Universidade de Aveiro
Ano 2020

YULIYA YAKUBOVYCH

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *LEGIONELLA* EM SISTEMAS DE ÁGUA

Universidade de Aveiro
Ano 2020

YULIYA YAKUBOVYCH

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *LEGIONELLA* EM SISTEMAS DE ÁGUA

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha mãe.

o júri

presidente

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar c/ Agregação, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves
Investigadora Auxiliar, Universidade de Aveiro

orientadora

Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora Auxiliar c/ Agregação, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Este caminho só foi possível com o apoio direto e indireto de várias pessoas. A energia e a força de todos, nesta trajetória, foi fundamental para ultrapassar os desafios, as incertezas, as alegrias e os percalços.

Agradeço à Doutora Ana Félix por me ter permitido estagiar no Laboratório de Saúde Pública. Estou profundamente grata à Doutora Rosário Figueiredo que, ao longo deste percurso foi incansável na disponibilidade, no apoio e nos ensinamentos da microbiologia. Tal como, a todas as Técnicas pela transmissão dos conhecimentos e pela paciência, em particular à Cristina Castro e à Sara Dias.

Um enorme obrigada à Professora Doutora Adelaide Almeida, minha orientadora, por todo o acompanhamento, incentivo, disponibilidade e revisão crítica deste documento escrito.

À minha família que está na Ucrânia. Aos meus pais, em particular à minha mãe pelo amor incondicional e apoio constante.

Aos amigos, dos mais aos menos presentes. Obrigada a cada um, individualmente, formam todos fundamentais.

À Doutora Paula que também contribuiu para esta etapa.

Aos antigos colegas de trabalho.

A todos os professores que fizeram parte tanto do meu percurso escolar como académico, sem eles nada disto era possível, em particular aos do Departamento de Biologia e, por conseguinte, à Universidade de Aveiro.

OBRIGADA!

palavras-chave *Legionella*; RT-PCR; água; *L. pneumophila*; saúde pública

resumo

A água é o principal reservatório de *Legionella*, que é um microrganismo patogénico. Este pode ser encontrado em ambientes aquáticos naturais ou artificiais como, águas de consumo humano, piscinas, torres de refrigeração e outros.

Como a rede de abastecimento de água chega a um grande número de indivíduos, se *L. pneumophila* estiver presente pode tornar-se uma ameaça para a saúde. Os aerossóis são a principal fonte de transmissão de *Legionella.* A *Legionella* quando inalada pode causar pneumonia atípica, conhecida como doença do legionário (DL). Assim, existe a necessidade de deteção e quantificação de *Legionella* em amostras de água. A monitorização de *Legionella* é fundamental a nível de saúde pública não só para detetar potenciais focos de *Legionella*, mas também para avaliar a eficácia das medidas de controlo vigentes.

A deteção de *Legionella* em amostras de água pode ser avaliada através do método cultural e da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). O método cultural deteta as bactérias cultiváveis e o RT-PCR tem a capacidade de detetar também as bactérias viáveis, mas não cultiváveis (VBNC). Neste estudo, entre 2017 e 2019, foram analisadas 3352 amostras de água, dos Distritos de Aveiro, Coimbra e Viseu, de Portugal, para monitorizar a presença de *Legionella*. Os resultados mostraram que ao longo dos três anos a incidência de *Legionella* diminuiu. Pode concluir-se que a monitorização das águas de abastecimento está a ter efeitos positivos no controlo deste agente patogénico.

keywords *Legionella*; RT-PCR; water; *L. pneumophila*; public health.

abstract

The water is the main reservoir of *Legionella*, which is a pathogenic microorganism. It can be found in natural or artificial aquatic environments such as drinking water, swimming pools, cooling towers and others.
As a water supply network reaches many individuals, the presence of *L. pneumophila* can become a threat. Aerosols are the main source of transmission. *Legionella*, when inhaled, can cause atypical pneumonia, known as legionary disease (DL). Thus, there is a need for detection and quantification of this bacterium in water supply systems.
Legionella monitoring is critical at the public health level to detect potential outbreaks of *Legionella*, but also to assess the effectiveness of existing control measures. *Legionella* detection in water can be done by using culture media and by Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The culture method detects cultivable bacteria and the RT-PCR can detect also viable but not cultivable bacteria (VBNC). In this study, between 2017 and 2019, 3352 samples of water were analyzed for the detection of *Legionella*, of the Districts of Aveiro, Coimbra and Viseu, in the Central Portugal Region. The results showed that over three years the incidence of *Legionella* decreased. It can be concluded that the monitoring of the supply waters is having positive effects on the control of this pathogen.

Índice

Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas X
Índice de figuras XII
Índice de tabelas XIII
1. Capítulo 1: Microbiologia de alimentos e águas 1
1.1. Considerações gerais 1
1.2. Microbiologia dos alimentos 1
1.3. Microbiologia das águas 4
1.4. Parâmetros microbiológicos 5
1.4.1. Microrganismos a 22 ºC, 30 ºC e 37 ºC 5
1.4.2. Coliformes e *Escherichia coli* 6
1.4.3. *Enterococcus* 7
1.4.4. *Clostridium perfringens* 7
1.4.5. Esporos de *Clostridium* sulfito-redutores 7
1.4.6. *Listeria spp.* 8
1.4.7. *Listeria monocytogenes* 8
1.4.8. *Legionella spp*. e *Legionella pneumophila* 8
1.4.9. *Staphilococcus spp*., *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* 9
1.4.10. *Salmonella spp.* 9
1.4.11. *Pseudomonas aeruginosa* 9
2. Localização do estágio – Laboratório de Saúde Pública de Aveiro (LSPA) 10
3. Atividade desenvolvida ao longo do estágio 10
3.1. Ensaios microbiológicos e apresentação de resultados 11
3.1.1. Receção e preparação de amostras 11
3.1.2. Análise microbiológica dos alimentos 13
3.1.3. Análises microbiológicas a manipuladores e superfícies 19
3.1.4. Análise microbiológica das águas 19
3.2. Considerações finais da análise microbiológica de rotina 24
4. Capítulo 2: Avaliação da presença de *Legionella* em sistemas de água 25
4.1. Introdução 25
4.1.1. Antecedentes epidemiológicos (mundo, Europa e Portugal) 27
4.1.2. Ecologia, ambiente e interação com outros microrganismos 28

4.1.3. Virulência de *Legionella pneumophila* 30
4.1.4. Enquadramento clínico 33
4.1.5. Diagnóstico laboratorial 35
4.1.6. Prevenção 35
4.1.7. Tratamento 38
4.2. Material e métodos 40
4.2.1. Método cultural segundo a ISO 11731 e prNP4422:2002 40
4.2.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) pela ISO/TS 12869:2012 41
4.2.3. Organização dos resultados 43
4.3. Resultados 44
4.3.1. Análise da monitorização num mesmo local de amostragem (2017-2019) 51
4.4. Discussão 56
4.5. Considerações finais e perspetivas futuras 60
4.6. Bibliografia 62

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas

ACH: Água de consumo humano

ALOA: Ágar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti"

AP: Água de piscina

Cromo: Ágar Cromogénico Triptona Bile X-Glucuoronida

DGS: Direção Geral da Saúde

DL: Doença dos legionários

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ER: Retículo endoplasmático

EWGLINet: Grupo Europeu para o Estudo de Infeções por *Legionella*

GVPC: "Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide" / Glicina Vancomicina Polimixina Ciclo-heximida

HACCP: Perigos e Pontos Críticos de Controlo

HGT: Transferência horizontal de genes

ICMSF: "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" / Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos

INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ISO: Organização Internacional de Normalização

Lcl: "*Legionella* collagen-like protein"

LCV: Vacúolo quando contém *L. pneumophila*

LD: Limite de deteção

LPS: Lipopolissacarídeos

LSPA: Laboratório de Saúde Pública de Aveiro

MC: Método cultural

Mip: Potencializador de infecciosidade de macrófagos

MKTTn: Caldo de Tetrationato-Novobiocinina de Muller-Kauffmann

MLSA: "Membrane Lauryl Sulphate Agar" / Ágar Lauril Sulfato de Membrana

NF: Norma Francesa

O: Outras águas

OMS: Organização Mundial de Saúde

PALCAM: Ágar BD PALCAM *Listeria*

PCA: Ágar de contagem de placas

PCR: Reação em cadeia da polimerase

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RLM: “RAPID'L Mono Agar”

RPF: Fibrinogénio de plasmático de coelho

RSECE: Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SS: Ágar BD *Salmonella Shigella*

T4P: Pili tipo IV

T4SS: Sistema de secreção tipo IV

TSC: Ágar triptose sulfito cicloserina

UFC: Unidades formadoras de colónias

VBNC: “Viable but nonculturable” / Viáveis mas não cultiváveis

VRBL: Lactose biliar vermelha violeta

XLD: “Xylose Lysine Deoxycholate agar” / Ágar de desoxicolato-lisina-xilose

YEA: Ágar Extrato de Levedura

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema do procedimento de alimentos recebidos no laboratório 14
Figura 2 Esquema de processamento de zaragatoas 19
Figura 3 Ciclo de vida intracelular de *L. pneumophila.* (61) 30
Figura 4 Visão esquemática dos estados morfológicos de *L. pneumophila* durante seu ciclo de crescimento. (90) 31
Figura 5: 2017 - Pesquisa e Quantificação de *Legionella spp.* e *L. pneumophila* por MC (ufc/L) e PCR (UG/L) 45
Figura 6 Distribuição por tipo amostras positivas para *L. pneumophila* - 53 amostras positivas por MC e 156 amostras positivas por PCR 45
Figura 7 2018 - Pesquisa e Quantificação de *Legionella spp*. e *L. pneumophila* por MC (UFC/L) e PCR (UG/L) 47
Figura 8 Distribuição por tipo amostras positivas para *L. pneumophila* – 69 amostras positivas por MC e 158 amostras positivas por PCR 47
Figura 9 2019 - Pesquisa e Quantificação de *Legionella spp.* e *L. pneumophila* por MC (ufc/L) e PCR (UG/L) 49
Figura 10 Distribuição por tipo amostras positivas para *L. pneumophila* - 48 amostras positivas por MC e 150 amostras positivas por PCR 49
Figura 11 Gráfico das 57 amostras testadas para *L. pneumophila* pelo método cultural.. 54
Figura 12: Gráfico que representa em percentagem as amostras Detetadas e Não Detetadas pelo MC para *L. pneumophila* 54
Figura 13: Gráfico que representa em percentagem as amostras Detetadas e Não Detetadas por RT-PCR para *L. pneumophila* 55

Índice de Tabelas

Tabela 1 Microrganismos testados em cada grupo de tipo de amostra e o método implementado no laboratório 12
Tabela 2 Três grupos pelos quais os alimentos são triados aquando da chegada ao laboratório. (4)..... 13
Tabela 3 Valores baseados na Tabela dos Valores Guia do INSA (4)..... 18
Tabela 4 Parâmetros para água de consumo humano e os valores recomendáveis e limite permitido 22
Tabela 5 Parâmetros para água de piscinas e os valores recomendável e limite permitido 22
Tabela 6 Parâmetros para águas minerais e termais e os valores limite permitidos 22
Tabela 7 Ações propostas consoante a contagem de *Legionella* (105)..... 39
Tabela 8 Número de amostras positivas para *L. pneumophila* em função das amostras totais segundo PCR e MC..... 50
Tabela 9 Amostras provenientes para a vigilância da *L.pneumophila* no mesmo edifício, ao longo de 3 anos (2017-2019)..... 52
Tabela 10 Outras espécies de *Legionella* patogénicas para o ser humano (57)..... 59

1. Capítulo 1: Microbiologia de Alimentos e Águas

1.1. Considerações gerais

Ao longo do ano letivo 2019/2020, no âmbito da unidade curricular 49991 Dissertação / Projeto / Estágio, realizada no Laboratório de Saúde Pública de Aveiro (LSPA), acompanhei as atividades relacionadas com a preparação de material e meios de cultura, o processamento analítico das amostras e o controlo da qualidade dos ensaios. O Laboratório de Saúde Pública de Aveiro está classificado como um laboratório de nível 2 de segurança biológica, o que significa que, é apropriado para trabalhar com agentes biológicos da classe II. A preparação de diluentes, meios de cultura e outras soluções necessárias para a realização de análises microbiológicas, foi feita de acordo com os procedimentos implementados no laboratório. O controlo de atividade realizado envolveu todos os aspetos, desde a qualidade analítica, seleção e manuseamento de amostras, metodologias, ambiente, meios de cultura e reagentes, e controlo de qualidade interno e externo.

