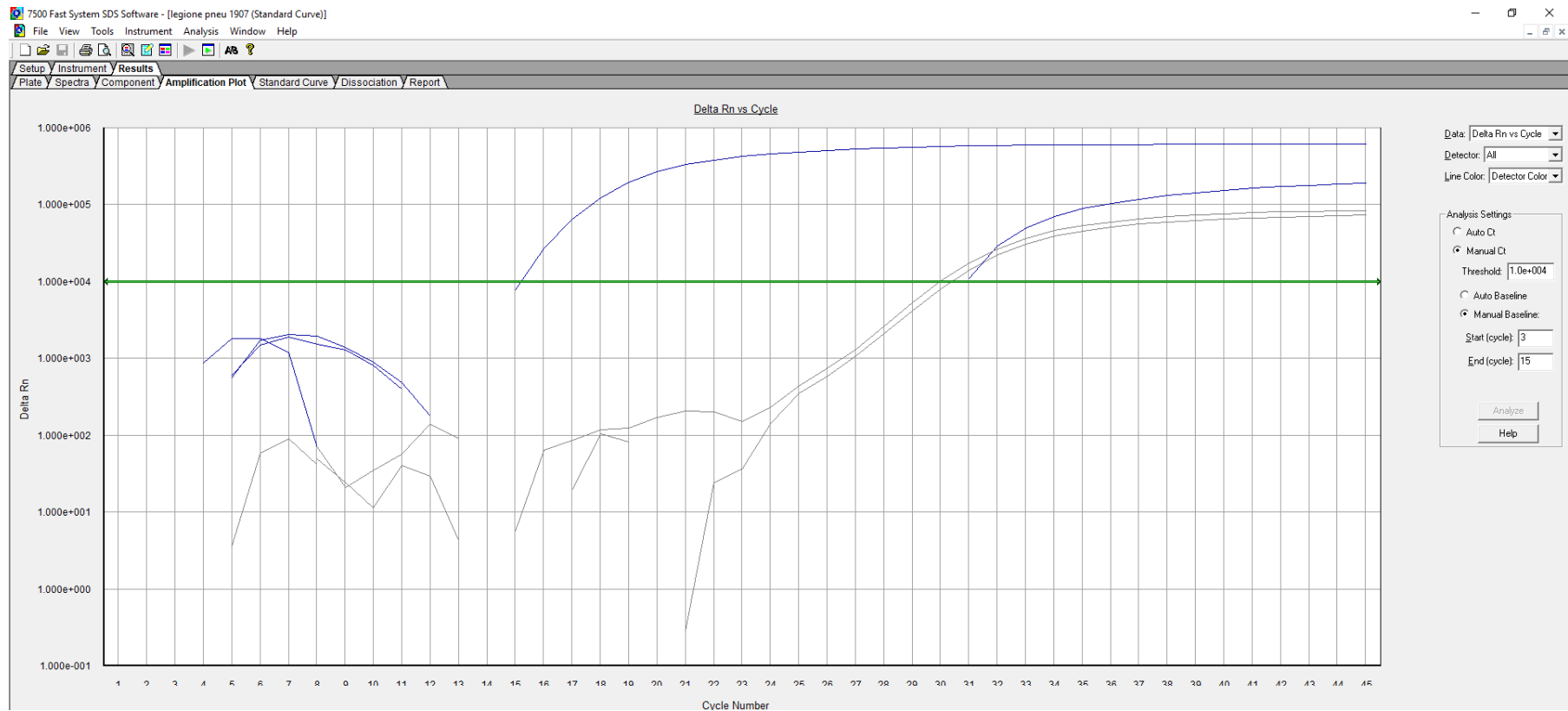
Ass. Técnico Laboratório _____

ANEXO II. EXEMPLOS DE CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO

Representação de uma curva de amplificação de resultados obtidos para pesquisa de *Legionella* spp. numa série de amostra.



Representação de uma curva de amplificação de resultados obtidos para pesquisa de *Legionella pneumophila* numa série de amostra.



ANEXO III . MATRIZ DE DECISÃO (ISO 11731:2017)

<i>Step 1</i>												
			Water or water derived from water related matrices e.g. swabs, biofilm, sediments									
			Matrix A			Matrix B			Matrix C			
			Water with low background (see 8.4.2 and 8.4.3) e.g. potable water			Water with high background (see 8.4.4) e.g. cooling tower, process water, water from air washers chambers, water from dental units			Water with extremely high background ^a (see 8.4.5) e.g. waste water, surface water			
<i>Step 4</i>												
Culture media												
<i>Step 2</i>	<i>Step 3</i>	Procedure	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Direct plating	Without treatment	1	R	R	O		O	R				
	Heat treatment	2	O	O	O		O	R				
	Acid treatment	3	O	O	O		O	R				
	Combination of heat/acid treatment	4					O	O		O	R	
Membrane filter on plate	Without treatment	5	R	O	O							
	Heat treatment	6	O	O	O		O	O				
	Acid treatment	7	O	R ^b			O	O				
Filtration with washing procedure	Without treatment	8	R	R ^b			O	R				
	Heat treatment	9	R	R ^b			O	R				
	Acid treatment	10	R	R ^b			O	R				
Plating after dilution	Without treatment	11	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c				
	Heat treatment	12	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c				
	Acid treatment	13	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c				
	Combination of heat/acid treatment	14					O ^c	O ^c		O ^d	R ^d	
Culture media												
A: BCYE agar (see B.1).												
B: Selective BCYE agar [BCYE+AB agar (see B.3)].												
C: Highly selective culture media [GVPC agar or MWY agar (see B.4 or B.5)].												
Key												
R required												
O optional												
^a For this type of water, both methods (direct plating and plating after dilution) are required.												
^b Choice of culture media B or C.												
^c With dilution 1:10.												
^d With dilution 1:10 and 1:100.												
NOTE 1 For the different matrices above, some examples are described (e.g. potable water). It is possible, based on the experience of the laboratory, that the examples can be covered by another matrix using one or more pre-treatment methods.												
NOTE 2 For the different matrices, the shorter expression is used above: "water with low background" (= an expected low concentration of interfering microorganisms), "water with high background" (= an expected high concentration of interfering microorganisms), and "water with extremely high background" (= an expected extremely high concentration of interfering microorganisms).												
NOTE 3 The cells in "grey" can be used for a more detailed way of reporting: <i>Reference to this document (ISO 11731) [Matrix A; Procedure 1; Media A and B]</i> .												