1.2. Microbiologia dos Alimentos

A alimentação é essencial para a vida e contribui para o bem-estar. A aquisição de alimentos, a preparação e o consumo são vitais para o sustento da vida, pois fornecem energia e nutrientes ao ser humano. (1) A vigilância de contaminantes alimentares e a identificação de fatores de risco são cruciais para garantir a segurança alimentar. (2) Desta forma, a microbiologia alimentar passou a ser uma ciência no século XX que já evoluiu bastante e está sujeita a constante mudança e atualização. (3)

Há microrganismos que contribuem de forma benéfica para o processamento, segurança e qualidade de determinados produtos alimentares. Contudo, muitos microrganismos estão envolvidos em processos que causam efeitos indesejáveis não só nos alimentos como também na saúde dos consumidores, levando a casos de doenças de origem alimentar. Estas doenças

podem ser agudas ou crónicas, afetando o aparelho digestivo, os sistemas nervoso, circulatório, urinário e respiratório. (4)

Alterações recentes na produção e processamento de alimentos e a constante mudança nos hábitos alimentares do consumidor, são fatores importantes para a ocorrência de infeções transmitidas por alimentos. Muitos microrganismos patogénicos já conhecidos são de grande preocupação atualmente. (5)

Os microrganismos estão naturalmente presentes no solo, na água e no ar e contaminam, naturalmente, as plantas e os animais. A microflora dos alimentos reflete a microflora do ambiente em que as plantas foram cultivadas e onde os animais são criados. O trato gastrointestinal dos animais contém grande número de microrganismos, mas se forem utilizados procedimentos adequados no abate, a contaminação do tecido muscular interior pode ser evitada. Porém, desde o momento do abate, captura ou colheita, os tecidos da superfície e do interior de animais e plantas estão sujeitos a contaminação. (6) Cada etapa do processamento está sujeita a contaminação, desde a matéria prima ao produto final.

A preparação de alimentos seguros adquire importância especial em cantinas escolares, porque qualquer incidente que ocorra nas fases de preparação ou confeção de alimentos pode afetar um número elevado de consumidores, maioritariamente crianças e jovens, pois o seu organismo ainda não está capaz de responder da mesma forma do de um adulto. (7) Os idosos, são outro grupo de risco, estando associado a altas taxas de morbilidade. Desta forma os lares tornam-se um foco fundamental no controlo dos géneros alimentícios. (8)

A presença de microrganismos no alimento não significa necessariamente um risco para o indivíduo quando este ingere uma quantidade pequena desses produtos. Muitos alimentos tornam-se potencialmente perigosos somente quando os princípios de sanitização e higiene são violados. Se o alimento for sujeito a condições que permitam a entrada e/ou crescimento de agentes infeciosos ou tóxicos, pode tornar-se um veículo de transmissão de doenças. (9) As mãos dos manipuladores de alimentos são um dos principais veículos de contaminação dos alimentos. É fundamental que os manipuladores de alimentos cumpram as boas

práticas de higiene pessoal, de forma a prevenirem a contaminação. Pois, estes têm um papel crucial na prevenção de situações que possam pôr em risco a saúde do consumidor. A higiene do manipulador é um contributo decisivo para a higiene final do alimento. (10) Da mesma forma, as superfícies onde ou pelas quais os alimentos passam ou são confecionados, podem ser fontes de contaminação. Estas podem ser contaminadas por manipuladores (as mãos do preparador), utensílios (facas, colheres, taças, etc) ou superfícies (tábuas de corte, bancadas de trabalho). (11)

A vigilância microbiológica dos alimentos prontos a comer corresponde a uma área de grande interesse em saúde pública, cujo objetivo é confirmar a segurança alimentar e atuar na prevenção das doenças de origem alimentar. A implementação de medidas preventivas, tais como o cumprimento de Boas Práticas de Fabrico e a aplicação do Sistema de Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP), contribuem para assegurar a qualidade dos alimentos. As análises microbiológicas, sendo parte integrante destes sistemas (4), fornecem informação acerca da segurança do alimento. (12)

A pesquisa de microrganismos indicadores serve para avaliar a segurança e a qualidade microbiológica dos alimentos. (13) Os microrganismos indicadores, quando presentes podem fornecer informação sobre a ocorrência de contaminação, sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. (14) Segundo a “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF), os indicadores podem ser agrupados em microrganismos que não oferecem risco direto para a saúde e microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto para a saúde. São exemplo de indicadores os coliformes totais, coliformes fecais, *Enterococcus* e enterobactérias. (9) As bactérias patogénicas associadas a doenças transmitidas por alimentos são principalmente *Salmonella spp., Escherichia coli, Listeria monocytogenes.* (2) Em Portugal, a avaliação dos alimentos prontos a consumir (Tabelas 2 e 3) é baseada nos valores guia facultados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). (4)

1.3. Microbiologia das Águas

A água é um componente importante de toda vida e a água potável é essencial para a qualidade de vida dos seres humanos. É suscetível à contaminação por microrganismos e matéria orgânica, entre outros poluentes, independentemente da fonte. (15) A contaminação da água com material fecal é comum em áreas com baixos padrões de higiene e saneamento. A determinação da qualidade microbiológica da água é essencial. (16) Os microrganismos indicadores têm sido usados para avaliar a presença de microrganismos patogénicos presentes na água. (17)

Os microrganismos patogénicos humanos transmitidos pela água incluem bactérias, vírus e protozoários. A maioria dos microrganismos transmitidos pela água geralmente cresce no trato intestinal humano e atinge o exterior através das fezes. A presença de bactérias coliformes na água potável é vista como um indicador de contaminação fecal devido a tratamento inadequado ou incapacidade de manter um resíduo desinfetante no sistema de distribuição de água. (18) As infeções transmitidas pela água matam quase um milhão de pessoas todos os anos. (19)

As águas sujeitas a vigilância são as de consumo humano, águas de piscinas e águas minerais naturais e de nascente e águas balneares. A água destinada ao consumo humano deve apresentar qualidade de modo que, quando ingerida não prejudique a saúde. Tal exige infraestruturas e uma rede de distribuição que se devem encontrar em condições de operação e manutenção abrangida pelo Decreto de Lei 152/2017. Segundo esta legislação, as bactérias pesquisadas nestas águas são microrganismos a 22 ºC e 37 ºC, coliformes, *E. coli*, *Enterococcus* e *Clostridium perfringens.* As águas de piscinas podem ser um risco para a saúde, em particular as águas de piscinas públicas. Podem causar não só doença gastrointestinal, mas também infeções nos olhos, nariz e pele. (20) A legislação vigente para as águas de piscinas é a da Circular Normativa nº 14/DA. Os parâmetros microbiológicos nestas águas são microrganismos a 30 ºC, Coliformes, *E. coli*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus* totais e coagulas positiva. As águas minerais naturais também são controladas. Em Portugal, a legislação aplicada é a

da Portaria nº 1220/2000. As bactérias testadas são microrganismos a 22 ºC e 37 ºC, *E. coli*, *Enterococcus, Pseudomonas aeruginosa* e Esporos *Clostridium* sulfito redutores.

1.4. Parâmetros Microbiológicos

A análise microbiológica dos alimentos, superfícies ou águas é essencial para o controlo, assegurando a qualidade, de forma a evitar riscos para a saúde do ser humano. Os critérios microbiológicos são diretrizes baseadas em princípios estabelecidos internacionalmente, usados para avaliar os níveis microbiológicos.

Um microrganismo indicador apresenta características uniformes e estáveis nos diferentes tipos de águas e alimentos e possui propriedades específicas para uma correta identificação do grupo a que pertence. Idealmente, um microrganismo indicador não é patogénico e o método usado para sua deteção deve ser rápido, barato e com um resultado claro. A presença destes microrganismos também permite fazer uma correlação a determinados agentes patogénicos que possam estar presentes nas amostras de águas e alimentos. Em baixo estão apresentados os microrganismos indicadores e patogénicos que são detetados e quantificados para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos e águas.

1.4.1. Microrganismos a 22 ºC, 30 ºC e 37 ºC

A contagem de microrganismos a 30 ºC reflete a qualidade higiénica do alimento analisado, fornece informações acerca das condições de higiene da matéria-prima, do manipulador ou da superfície onde este foi confecionado. Contudo, uma presença baixa destes não garante que o alimento seja seguro e que não possua agentes patogénicos ou toxinas, nem a contagem alta reflete a presença de bactérias patogénicas. O microrganismo mesófilo é um dos indicadores mais gerais da qualidade dos alimentos (21), indicando a adequação do controle de temperatura e saneamento durante o processamento, transporte e armazenamento e revelando fontes de contaminação durante a fabricação. (22) O número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados num alimento é um

indicador de qualidade do mesmo e é mais comumente utilizado. Indica a eficácia da limpeza, da desinfeção e da temperatura de processamento, transporte e armazenamento. (9)

Na análise microbiológica da água a contagem de microrganismos a 22 ºC e a 37 ºC reflete a microflora total presente na água, sendo a temperatura o fator seletivo. Esta análise engloba um largo espetro de microrganismos heterotróficos. A contagem do número de unidades formadoras de colónias a 22 ºC representa os microrganismos de origem ambiental. As unidades formadoras de colónias (UFC) contabilizadas a 37 ºC correspondem a microrganismos de origem humana ou animal. A principal finalidade desta análise é avaliar a eficácia do tratamento a que a água foi sujeita. (23)

1.4.2. Coliformes e *Escherichia coli*

A contaminação por bactérias do grupo coliformes é frequente. Os coliformes são bactérias que pertencem à família *Enterobacteriaceae.* Este grupo inclui os coliformes totais e os coliformes fecais. Os coliformes são bacilos Gram-negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentam a lactose com produção de ácido e gás, a 37 ºC. Os coliformes totais são bons indicadores de condições de higiene e sanitárias. (24)

Os coliformes são predominantes no intestino e nas fezes, coliformes fecais, mas também podem estar presentes no leite e solo. Não produzem esporos, aeróbios facultativos, fermentadores glicose e lactose, potencialmente patogénicas. (25) Os coliformes fecais estão restritos aos microrganismos capazes de fermentar lactose com produção de gás em 24-48 h a 44,5-45 ºC. (24)

A bactéria *Escherichia coli* pertence ao grupo dos coliformes fecais. *E. coli* é um bastonete, pode apresentar mobilidade quando possui flagelos. As estirpes de *E. coli* podem ser diferenciadas com base nos antigénios somáticos, flagelares e capsulares. O que a distingue dos outros coliformes é a produção de indol a partir do triptofano e a presença da enzima β-glucuronidase. (26) Esta bactéria pode ser encontrada na flora intestinal do Homem e dos animais. Contudo, há estirpes que induzem doenças. (27) A presença de *E. coli* em amostras de alimentos e águas

está associada à contaminação fecal. Em produtos alimentares é indicativo de processamento térmico ineficaz. Nas águas, a presença de *E. coli* indica desinfeção deficiente ou contaminação posterior. (28)

1.4.3. *Enterococcus*

As bactérias do género *Enterococcus* são classificadas como cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos não esporulados. As bactérias deste grupo crescem em ambientes ricos em nutrientes e fazem parte da flora intestinal. (29) Os isolados mais comuns humanos são *E. faecalis* e *E. faecium*. Estas bactérias apresentam resistência a ambientes adversos, podendo causar infeções no trato urinário, intra-abdominal, pélvico e em feridas. (30) A presença de *Enterococcus* intestinais é indicativa de contaminação fecal.

1.4.4. *Clostridium perfringens*

A bactéria *C. perfringens* é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio estrito formador de esporos resistentes a condições de adversas de temperatura e pH. Este microrganismo é causador de doenças no trato intestinal. (31) A presença de *C. perfringens* está associada a ambientes como o solo, o esgoto e é membro da microbiota intestinal normal de animais de sangue quente. (32) Alimentos de origem animal são reservatórios comuns da bactéria e da toxina que produz. (33) Este agente patogénico é um indicador de contaminação hídrica de origem fecal.

1.4.5. Esporos de *Clostridium* sulfito-redutores

As bactérias sulfito-redutoras são microrganismos anaeróbios que produzem esporos resistentes a condições adversas. O género *Clostridium* que pertencente à família *Bacillaceae*, forma esporos imóveis. Estes esporos podem ser de 5 tipos (A, B, C, D e E). Sendo que, na origem da maioria dos problemas de segurança alimentar surge *C. perfringens* tipo A e, em muito menor escala, do tipo C. (33)

1.4.6. *Listeria spp.*

As bactérias do género *Listeria* são bastonetes Gram-positivo, flagelados e móveis, oxidase negativa, anaeróbios facultativos, catalase positiva não formadores de esporos. A *Listeria spp.* está naturalmente presente no meio ambiente, água, solo, vegetação e fezes de animais e seres humanos. A carne e os produtos de aves são os principais veículos de linhagens patogénicas de *L. monocytogenes* para humanos. (34) A presença de outras espécies como *L. ivanovii, L. welshimeri, L. innocua* aponta para maus procedimentos de higiene. (35)

1.4.7. *Listeria monocytogenes*

As infeções por *L. monocytogenes* são uma das principais causas de morte por doenças transmitidas por alimentos. (34) A bactéria é anaeróbia facultativa e não esporulada, Gram-positiva, catalase positiva e beta-hemolítica quando cultivada em ágar sangue. (36) A temperatura ótima para o crescimento da bactéria é entre os 30 ºC e os 37 ºC. A bactéria *L. monocytogenes* está presente em ambientes húmidos, no solo e na vegetação. Encontra-se associada a produtos como vegetais e carne crus. Trata-se de um microrganismo resistente à deterioração pela congelação, desidratação e calor. (37) Os idosos e os imunocomprometidos são particularmente suscetíveis a listeriose. (38)

1.4.8. *Legionella spp*. e *Legionella pneumophila*

As bactérias do género *Legionella* são bacilos Gram-negativo e sem formação de esporos. A espécie *L. pneumophila* é patogénica para o Homem. (39) A infeção por *Legionella spp.* é uma causa de pneumonia que pode ocorrer de forma esporádica e em surtos. (40) Encontra-se principalmente na água e associada a amebas. A bactéria *L. pneumophila* pode estar associada a comunidades complexas de biofilmes. A inalação de aerossóis contaminados pode causar a doença dos legionários. (39)

1.4.9. *Staphilococcus spp*., *Staphylococcus* Coagulase Positiva e *S. aureus*

Os microrganismos do género *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas em forma de cocos. A bactéria *S. aureus* é anaeróbica facultativa e está presente na pele e mucosas de animais, incluindo seres humanos. Esta bactéria é encontrada em amostras de água e de alimentos devido à contaminação ambiental, humana e animal. (41) As espécies *Staphylococcus* coagulase positivas produzem enterotoxinas altamente estáveis ao calor que causam intoxicações alimentares e gastroenterite. (38)

Os testes de identificação bioquímica incluem catalase positiva (todas as espécies patogénicas de *Staphylococcus*), coagulase positiva (para distinguir S. *aureus* de outras espécies de *Staphylococcus*), e fermentação de manitol (positiva para *Staphylococcus epidermidis*). (42,43)

1.4.10. *Salmonella spp.*

As bactérias do género *Salmonella* são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Estas bactérias patogénicas são comuns em alimentos, frequentemente encontrados em carnes. São responsáveis por infeções em humanos e animais. A transmissão acontece através de alimentos contaminados de origem animal, nomeadamente aves (ovos), carne de porco e peixe. (44) A água é também um dos veículos de transmissão. (28)

De acordo com a OMS, *Salmonella* está entre os microrganismos patogénicos que causam maior impacto na população humana e tem sido associado a surtos e casos esporádicos de doenças transmitidas por alimentos. (45) Como a bactéria causa infeções graves é fundamental respeitar rigorosamente as regras de higiene no manuseamento de géneros alimentícios. (46)

1.4.11. *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo, móvel com um único flagelo polar, não esporulados, oxidase e catalase positiva, com

capacidade de desenvolvimento até 42 ºC. Caracterizam-se por evidenciarem capacidade para produzir um pigmento fluorescente azul, a piocianina. Sendo um dos principais causadores de infeções nosocomiais. (47) A bactéria é patogénica oportunista, causa infeções agudas e crónicas. Cresce e multiplica-se na água, no solo, nas plantas e nos animais. (48)

2. Localização do Estágio – Laboratório de Saúde Pública de Aveiro

O Laboratório de Saúde Pública de Aveiro (LSPA) pertence à Administração Regional de Saúde do Centro e está localizado na cidade de Aveiro. A principal atividade exercida pelo laboratório é a vigilância sanitária da qualidade das águas e dos alimentos, atuando na prevenção de doenças de três distritos da Região Centro de Portugal (Aveiro, Coimbra e Viseu).

O laboratório executa testes para clientes do setor público e privado, a instalações como hospitais, centros de saúde, escolas, infantários, lares de idosos, piscinas, termas, entre outras. Os testes realizados incluem técnicas físicas, químicas e microbiológicas.

As amostras são colhidas pelos técnicos de saúde ambiental de cada concelho no âmbito dos programas de vigilância sanitária.

3. Atividade Desenvolvida ao Longo do Estágio

As funções ao longo do estágio, no LSPA, consistiram nas atividades de preparação de meios de cultura e do material, receção e preparação inicial de amostras, análise nos setores de microbiologia de águas e alimentos e interpretação de resultados de acordo com normas e decretos.

3.1. Ensaios Microbiológicos e Apresentação de Resultados

3.1.1. Receção e preparação de amostras

No momento da receção, cada amostra é identificada e segue para o setor correspondente à análise. Os alimentos são processados no setor da microbiologia dos alimentos. As águas são processadas na sala da microbiologia das águas.

A análise dos alimentos exige preparação prévia da amostra em que é preparada uma suspensão base com distribuição homogénea de microrganismos.

A deteção e enumeração dos parâmetros microbiológicos é baseada em métodos tradicionais de identificação microbiológica, método cultural, seguidos por métodos de confirmação bioquímica. Os ensaios para deteção de microrganismos são quantitativos ou qualitativos. O método quantitativo consiste na quantificação dos microrganismos na amostra. O objetivo principal do método qualitativo é indicar a presença ou ausência dum determinado microrganismo na amostra.

Na técnica de incorporação uma porção da amostra é incorporada no meio de cultura, ainda líquido. As colónias são contadas após solidificação e incubação do meio a respetiva temperatura. (49) Na técnica de espalhamento 0,1 mL da amostra é colocada sobre meio de cultura sólido e posteriormente espalhada sobre a superfície, segue de incubação e no fim as colónias desenvolvidas são avaliadas. O método de filtração por membrana é utilizado na análise microbiológica de águas. Uma quantidade de água é passada por uma membrana, que posteriormente é colocada sobre um meio de cultura seletivo, incuba e as colónias são analisada. As colónias típicas são contadas e procede-se às respetivas provas de confirmação (bioquímicas, serológicas e enzimáticas). O número de UFC é estabelecido consoante os mililitros de amostra filtrada. (50)

A análise feita aos alimentos e às águas difere no tipo de microrganismos a pesquisar. A Tabela 1 evidencia as bactérias analisadas em cada setor e o respetivo método, da Organização Internacional de Normalização (ISO), que o laboratório segue. O resultado é inserido no sistema informático.

Tabela 1 Microrganismos testados em cada grupo de tipo de amostra e o método implementado no laboratório

	Parâmetro de pesquisa e quantificação	**Método**
Alimentos	Microrganismos a 30°C	ISO 4833:2003
	Coliformes	ISO 4832: 2006
	E.Coli	ISO 16649-2: 2001
	Listeria spp. e *L. monocytogenes*	ISO 11290-2: 1998
	Salmonella spp.	ISO 6579: 2002
	Staphylococcus coagulase positiva	ISO 6888-1:1999
	Esporos de *Clostridium* sulfito-redutores	NP 2262:1986
Superfícies	Microrganismos a 30°C	ISO 18593:2004 ISO 4833:2003
	Coliformes	ISO 18593:2004 ISO 4832:2006 ISO 16649-2:2001
	E.Coli	ISO 18593:2004 ISO 16649-2:2001
Manipuladores	Microrganismos a 30°C	ISO 18593:2004 ISO 4833:2003
	Coliformes	ISO 18593:2004 ISO 4832:2006
	E.Coli	ISO 18593:2004; ISO 16649-2:2001
	Staphylococcus coagulase positiva	ISO 18593:2004; ISO 6888-1:1999
Água	Microrganismos a 37°C	ISO 6222: 1999
	Microrganismos a 22°C	ISO 6222: 1999
	Enterecocos	ISO 7899-2: 2000
	Clostridium perfringens	ISO 6461-2: 2002
	Coliformes	ISO 9308-1: 2014
	E.Coli	
	Pseudomonas aeruginosas	ISO 16266: 2006
	Staphilococcus Coagulase Positiva	NP 4343: 1998
	Staphilococcus spp.	
	Esporos *Clostridium* sulfito-redutores	NP EN 26461-2: 1994
	Legionella spp. e *L pneumophila*	ISO 11731: 1998

3.1.2. Análise Microbiológica dos Alimentos

Uma variedade de amostras de alimentos é analisada, incluindo alimentos totalmente cozinhados, alimentos mistos e saladas. O alimento ao chegar ao laboratório é triado consoante o grupo a que pertence (Tabela 2). Segue para processamento junto ao bico de Bunsen. O procedimento aplicado na análise está de acordo com o método apresentado na Tabela 1.

Tabela 2 Três grupos pelos quais os alimentos são triados aquando da chegada ao laboratório. (4)

Grupo 1	Refeições / Alimentos totalmente cozinhados
Grupo 2	Refeições cozinhadas com adição de alimentos crus
Grupo 3	Saladas/ Vegetais/ Frutos crus

A partir do alimento é feita a preparação de duas diluições iniciais, uma em que são pesadas 10 gramas do alimento com 90 mL de solução triptona – sal para um saco (1:10), a amostra é homogeneizada num “stomacher”. A partir desta diluição, procede-se a mais diluições decimais, usadas para detetar todos os microrganismos com exceção de *Salmonella* e de *Listeria*. O número de diluições decimais a realizar depende da carga microbiana que é expectável o alimento ter (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4}; 10^{-5}). A outra solução-mãe é com 25 g de alimento juntamente com 225 mL de água peptonada tamponada (peptona), e é usada para detetar *Salmonella*. Os alimentos mistos e as saladas são sujeitas a preparação de solução adicional para a pesquisa de *Listeria,* que consiste na junção de 25 g de amostra com 225 mL de caldo de Fraser demi. A Figura 1 representa esquematicamente o processamento que o alimento segue, a partir da preparação das soluções base.

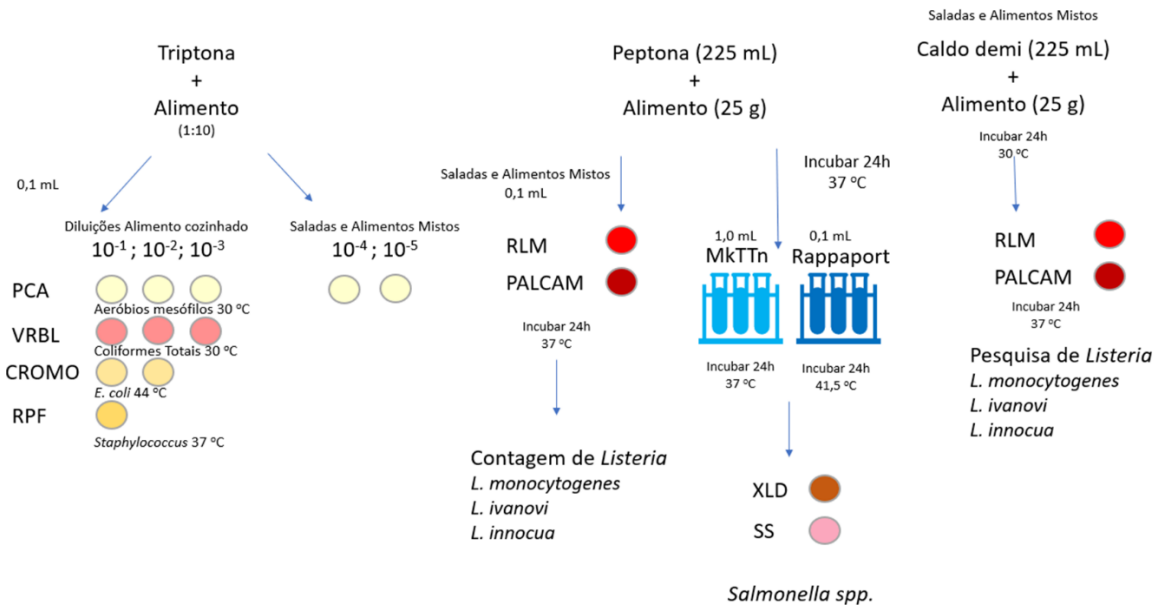

Figura 1 Esquema do procedimento de alimentos recebidos no laboratório.

- Quantificação de microrganismos a 30 ºC

Para a avaliação do número de microrganismos a 30 ºC, indicador do nível de contaminação microbiana nos alimentos. O meio de cultura usado é o ágar de contagem de placas (PCA), é pipetado 1 mL da diluição inicial (10^{-1}) e de cada diluição para a respetiva placa de petri e adicionam-se 15 mL de meio de cultura líquido de PCA (nos alimentos cozinhados as diluições são 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3} e nos alimentos mistos e saladas acrescem as diluições 10^{-4}; 10^{-5}). As placas são incubadas em aerobiose a 30 ºC durante 72 horas. As colónias desenvolvidas são contadas.

- Quantificação de coliformes totais e fecais

Para a quantificação de bactérias coliformes o meio de cultura utilizado é lactose biliar vermelha violeta (VRBL). É transferido 1 mL da solução mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri e é adicionado cerca de 15 mL de meio de cultura líquido VRBL (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}). O meio é inoculado através de movimentos rotativos. Após solidificação são adicionados, aproximadamente, mais 4 mL de meio. As placas são incubadas em aerobiose a 30 ºC para os coliformes totais e a 44 ºC para os coliformes fecais, durante 24 h. Após o tempo de incubação

procede-se à leitura das placas. As colónias com cor vermelha-violeta, por vezes rodeada por uma zona avermelhada de precipitação, são consideradas como bactérias coliformes. Para confirmação de colónias atípicas são selecionadas 5 colónias e repicadas para caldo biliar de lactose verde brilhante. Os tubos são incubados a 30 ºC durante 24 h. As bactérias coliformes são as colónias que mostrem formação de gás.

- Quantificação de *Escherichia coli*

Para *Escherichia coli* o meio de cultura usado ágar cromogénico Triptona Bile X-Glucuoronida (Cromo). É transferido 1 mL da suspensão mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}) com 15 mL de meio de cultura líquido Cromo. O meio com o inóculo é incubado em aerobiose a 44 ºC durante 24 horas. As colónias com cor azul/ verde são contadas uma vez que correspondem a bactéria *E. coli*.

- Quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para *Staphylococcus* coagulase positiva o meio de cultura utilizado, “Baird Parker Agar” com o suplemento de fibrinogénio de plasmático de coelho (RPF). É transferido 1 mL da suspensão mãe para a placa de petri com 15 mL de meio de cultura seletivo. As placas são incubadas em aerobiose a 37ºC durante 48 horas. As colónias características, suspeitas de estafilococos coagulase-positiva, são as de cor preta ou cinzenta, brilhantes, convexas e rodeadas por uma zona clara. Para confirmação adicional, é usado o kit comercial do teste da coagulase. As colónias confirmadas são contadas, correspondem a bactéria *Staphylococcus* coagulase positiva.

- Quantificação de Esporos *Clostridium* sulfito-redutores

Na enumeração de bactérias sulfito – redutoras o meio de cultura utilizado para a enumeração das bactérias sulfito-redutoras é o ágar triptose sulfito cicloserina (TSC). Na quantificação do número de esporos de bactérias sulfito-redutoras a suspensão inicial é submetida a tratamento térmico (banho-maria a 75ºC durante 15 min). É transferido 1 mL da solução mãe e das diluições preparadas paras as respetivas placas de petri. As placas são incubadas em

anaerobiose a 37 ºC durante 48 horas. Após o período de incubação, procede-se à leitura das placas. Consideram-se como colónias de bactérias sulfito-redutoras as que apresentem cor negra e que por vezes estejam rodeadas por uma zona negra.

- Quantificação e deteção de *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes*:
    - Quantificação

A partir da solução preparada com 225 mL de água peptonada e 25 g de alimento, 0,1 mL é transferido para meios de cultura em placa de ágar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA), ágar RAPID'L Mono (RLM), BD PALCAM *Listeria* Agar (PALCAM) e a amostra é espalhada por técnica de espalhamento e a placa é incubada a 37 ºC durante 48h.

- Deteção

Para a pesquisa de *Listeria* é feito um enriquecimento seletivo de 25 g de amostra com 225 mL de caldo Fraser demi que, após homogeneização, é incubado a 30°C durante 24 horas. Após esse tempo 0,1 mL é transferido num tubo de ensaio contendo caldo Fraser e é incubado por mais 24 horas a 37°C (Figura 1). Depois, é feito o isolamento em sementeira, por estria, à superfície em meio ALOA, RLM e/ ou PALCAM e incubou-se a 37°C durante 24 horas.

As unidades formadoras colónias são apresentadas de forma distinta nos meios em que crescem:

ALOA: Consideram-se como colónias suspeitas de *Listeria spp.* as de cor verde-azul, com ou sem halo e como colónias suspeitas de *L. monocytogenes* as de cor verde-azul, rodeadas por um halo opaco.

PALCAM: as colónias *Listeria* aparecem com uma cor cinzenta esverdeada com um halo preto.

RLM: *L. monocytogenes* forma colônias azuis, *L. ivanovii* forma colônias azuis com um halo amarelo outras *Listeria spp.* formam colónias brancas com ou sem um halo amarelo.

A confirmação é feita através da repicagem de 5 colónias características. A placa é incubada a 37 ºC durante 24 horas. Após incubação são realizadas as

seguintes provas de confirmação: teste de catalase, coloração de Gram, teste de hemólise API *Listeria* para a confirmação e identificação da bactéria.

- Deteção de *Salmonella spp.*

Para a pesquisa de *Salmonella* é feito um pré-enriquecimento, em que são pesados 25 g de alimento com 225 mL de água peptonada tamponada num saco a solução é homogeneizada. O saco é incubado a 37 ºC durante 24 horas. É transferido 0,1 mL para um tubo com 10 mL de caldo de enriquecimento Rappaport e, paralelamente, transfere-se 1 mL para um tubo com 10 mL de meio "Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth" (MKTTn). O tubo de Rappaport é incubado a 41,5 ºC, durante 24 h e o tubo de MKTTn a 37 ºC, durante 24 h (Figura 1). A partir dos dois tubos anteriores, a amostras é inoculada, com o auxílio de uma ansa, em duas placas de meio de cultura seletivo ágar desoxicolato de lisina xilose (XLD) e ágar de BD *Salmonella Shigella* (SS). As placas são incubadas em aerobiose a 37 ºC durante 24 h. Após a incubação procede-se à leitura das placas. As colónias são incolores, com centro preto, "olho de peixe" e posteriormente são confirmadas com API.

Os resultados da análise microbiológica dos alimentos são interpretados consoante a Tabela 3. Desta forma, o alimento é classificado como satisfatório, aceitável, não satisfatório ou inaceitável. A avaliação depende das unidades formadoras de colónia por grama de alimento analisado.

Tabela 3 Valores baseados na Tabela dos Valores Guia do INSA (4)

Microrganismo	Grupo de alimentos	Satisfatório (ufc/g)	Aceitável (ufc/g)	Não Satisfatório (ufc/g)	Inaceitável / potencialmente perigoso (ufc/g)
Microrganismos a 30ºC	1 2 3	$\leq 10^2$ $\leq 10^3$ $\leq 10^4$	$>10^2 \leq 10^4$ $>10^3 \leq 10^5$ $>10^4 \leq 10^6$	$>10^4$ $>10^5$ $>10^6$	
Coliformes totais	1 2 3	≤ 10 ≤ 10 $\leq 10^2$	$>10 \leq 10^2$ $>10 \leq 10^3$ $>10^2 \leq 10^4$	$>10^2$ $>10^3$ $>10^4$	
E. coli	1, 2 3	<10 ≤ 10	NA $>10<10^2$	≥ 10 $\geq 10^2$	
Listeria spp.	1, 2 e 3	$<10^2$		$\geq 10^2$	
Anaeróbios sulfito redutores	1, 2 e 3	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3<10^4$	$\geq 10^4$
***Staphylococcus* coagulase positiva**	1, 2 e 3	$<10^2$		$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
Salmonella spp.	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
Listeria monocytogenes	1, 2 e 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $<10^2$	-	$\geq 10^2$

3.1.3. Análises Microbiológicas a Manipuladores e Superfícies

A análise feita a manipuladores e superfícies consiste na realização de zaragatoas às mãos dos manipuladores dos alimentos e às superfícies por onde estes passam durante a confeção. O objetivo é verificar se as metodologias de higienização são eficientes. A suspensão base é o líquido do tubo onde a zaragatoa esteve mergulhada. O tubo é agitado no vórtex. O processamento posterior é idêntico ao dos alimentos. A Figura 2 é a representação esquemática da análise microbiológica feita aos utensílios, superfícies e manipuladores. O cálculo final é feito consoante a superfície analisada, isto é, o resultado é as UFC por 5 utensílios, por 100 cm^2 da superfície ou por 2 mãos.

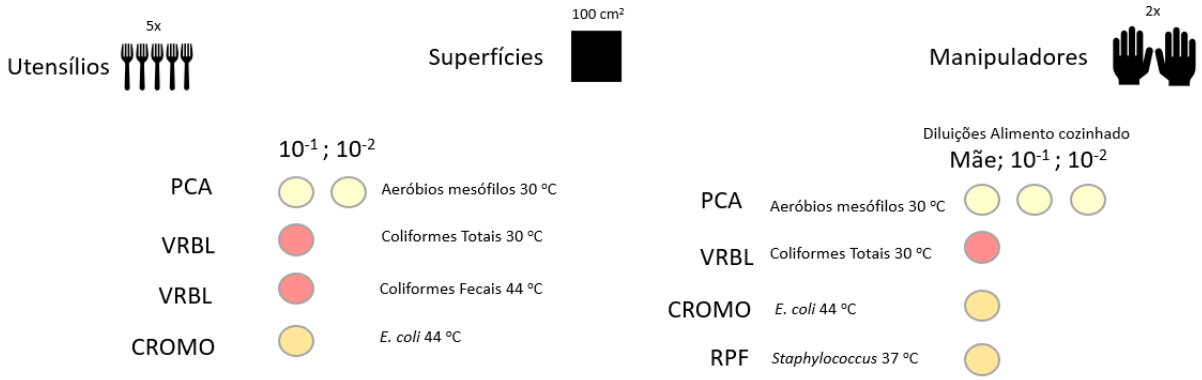

Figura 2 Esquema de processamento de zaragatoas

3.1.4. Análise Microbiológica das Águas

As amostras de água analisadas são águas para consumo humano, águas provenientes de piscinas e spas, águas minerais e termais, torres de arrefecimento. Após a colheita, as amostras são analisadas assim que chegam ao laboratório. Os microrganismos analisados para cada tipo de água estão representados na Tabelas 4, 5 e 6, assim como os respetivos valores limite estabelecidos.

O procedimento aplicado na análise de água está de acordo com o método apresentado na Tabela 1. Nas amostras de água são testados os microrganismos a 22 ºC e a 37 ºC que são analisadas através do método da incorporação de 1 mL

e 0,1 mL de água no meio de cultura líquido que depois de solidificar é incubado a temperatura pretendida. Todas as restantes amostras são tratadas através do método de filtração por membrana. As membranas são colocadas sobre o meio de cultura seletivo a respetivas temperaturas e período de tempo, referido na respetiva ISO.

- Quantificação de microrganismos a 22 e a 37 ºC

O meio de cultura usado é o ágar extrato de levedura (YEA). É pipetado um mililitro de água da amostra para cada placa. As placas são incubadas a 22 ºC por 72 horas e a 37 ºC por 48 horas. O resultado é a contagem das colónias visíveis.

- Quantificação de coliformes e *Escherichia coli*

A quantificação das bactérias coliformes e *E. coli* é feita pelo método de filtração por membrana. A membrana é colocada em meio de cultura ágar Lauril sulfato de membrana (MLSA). A placa é incubada a 37 ºC de 24 h a 48 h. As colónias típicas amarelas ou laranja. Para a confirmação as colónias são repicadas em ágar nutritivo a 37 ºC durante 24 h. É feito o teste da oxidase, se este for negativo as colónias são coliformes totais. Quando é incubado em água peptonada lactosada ou Schubert a 37 ºC, durante 24 h é feito o teste do manitol, se for positivo as colónias são coliformes totais. Quando é incubado em Fiuorocult de 24 h a 48 h e apresenta lactose positiva, fluorescência e indol positivo é *E. coli*.

- Quantificação de *Enterococcus*

Para a quantificação de *Enterococcus* intestinais o meio de cultura usado é ágar SB m- *Enterococcus*, e a incubação é a 44 ºC. As colónias são castanhas, vermelhas ou rosa. Para confirmação a membrana é transferida para ágar bilis esculina. As colónias típicas são negras com halo sendo que, as colónias atípicas são catálase negativa.

- Quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Para a quantificação de *P. aeruginosa* a membrana é colocada no meio de cultura ágar *Pseudomonas* CN. As placas são incubadas a 37 ºC durante 24 h. As colónias são azuis/verdes (piocianina). Quando as colónias aparecem sem

piocianina mas com fluorescência são *P. aeruginosa* presumíveis que, posteriormente, são confirmadas em caldo de acetamida e gelose a 42 ºC (se ambas forem positivas, confirma-se que é *P. aeruginosa*). Às colónias que são castanhas/avermelhadas e sem fluorescência é feita uma subcultura em ágar nutritivo que é incubado a 37 ºC. Para que as colónias suspeitas sejam *P. aeruginosa* os testes de Acetamida, King B e King A a 42 ºC têm de ser positivos.

- Quantificação de *Staphylococcus*

Para *Staphylococcus* o meio de cultura é o ágar "manitol salt". As placas são incubadas a 37 ºC durante 48 h. As colónias suspeitas são amarelas ou brancas com ou sem halo que são re-isoladas num meio não seletivo a 37 ºC durante 24 h. Para confirmação é feita coloração de Gram e se forem cocos Gram-positivos são *Micrococaceae.* É feito o teste da catalase, que tem de ser catalase positiva para *Staphylococcus*. Para confirmação se são aeróbias e aeróbias facultativas para *Staphylococcus* em meio semi-sólido de carne e levedura são incubados a 37 ºC durante 24 h. A coagulase tem de ser positiva para *Staphylococcus* produtores de coagulase. Caso a coagulase seja negativa são *Staphylococcus* não produtores de coagulase.

- Quantificação de *Clostridium perfringens*

Para a quantificação de bactérias *C. perfringens* o meio de cultura é TSC e a placa é incubada a 44 ºC durante 24 h em anaerobiose. As colónias típicas são repicadas para gelose de sangue e incubadas em aerobiose e anaerobiose. As colónias são confirmadas por inoculação em lactose gelatina, no meio de nitrato e através do teste de mobilidade. No teste do nitrato aparece o anel vermelho na redução de Nitratos. Caso não apareça, isto é, seja incolor, é feito o procedimento adicional em que é adicionado o pó de zinco, se permanecer incolor é presumível *C. perfringens.* O teste confirmatório de lactose / gelatina. E tem de ocorrer fermentação de lactose, cor amarela com produção de gás. E para ser *C. perfringens* ocorre liquefação da gelatina.

Para os esporos *Clostridium* sulfito-redutores é feito um pré-tratamento com calor a 75 ºC durante 15 minutos. O meio de cultura é TSC, incubado a 37 ºC. As colónias são negras.

Tabela 4 Parâmetros para água de consumo humano e os valores recomendáveis e limite permitido

	Volume de amostra	Valor Recomendado (UFC)	Valor Limite (UFC)
Microrganismos 22 ºC	1 mL	≤20	Sem alteração anormal
Microrganismos 37 ºC		≤100	
Bactérias coliformes	100 mL	-	0
Escherichia coli		-	0
Enterococcus		-	0
Clostridium perfringens		-	0

Tabela 5 Parâmetros para água de piscinas e os valores recomendável e limite permitido

	Volume de amostra	Valor Recomendado (UFC)	Valor Limite (UFC)
Microrganismos 37 ºC	1 mL	≤100	-
Bactérias coliformes	100 mL	0	10
Escherichia coli		-	0
Enterococcus		-	0
Pseudomonas aeruginosas		-	0
Staphylococcus coagulase positiva		-	0
Nº total de estafilococos		20	-

Tabela 6 Parâmetros para águas minerais e termais e os valores limite permitidos

	Volume de amostra	Valor Limite (se for amostra que tenha contacto com as mucosas) (UFC)	Valor Limite (contacto via externa, duches e banhos) (UFC)
Microrganismos 22 ºC	1 mL	5	20
Microrganismos 37 ºC		20	100
Bactérias coliformes	250 mL	0	0
Escherichia coli		0	0
Enterococcus		0	0
Pseudomonas aeruginosas		0	0
Esporos *Clostridium* sulfito redutores	50 mL	0	0

Os resultados após a análise são apresentados tendo em conta o tipo de água analisado (Tabelas 4, 5 e 6), tendo em conta as unidades formadoras de colónias por o volume da amostra processada.

3.2. Considerações finais da análise microbiológica

A pesquisa de um microrganismo indicador ou mesmo de vários não é apropriado a todas as amostras, portanto, é útil adaptar tanto a nível de microbiologia dos alimentos como das águas. A seleção dos microrganismos tem de ser pensada consoante o contexto, as normas e os padrões nacionais e internacionais. Uma boa análise das amostras é fundamental, uma vez que, resultados incorretos podem ter um impacto negativo na saúde pública.

Em suma, o estágio ofereceu uma oportunidade única para evoluir e adquirir novas competências. Desta forma, permitiu desenvolver competências técnicas e práticas, através da execução de metodologias de rotina em contexto laboratorial, tendo sido possível colocar em prática os conhecimentos adquiridos na Licenciatura em Biologia e no Mestrado em Microbiologia. A adaptação às atividades atribuídas e aos procedimentos internos implementados foi relativamente rápida, o que resultou numa experiência muito enriquecedora.

4. Capítulo 2: Avaliação da Presença de *Legionella* em Sistemas de Água

4.1. Introdução

A água é um bem essencial à vida. O fornecimento seguro de água potável tem sido uma das intervenções a nível de saúde pública mais bem-sucedidas da humanidade e é encarada como um aspeto definidor de um país desenvolvido. (51) Água potável segura e saneamento de águas residuais são componentes críticos da saúde pública. Está documentado que a falta de acesso a serviços básicos resulta em mortes. O planeamento da gestão da água seja no contexto social, cultural ou económico é fundamental. (52) O abastecimento inadequado de água afeta a saúde de forma adversa. (53)

O género *Legionella* pertence à família *Legionellaceae.* As bactérias são aeróbias Gram-negativas, em forma de bastonete, patogénicas transmitidas através de partículas de água em forma de aerossol. (54,55) Apresentam mobilidade por meio de um ou mais flagelos polares ou subpolares. A parede celular de *Legionella spp.* tem uma membrana citoplasmática na superfície interna, uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos (LPS) com antígenos específicos para cada espécie. Contém ácidos gordos de cadeia ramificada, possui um metabolismo não fermentativo e requer L-cisteína e sais de ferro para crescer. Não há evidência definitiva de uma cápsula e não forma esporos. (56,57) Até o momento, cinquenta e oito espécies de *Legionella* foram identificadas e quase metade estão ligadas à doença do legionário (DL), com padrões distintos de incidência geográfica. A espécie *L. pneumophila* é a responsável pela maioria dos casos clínicos. (58) Para além da doença dos legionários, causa febre de Pontiac, uma forma mais leve de infeção. (59) Em 2015, foram notificados 7034 casos de DL na União Europeia. Dos casos confirmados pelo método cultural, 81% pertencia ao serogrupo 1 de *L. pneumophila*. (60)

A bactéria *L. pneumophila* é um microrganismo patogénico oportunista de interesse a nível de saúde pública. A bactéria está presente em ambientes naturais de água doce, como lagos, lagoas e solo húmido. (61) Em sistemas de água

artificiais também é detetada, onde é capaz de proliferar a temperaturas entre os 25 ºC e 43 ºC e sobreviver até 55-60 ºC. (62) A temperatura é um dos fatores principais que influencia a proliferação de *L. pneumophila*, a temperatura ideal de replicação é entre os 32 ºC e 40 ºC. (63,64) Normalmente, as torres de arrefecimento e spas, fontes comuns de grandes surtos da *L. pneumophila*, possuem tais temperaturas. (64) Sistemas de água projetados com temperaturas elevadas são fontes comuns de *Legionella spp*., chuveiros, torres de arrefecimento, sistemas de distribuição de água quente e fria e os sistemas de ar condicionado são frequentemente colonizados por *L. pneumophila.* A este microrganismo estão, normalmente, associados biofilmes. (59,65)

Das infeções transmitidas pela água, as causadas por *Legionella spp.* estão entre as infeções de maior impacto, com um número crescente de casos nos países industrializados, resultado do envelhecimento da população, do aumento do número de indivíduos imunocomprometidos. (59) Em Portugal, a doença do legionário é de declaração obrigatória desde 1999. (66) Neste contexto, a Direção-Geral da Saúde (DGS) coordena, desde 2004, o Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários, que contempla a investigação epidemiológica e ambiental que é da responsabilidade das autoridades de saúde. (67) O laboratório do INSA participa neste programa.

A vigilância dos sistemas de água é fundamentada pelo método cultural (MC). A elevada taxa de *Legionella,* presentes nos sistemas de água corresponde a bactérias viáveis mas não cultiváveis (do inglês "viable but nonculturable") (VBNC). (59) Assim, a deteção desta bactéria com recurso a meios de cultura tem vindo a ser questionada. As condições adversas como o *stress* ambiental, carência nutricional, altas temperaturas e presença de agentes oxidantes, são fatores que proporcionam a entrada de *Legionella spp*., no estado de VBNC. (68) Sendo, desta forma, o método convencional um entrave para a correta deteção deste agente patogénico. As bactérias do género *Legionella* nem sempre crescem em meios de cultura. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi proposta como método de monitorização adicional. (69) Desta forma, a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) tem vindo a ser essencial para complementar a lacuna que existe

em termos de diretrizes nas quais o método convencional se baseia. (70) Os métodos moleculares têm vindo a ser cada vez mais usados no diagnóstico pois, apresentam maior sensibilidade, especificidade e velocidade de deteção. Os genes que codificam o gene do rRNA 5s e 16s e do potencializador de infecciosidade de macrófagos (*mip*) são relevantes para a deteção de *L. pneumonia* em sistemas ambientais. (71,72)

O objetivo deste estudo é monitorizar a qualidade da água, (consumo humano, piscina, entre outras como de fontes ornamentais e torres de refrigeração) proveniente do Distritos de Aveiro, Coimbra e Viseu, Portugal, entre 2017 e 2019, relativamente à presença de *Legionella*, e comparar os resultados obtidos pelos métodos de cultura e RT-PCR. Adicionalmente, também se avaliou a variação do teor de *Legionella* em amostras provenientes de um mesmo local de colheita, vigiado ao longo dos 3 anos.

4.1.1. Antecedentes epidemiológicos (mundo, Europa e Portugal)

A *Legionella spp*. foi descrita pela primeira vez em 1976, depois de um surto de pneumonia grave na Filadélfia, onde, ocorreram 182 casos que resultaram em 29 mortes. Muitas pessoas ficaram doentes, o que desencadeou uma investigação para encontrar a causa. Verificaram que o agente patológico que estava na origem do surto era a bactéria *L. pneumophila*. (73) Posteriormente, detetaram a bactéria em sistema de água potável de Los Angeles, dos Estados Unidos da América, entre 1977 e 1982. Em Londres, no Reino Unido, em 1988, encontraram em torres de arrefecimento. Em Espanha, na cidade de Múrcia, em 2001, identificaram na torre de refrigeração do hospital e posteriormente, em 2006, na cidade de Pamplona também detetaram *Legionella* em torres de refrigeração. (74–78)

Em Portugal, o número de casos notificados, entre 2004 e 2012 varia entre 61 e 140, por ano. Um total de 868 casos foram notificados, com taxa de letalidade de 6%. A maioria dos casos detetados eram homens na faixa etária entre os 40 e 59 anos. (79) Um surto de *L. pneumophila* serogrupo 1, com 403 casos, identificado a 7 de novembro de 2014, em Vila Franca de Xira, Portugal. Na origem do surto

estava o sistema de refrigeração húmido duma fábrica. Dos casos, 60,5% eram do sexo masculino com idade média de 56,1 ± 13,5 anos, sendo o tabagismo apontado com um dos fatores de maior risco. (80) Deste surto, morreram 14 pessoas e a principal fonte de transmissão foi a água em aerossol, contaminado por *L. pneumophila* que, quando inalado, leva a pneumonia atípica. (81)

De acordo com os comunicados efetuados pela DGS, foram identificados em Portugal quatro surtos de doença dos legionários nos últimos anos. Em novembro de 2014 no concelho de Vila Franca de Xira, onde o surto foi considerado como o maior a nível nacional. (82) Em março de 2017 no concelho da Maia: foram identificados cinco casos de doença dos legionários. (comunicados DGS nº C129_01_v3 e nº C129_01_v4). Em novembro de 2017, no concelho de Lisboa, no hospital S. Francisco Xavier, foram confirmados 56 casos de DL, que resultaram em 6 óbitos (comunicado DGS nº C142_07_v1). Em janeiro de 2018 no concelho de Lisboa, no hospital CUF Descobertas, foram confirmados 15 casos de doença dos legionários (comunicado DGS nº C144_07_v1). (83)

A distribuição por idade e sexo dos casos de doença do legionário é semelhante entre os países. A doença é rara em crianças. A maioria dos casos ocorre em pacientes com idade superior a 50 anos (74-91%), o género masculino é o mais afetado. (78)

4.1.2. Ecologia, ambiente e interação com outros microrganismos

A água é o principal reservatório de *Legionella spp.* As bactérias encontram-se presentes em ambientes de água doce, mas também são encontradas no solo. (84,85) *L. pneumophila* multiplica-se a temperaturas entre 25 e 42 °C, com uma temperatura ideal de crescimento de 37 ºC. (86) A maioria dos casos de doença do legionário é atribuída a ambientes aquáticos artificiais, criados pelo Homem, onde a temperatura da água é superior à temperatura ambiente. Ambientes aquáticos termicamente alterados alteram o equilíbrio entre protozoários e bactérias, o que resulta na rápida proliferação do agente patogénico. (87)

As bactérias do género *Legionella* não são organismo de vida livre, parasita ou formam relações comensais com amebas de vida livre, de água doce e do solo. A multiplicação intracelular em protozoários é fundamental para a bactéria. A ameba fornece um nicho para a replicação de *Legionella*, e protege-a de condições ambientais adversas. (87,88)

Nos sistemas de água artificial, constituídos pelo Homem, as bactérias de *Legionella* encontradas estão associadas a biofilmes. (89) Os habitats artificiais são torres de refrigeração e sistemas domésticos de distribuição de água quente e fria. (79) A origem de transmissão de *Legionella* inclui fontes de água potável (fontes, chuveiros e torneiras) e fontes não potáveis, (spas, torres de arrefecimento e condensadores evaporativos). (90) Normalmente, os agentes patogénicos atingem concentrações elevadas nos biofilmes, nas paredes dos tubos e nos sedimentos, principalmente durante períodos de estagnação da água e condições mais quentes. (51) A formação do biofilme consiste na adesão inicial de bactérias ao substrato, seguida da proliferação bacteriana e formação de colónias complexas, o descolamento das mesmas e a colonização a jusante do substrato. (91) O crescimento microbiano em biofilmes e os polímeros extracelulares produzidos pelos microrganismos contribuem para o depósito do biofilme e promovem a adesão de sólidos inorgânicos em suspensão. (92) *L. pneumophila* está presente em ecossistemas microbianos nos quais é nutrida e protegida da remoção física, pela corrente da água, e de agentes antimicrobianos. A bactéria é detetada em números significativos, quando associada a outros microrganismos que colonizem o sedimento, o solo ou o biofilme. (57)

A bactéria *L. pneumophila* tem a capacidade de adaptação a alterações ambientais, diferenciando-se em células replicativas, transmissivas, filamentosas, infeciosas maduras do tipo viável mas não cultivável, formas que diferem na forma de infeção e na resposta às tecnologias de tratamento de água. A bactéria é libertada em aerossóis de várias formas: como células livres, células dentro de fragmentos de biofilme ou células associadas a protozoários de vida livre, cistos, ou vesículas expulsas. (93)

4.1.3. Virulência de *Legionella pneumophila*

As bactérias do género *Legionella* pertencem à família *Legionellaceae*. O género *Legionella* apresenta mais de 58 espécies e mais de 70 serogrupos, sendo a *Legionella pneumophila* a espécie mais comum e causa 90% dos casos de DL, seguida por *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* e *L. longbeachae*. (55,94)

Os protozoários são os hospedeiros naturais de *L. pneumophila*, e os seres humanos são hospedeiros acidentais. (90) A bactéria usa um mecanismo particular para sobreviver nos fagócitos. O vacúolo quando contém *L. pneumophila* (LCV) ignora a via endocítica padrão (lado esquerdo da Figura 3), que distribui o conteúdo para os compartimentos lisossómicos. O LCV, após a captação da bactéria, evita a fusão fagolisossómica, alterando as propriedades da membrana e usando materiais transportados em vesículas originárias do retículo endoplasmático (ER). (61) Interfere com o mecanismo de autofagia do hospedeiro, moldando o metabolismo esfingolípidico do hospedeiro ou a formação de autofagossomas. (90) Os organelos como a mitocôndria e o ribossoma são atraídos. O fagossoma bacteriano é transformado num compartimento do tipo ER, proporcionando um nicho permissivo para a multiplicação de *L. pneumophila*. As proteínas ubiquitinadas e as ATPases vacuolares estão presentes na membrana do LCV. (61) Tal como representado na Figura 3.

A capacidade de replicação de *L. pneumophila* em protozoários é semelhante à capacidade de replicação em macrófagos alveolares, os processos fundamentais são conservados entre os dois hospedeiros. (88)

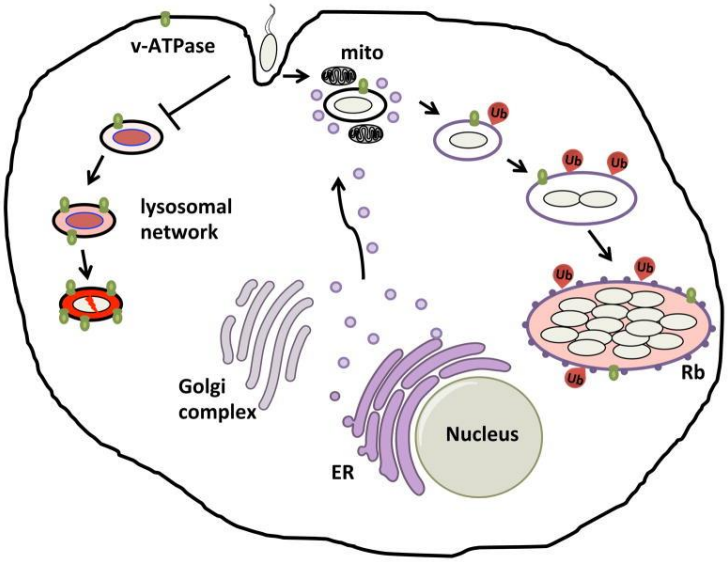

Figura 3 Ciclo de vida intracelular de *L. pneumophila.* (61)

L. pneumophila apresenta um ciclo de vida bifásico alternando, replicativo e transmissivo (Figura 4). O primeiro, consiste na captação da bactéria pela célula hospedeira (protozoários ou macrófagos), por fagocitose. Após a entrada, a bactéria evita a fusão do fagossoma com o lisossoma e começam a proliferar dentro do LCV, rodeado por vesículas (amarelas), ricas em lipídios e proteínas. A carência nutritiva induz a ativação da resposta rigorosa e mudanças morfológicas. As bactérias expressam características transmissivas, como motilidade (flagelos) e tornam-se citotóxicas. As bactérias infeciosas conseguem lisar a membrana do vacúolo e são liberadas para o ambiente extracelular. Quanto às bactérias transmissivas, de vida livre, podem iniciar um novo ciclo ou persistir no ambiente extracelular como biofilme. *L. pneumophila* pode estar associada a biofilmes, seja em habitats naturais de água doce ou artificial. No meio de cultura, também exibe um ciclo de vida bifásico, que imita de perto as formas intracelulares replicativas e transmissivas. (90)

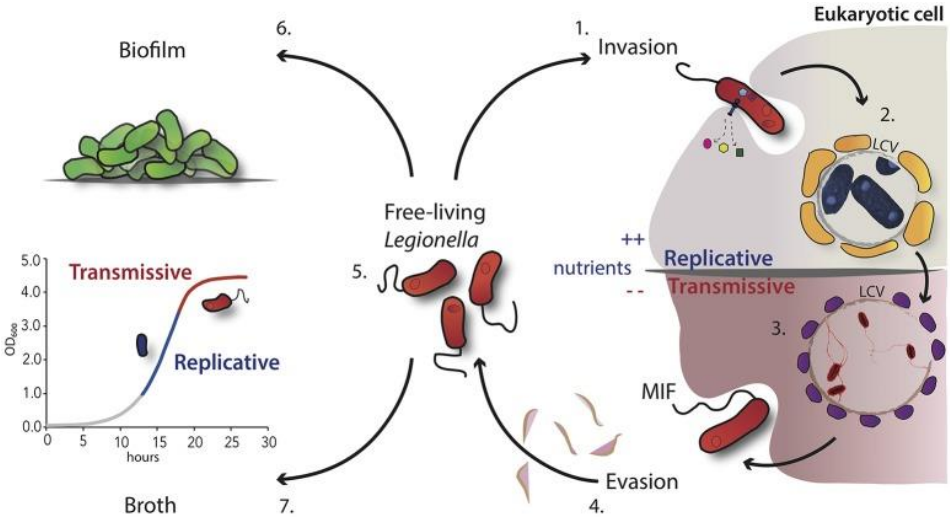

Figura 4 Visão esquemática dos estados morfológicos de *L. pneumophila* durante seu ciclo de crescimento. (90)

L. pneumophila possui três genes importantes para a codificação de fatores de virulência, que são o gene *icm*, *mip* e *ompS*. O primeiro é necessário para a multiplicação intracelular do microrganismo e o segundo tem importância no potencial de infeção de macrófagos, sendo o responsável pelo desenvolvimento da infeção por parte deste microrganismo. Por fim, o gene ompS permite a ligação de *Legionella* aos macrófagos estimulando a fagocitose. (95) O sistema de secreção tipo IV (T4SS) é o mais importante da *Legionella*, sistema de secreção Dot / Icm.

Componentes de *L. pneumophila* Dot / Icm T4SS está envolvido em todos os aspetos da biologia intracelular de *L. pneumophila,* incluindo secretar e translocar várias proteínas efetoras bacterianas, na membrana do vacúolo e no citosol da célula hospedeira. (58)

A principal característica da patogénese de *Legionella* é a capacidade de multiplicação intracelularmente. A bactéria possui muitos determinantes bacterianos tradicionais que são importantes para a patogenicidade incluindo lipopolissacarídeos (LPS), flagelos, pili, um sistema de secreção do tipo II e algumas proteínas da membrana externa. As vesículas da membrana externa, lipoproteína associada a peptidoglicano, fosfolipase A, associada a células principais / lisofosfolipase A, permeabilidade da membrana externa mitocondrial, o gene *mip*, Hsp60 e FeoB. (58) O LPS está localizado na parte externa da membrana externa e é o principal antígeno imunodominante da *Legionella*. Embora LPS e seu núcleo interno Lipido A não funcionem como uma endotoxina clássica, e seu potencial para induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias de células monocíticas humanas é cerca de 1000 vezes menor que a de *Enterobacteriaceae*. (96) O pili tipo IV (T4P) é caracterizado por um domínio aminoterminal hidrofóbico conservado. A função mais comum de T4P para *Legionella* é a adesão aos tecidos hospedeiros, o que facilita a invasão bacteriana. O T4P participa no desenvolvimento e formação de biofilmes, promove a adesão e agregação de *Legionella* nos biofilmes, remodela a arquitetura através da motilidade de contração e facilita a sobrevivência de células bacterianas em condições ambientais variáveis. (97)

Legionella spp. são microrganismos exigentes e a aquisição de ferro é necessária para o crescimento intracelular ou extracelular. Desta forma, o ferro pode estar associado à virulência da bactéria. (58)

Estirpes associadas à doença em seres humanos, *L. pneumophila* do serogrupo 1, compartilham um epítopo comum, conforme revelado pela subtipagem monoclonal. A sobrevivência em aerossol, a temperatura de crescimento, a posse de proteases destrutiva de tecidos e a expressão de flagelos também podem ser fatores importantes de virulência. (57) As estirpes virulentas multiplicar-se dentro

dos fagócitos e são capazes de inibir a fusão dos fagossomas com os lisossomas, as estirpes não virulentas não se multiplicam. (57) Estudos de evolução bacteriana revelaram a ampla contribuição da transferência horizontal de genes (HGT) para a formação de genomas bacterianos. O HGT provavelmente contribui para a evolução da *Legionella* e sua adaptação a diferentes ambientes. (98)

Os sistemas bacterianos de ancoragem, produção de proteínas e substâncias para a formação de biofilmes, são influenciados pela temperatura. *L. pneumophila* produz a proteína Lcl (*Legionella* collagen-like protein) que contribui para a formação de biofilme, e apenas *L. pneumophila* é capaz de autoagregar, o que evidencia o papel da autoagregação na formação de biofilmes de *L. pneumophila*. A proteína Lcl também contribui para a ligação de *L. pneumophila* às amebas, facilitando a infeção dos protozoários. (99) Por outro lado, a *L. pneumophila* excreta um surfactante que é tóxico para outras bactérias do género *Legionella*, o que pode prevenir ou reduzir a presença dessas espécies aquando da presença de *L. pneumophila*. O mesmo surfactante não afeta bactérias pertencentes a outros géneros. (100)

4.1.4. Enquadramento Clínico

A infeção por *Legionella*, denominada de doença do legionário é usualmente apresentada como uma pneumonia atípica grave. Relatada como uma doença rara, leve e autolimitada, não-pneumática, chamada febre de Pontiac. Pacientes com DL, geralmente, apresentam febre alta, calafrios e tosse seca. As características sistémicas são a mialgia, dor de cabeça, diarreia, confusão, insuficiência renal e hiponatremia, também são comuns. (101) A infeção ocorre após inalação de aerossóis contaminados por *L. pneumophila*, que atingem o pulmão e a bactéria é absorvida por macrófagos alveolares, nos quais por replicação ativa provoca uma pneumonia potencialmente fatal, doença do legionário. Como a bactéria *L. pneumophila* é um microrganismo oportunista, pessoas com doenças pulmonares crónicas, idosos, indivíduos imunocomprometidos, pessoas do sexo masculino e fumadores são particularmente suscetíveis a contrair a doença. (88) Nem todas as

espécies de *Legionella* são capazes de causar doenças em humanos, das 58 espécies de *Legionella* identificadas, apenas 20 estão associadas à doença. O serogrupo 1 de *L. pneumophila* é responsável por mais de 85% dos casos de doença dos legionários. (88,90) O período de incubação é entre os 2 e os 10 dias, no entanto, poderá durar até aos 19 dias. (80) A taxa de mortalidade varia entre os 5% e os 30%. (101)

A doença do legionário é comumente acompanhada de manifestações extrapulmonares, como insuficiência renal, encefalopatia e pericardite. Abscessos pulmonares, outras infeções locais e infeções de feridas que envolvem *L. pneumophila* e *L. dumoffi* também são relatadas. (57) As complicações provocadas pela doença são a insuficiência respiratória aguda, desidratação, endocardite, déficits neurológicos, sintomas gastrointestinais, como diarreia, insuficiência renal, falência de múltiplos órgãos e em casos mais graves coma ou morte. (94) As crianças e jovens raramente são afetados, no entanto, qualquer pessoa está sujeita a ser infetada, mesmo as pessoas consideradas saudáveis. (57)

Existe a possibilidade da exposição a *Legionella* não causar doença, mas sim um aumento assintomático dos anticorpos contra *Legionella.* (102) A dose infeciosa, para seres humanos é baixa, um único organismo é suficiente para causar a doença do legionário. As infeções por *Legionella* têm sido frequentemente atribuídas a aerossóis contaminados gerados a distâncias de até 3,2 km. Casos esporádicos em hospitais surgiram do uso da água de lavatórios. (57) Não há evidências de transmissão entre humanos. (58,73) Apenas um único e recente caso desse tipo de transmissão foi relatado até ao momento. (103)

4.1.5. Diagnóstico Laboratorial

Historicamente, os métodos de microbiologia clínica e ambiental têm sido baseados na cultura de células em meios seletivos. Hoje em dia, a situação não é muito diferente nos laboratórios. Não é fácil cultivar *L. pneumophila* em meios de cultura, uma vez que, a bactéria requer formas reduzidas do aminoácido cisteína e ferro para crescer em placa. *L. pneumophila* VBNC e outras formas celulares de difícil cultivo são abundantes na água. (51) A técnica de PCR em tempo real, independente do cultivo, tem vindo a ser usada como método molecular de escolha para a deteção de *Legionella*, pois, teoricamente, apresenta elevada sensibilidade e especificidade, para um diagnóstico rápido e precoce. (78)

As amostras ambientais são concentradas ou diluídas para obter resultados em meios sólidos. As bactérias de fundo devem ser eliminadas antes ou suprimidas durante a cultura primária. (57) Algumas bactérias *L. pneumophila* VBNC têm a capacidade de recuperar a sua capacidade de crescer em meio de cultura quando sujeitas a co-cultura com *Acanthamoeba castellanii*. (104)

4.1.6. Prevenção

Enquadramento legal do tema (105), a doença dos legionários, na Europa inicialmente gerida pela European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLINet), passou, a partir de abril de 2010, a ser coordenada pelo "European Centre for Disease Prevention and Control" (ECDC), com a designação de "European Legionnaires' Disease Surveillance Network" (ELDSNet). Dois centros portugueses cooperam, a DGS na área da Epidemiologia e o INSA na área da microbiologia. Portugal pertence, desde 1986, ao Grupo Europeu para o Estudo de Infeções por *Legionella*, com o objetivo de garantir a vigilância da DL na Europa (www.ewgli.org). A doença faz parte da lista de doenças transmissíveis de declaração obrigatória, desde 1999 (Portaria nº 1071/98, de 31 de dezembro), sendo obrigatório comunicar a rede comunitária, segundo a Decisão da Comissão Europeia nº 2119/98/CE de 24 de setembro de 1998.

Na legislação nacional, a Portaria 1220/2000, de 29 de dezembro, aplicada às águas minerais naturais e às águas de nascente estabelece o limite de UFC de 100 UFC/L para *Legionella spp.* e ausência para *L. pneumophila*. Em relação a unidades termais, a Portaria estabelece que nas águas minerais naturais utilizadas nos estabelecimentos, o limite para a *Legionella spp.* é de 100 UFC/L, e *Legionella pneumophila* deve estar ausente em 1 L de amostra analisada. Todos os anos a DGS, ao abrigo do Decreto-lei nº 142/2004, de 11 de junho (que regula o licenciamento, a organização, o funcionamento e a fiscalização dos estabelecimentos termais), estabelece o programa analítico para as águas minerais naturais utilizadas nos estabelecimentos termais, sendo obrigatória a avaliação de *Legionella spp.* e *L. pneumophila*.

Em 2006 foi implementada a política da qualidade do ar interior, na sequência da transposição para o direito interno da diretiva nº 2002/91/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2002, relativa ao desempenho energético dos edifícios. Foram publicados o Decreto-Lei nº 78/2006, de 4 de Abril, que aprovou o Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios, o Decreto-Lei nº 79/2006, de 4 de Abril, que aprovou o Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios (RSECE) e o Decreto-Lei nº 80/2006, de 4 de Abril, que aprovou o Regulamento das Características de Comportamento Térmico dos Edifícios. De acordo com o ponto 9 do RSECE - DL nº 79/2006, em edifícios com sistemas de climatização em que haja produção de aerossóis, nomeadamente onde haja torres de arrefecimento ou com sistemas de água quente para chuveiros, onde a temperatura seja inferior a 60 ºC, as auditorias da qualidade do ar interior incluem a pesquisa da presença de *Legionella spp.* 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.

A partir de 2010 o EWGLI passou todas as competências para o ECDC. A partir de 2004, foi implementado o Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários, nos termos das Circulares Normativas da Direção-Geral da Saúde nº 05/DEP (notificação clínica e laboratorial de casos) e nº

06/DT (investigação epidemiológica) de 2004, disponível em www.dgs.pt, e de acordo com os requisitos do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica, segundo o Despacho nº 5855/2014, do Diretor-Geral da Saúde, publicado no Diário da República 2ª série, n˚ 85 de 5 de maio de 2014

A Portaria nº 353-A/2013, de 4 de dezembro, tabela I.09 “Condições de referência para os poluentes microbiológicos”, no que respeita à presença e pesquisa de *Legionella spp*. na matriz água, estabelece a concentração inferior a 100 UFC /L, exceto no caso da pesquisa em torres de arrefecimento em que deve verificar-se uma concentração inferior a 1000 UFC/L. A espécie *L. pneumophila* deve estar ausente.

Em unidades de saúde, foi emitida em 15 de novembro de 2017, pela DGS, a Orientação 024/2017, quanto à matéria de prevenção e controlo ambiental da bactéria *Legionella*. Em dezembro do mesmo ano foi aprovada e publicada a 22 janeiro de 2018 a resolução nº 15/2018, que estabelece medidas que visam a prevenção da doença dos legionários, com normas da qualidade do ar de edifícios climatizados para além da isenção do pagamento de taxas moderadoras, em casos de surtos de infeção por *Legionella spp*.

Em agosto de 2018 foi publicada a Lei nº 52/2018, que “Estabelece o regime de prevenção e controlo da doença dos legionários e procede à quinta alteração ao Decreto-Lei nº 118/2013”. A lei é aplicada a todos os sectores de atividade, que tenham 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. A lei determina a elaboração de um plano de prevenção e controlo de *Legionella*. O plano deve ser elaborado com base numa análise de risco, em que são identificados os pontos críticos de proliferação de *Legionella*, estabelece programas de manutenção, limpeza, desinfeção, monitorização, tratamento e deve conter os registos dos mesmos.

Os sistemas de água quente de muitos hospitais estão contaminados e colonizados por *Legionella*. A mesma estirpe pode ser identificada por períodos prolongados em pontos de amostragem específicos. Estirpes diferentes podem colonizar partes diferentes do mesmo edifício. (57) É possível reduzir o risco de

infeção por *Legionella* com boa manutenção, desinfeção e vigilância à água. Os proprietários de humidificadores e spas domésticos devem seguir as instruções do fabricante para manutenção e desinfeção. (101) A prevenção de um crescimento bacteriano significativo é alcançada mantendo a água fria. O fornecimento principal de água potável pode ser mantido livre de níveis significativos de *Legionella* por cloro: a concentração de 0,2 mg de cloro livre manterá os níveis abaixo de 1 UFC / 100 ml. Os baixos níveis de *Legionella spp.* encontrados em abastecimentos públicos de água nunca foram mostrados como um risco para a saúde. O cloro residual da rede de abastecimento não impede o crescimento desses organismos. Medidas adicionais são necessárias que não permitam o crescimento bacteriano (impedir a estagnação da água e a manutenção de temperaturas que não promovam o crescimento bacteriano). (57)

4.1.7. Tratamento

Para a diminuição da proliferação de *Legionella pneumophila* são adotadas medidas de prevenção, controlo físico-químico e microbiológico da água para manter os sistemas de água isentos do agente patogénico. A correta manutenção, limpeza e desinfeção de sistemas e de equipamentos é essencial. Os processos para prevenir e/ou eliminar a bactéria *Legionella*, nas redes prediais, são físicos e/ou químicos. Os processos físicos, consistem na regulação da temperatura da água (70 ºC e 80 ºC com lavagem dos locais distais), produção de vapor, radiação ultravioleta e filtros terminais amovíveis (impulsos eletromagnéticos). Os processos químicos, passam pelo uso de cloro e derivados, bromo, peróxido de hidrogénio, ozono, ionização do cobre e da prata. (105) O uso de água estéril para encher e enxaguar os dispositivos de nebulização e fazer manutenção regular às torres de arrefecimento. (94) A hipercloração da água nem sempre é eficaz. A *Legionella* é resistente ao cloro e o cloro quando sujeito a temperaturas mais altas decompõe-se. Sendo a luz ultravioleta uma alternativa uma vez que mata *Legionella.* (105) A descontaminação das fontes ambientais identificadas é essencial para a prevenção. A Tabela 7 apresenta medidas propostas consoante a quantificação de *Legionella spp.* detetada.

Tabela 7 Ações propostas consoante a contagem de *Legionella.* (105)

Contagem de *Legionella spp.* (UCF/L)	**Ação Proposta**
< 100	• Manter a vigilância
> 100 < 1000	• Vigilância reforçada, assegurar que parâmetros como o pH, níveis de biocida estão dentro dos limites • Proceder à desinfeção, limpeza e esvaziamento • Rever as medidas de controlo • Efetuar uma nova análise
> 1000	• Encerramento das instalações ao público • Desinfeção com cloro livre 50 mg/L • Drenagem, limpeza e desinfeção • Implementar medidas corretivas • Efetuar uma nova análise • Mantero encerramento até a deteção de ausência de *Legionella*

A nível clínico, para o tratamento devem ser escolhidos antibióticos que possam entrar efetivamente na célula, pois a *Legionella* é um microrganismo intracelular. As classes de antibióticos recomendada, inclui fluoroquinolonas, macrólidos e rifampicina. (94) As recomendações atuais para tratar comunidade atípica não diagnosticada ou pneumonia adquirida institucional incluem antibióticos eficazes contra *Legionella*, como eritromicina, ciprofloxacina e rifampicina. (101) A imunização funciona em animais experimentais, ainda não foi testada em humanos. (106)

Os surtos e casos únicos da doença dos legionários relatados foram atribuídos, às torres de arrefecimento e aos condensadores evaporativos dos sistemas de ar condicionado, fontes decorativas, nebulizadores ultrassónicos, humidificadores de ambiente, banheiras de hidromassagem e spa quentes, água quente de torneiras e chuveiros e dispositivos médicos contendo água (dispositivos de cuidados respiratórios). (57) Para evitar a infeção por *Legionella*, os hospitais portugueses realizam testes frequentes para pesquisa da bactéria às fontes de abastecimento de água. (94)

4.2. Material e Métodos

Neste estudo, são analisados resultados da monitorização de *Legionella* em águas de três distritos da Região Centro de Portugal. As análises efetuadas foram requisitadas por entidades, particulares e públicas. A confidencialidade na identificação das instituições é preservada.

Os dados microbiológicos analisados referem-se ao período de 2017 a 2019. Ao longo dos três anos, foram analisadas 3352 amostras de água para a pesquisa de *Legionella*, provenientes de diferentes fontes ambientais aquáticas naturais e de sistemas artificiais. Um mesmo edifício/instituição foi controlado durante os três anos e foram avaliadas 57 amostras de água de consumo humano.

As amostras de água são colhidas, por técnicos de saúde em frascos estéreis de 1000 ml, de acordo com ISO 19458:2006, em pontos de amostragem criteriosamente selecionados de acordo com os pontos críticos do sistema.

O processamento das amostras é realizado de acordo com duas normas para análise de *Legionella*, a ISO 11731 “Water quality - Enumeration of *Legionella*” e ISO/TS 12869 “Water quality -- Detection and quantification of *Legionella spp.* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)”. A ISO 11731:2017 substitui as ISO 11731:1998 e ISO 11731-2:2004 e descreve o método cultural de deteção de *Legionella*.

4.2.1. Método cultural segundo a ISO 11731 e prNP4422:2002

O isolamento de *Legionella* a partir de amostras de água é realizado pelo método dependente do cultivo, de acordo com o método da Norma Internacional ISO 11731:1998 (Qualidade da Água - Deteção e Enumeração de *Legionella*), com base no procedimento de filtração e cultura de bactérias em meio seletivo “Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide” (GVPC).

O procedimento consiste na filtração de 1000 mL de água através duma membrana de nylon com diâmetro de poro de 0,45 µm. A membrana é lavada em 10 mL de solução de Ringer (1/40). O filtrado é agitado durante 30 minutos a 4500 rpm. O sobrenadante é retirado, deixando apenas ± 1 mL de amostra (tubo 1). Daqui, são transferidos 0,2 mL de amostra para tratamento térmico (tubo 2), que consiste na inibição seletiva de bactérias não *Legionella*, o concentrado é tratado a 50 ± 1 ºC por 30 ± 1 minutos. Igualmente, são transferidos 0,2 mL de amostra (tubo 3) para tratamento com ácido, 0,2 mL atuam durante 5 minútos.

De cada suspensão (tubos 1, 2 e 3) 0,1 ml é semeado numa placa de Petri de ágar GVPC. As placas inoculadas são então incubadas por 10 dias a 36 ± 2 ºC em condições de atmosfera humidificada.

As colónias lisas cor amarelada ou às vezes verde-amarelada ou branca acinzentada são contadas como *Legionella* presuntivas e são confirmadas em placas de ágar BCYE com e sem L-cisteína. (107) A cisteína é um aminoácido essencial para o crescimento de *Legionella*. As colónias que crescerem em meio com o aminoácido são confirmadas por aglutinação em latex (com anticorpos que aglutinam na presença de antigénios específicos da parede celular da *Legionella*) em caso de aglutinação positiva são consideradas, conforme as instruções do kit em uso: *Legionella spp*. ou *L. pneumophila* (serogrupo 1 ou serogrupo 2-14).

O método cultural permite a deteção e a quantificação de células viáveis e cultiváveis de *Legionella*, em amostras de água bem como a identificação do serogrupo de *L. pneumophila*. Os resultados são expressos em número de UFC por volume analisado / filtrado. Se não houver desenvolvimento de colónias, a expressão de resultado é “Não Detetada” por volume filtrado, com limite de deteção (LD = 10 UFC /L), que corresponde a uma colónia em placa. O método é demorado, uma vez que, o período de incubação da amostra é de 10 a 14 dias o que significa que o resultado só está disponível após este tempo.

4.2.2. PCR em Tempo Real (RT-PCR) pela ISO/TS 12869:2012

A ISO/TS 12869:2012 foi elaborada com base na Norma Francesa NF T90-471 de 2006 – “Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou

Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)", anulada em 2010, passando a "Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR)".

A técnica de PCR Real Time (RT-PCR), método independente do cultivo, segundo a ISO/TS 12869:2012, é um método quantitativo. Os resultados são expressos em unidades genómicas por volume de amostra filtrado (UG/Volume filtrado). O cálculo do limite de deteção (LD) do método para cada matriz, tendo em conta os potenciais interferentes presentes na amostra, que podem inibir a reação de amplificação, o que faz com que o método seja sensível e específico na quantificação de DNA (iQ-Check *Legionella* Real-Time PCR Kits, Bio-Rad). O LD corresponde ao menor número de unidades genómicas que geram um resultado positivo "Detetada", sendo este valor 160 UG/L. Os resultados inferiores ao LD, pela técnica RT-PCR são equivalentes aos resultados "Não Detetada". Este método implica a amplificação de DNA a partir de primers específicos para o DNA alvo. O método é rápido e as amostras são analisadas em poucas horas. Permite a pesquisa de microrganismos viáveis, microrganismos viáveis mas não cultiváveis e/ ou inviáveis, através da deteção de presença de DNA. A técnica permite deteção rápida da presença de DNA de *Legionella spp.* não pneumophila e/ou de *L. pneumophila*. Os resultados analíticos são obtidos em menos de 12 h. A técnica molecular também é usado para quantificar as bactérias. Sendo o limite de quantificação 608 UG/L.

O procedimento consiste na junção de 460 µL de água isenta de DNA com 40 µL reagente que elimina DNA livre (R1) e incuba a 37 ºC durante 30 minutos. Através de membrana de policarbonato, são filtrados 100 mL (de 1 L de água). A membrana é colocada em 0,5 mL de R1 e incubada num bloco de aquecimento agitador a 95 ºC durante 15 minutos a 1300 rpm. A solução é centrifugada a 900 g durante 3 minutos (DNA presente nos 800 µL de sobrenadante). 500 µL do sobrenadante é passado pela coluna de purificação e de seguida centrifugado a 6000 g, durante 10 minutos. São adicionados 100 µL de tampão de eluição. A solução é sujeita a 1000 g durante 3 min e são obtidos 100 µL de DNA purificado,

dos quais apenas 5 µL são usados para análise por RT-PCR. A técnica passa pela utilização de sondas fluorescentes, um reagente de amplificação, um controlo negativo de PCR e um controlo positivo para PCR.

4.2.3. Organização dos resultados

Os resultados das análises microbiológicas, foram organizados por anos e de acordo com o tipo de amostra. consoante a proveniência da água. Existem 3 grupos: água de consumo humano (ACH), água de piscina (AP) e outras águas (águas mineral natural e de nascente, entra as quais água de captação e utilizadas para ingestão e contacto mucosas, fontes ornamentais e torres de refrigeração).

Os dados foram organizados na base de dados Microsoft Excel.

4.3. Resultados

Entre 2017 e 2019 foram analisadas 3352 amostras para a pesquisa e quantificação de *Legionella pneumophila*, decorrentes de inquéritos epidemiológicos, vigilância sanitária e particulares. As amostras são águas de consumo humano (ACH), águas de piscinas (AP) e outras águas (O) que são águas minerais naturais e de nascente, de captação e utilizadas para ingestão e de contacto com mucosas, fontes ornamentais e torres de refrigeração. As águas foram analisadas em simultâneo pelo método dependente do cultivo e pelo método molecular independentes do cultivo, RT-PCR.

Em 2017, 984 amostras de água foram analisadas. Tal como é visível na Figura 5 através do método cultural foram detetadas 71 bactérias de *Legionella spp.* das quais 53 eram *L. pneumophila*. A percentagem relativamente à deteção de *L. pneumophila* é de 5,39%. Pela técnica de PCR, detetaram *L. pneumophila*, em 156 amostras, corresponde a 15,85% (Tabela 1). Pelo método cultural, 96,2% das águas positivas para *L. pneumophila* correspondem a águas de consumo humano, as restantes são de outro tipo de águas. A bactéria não foi detetada em águas de piscina pelo método dependente do cultivo. Pela técnica de RT-PCR, 89,10% das amostras são de águas de consumo humano, 5,13% correspondem a águas de piscinas e 5,77% a outro tipo de águas. A comparação dos resultados é feita na Figura 6.

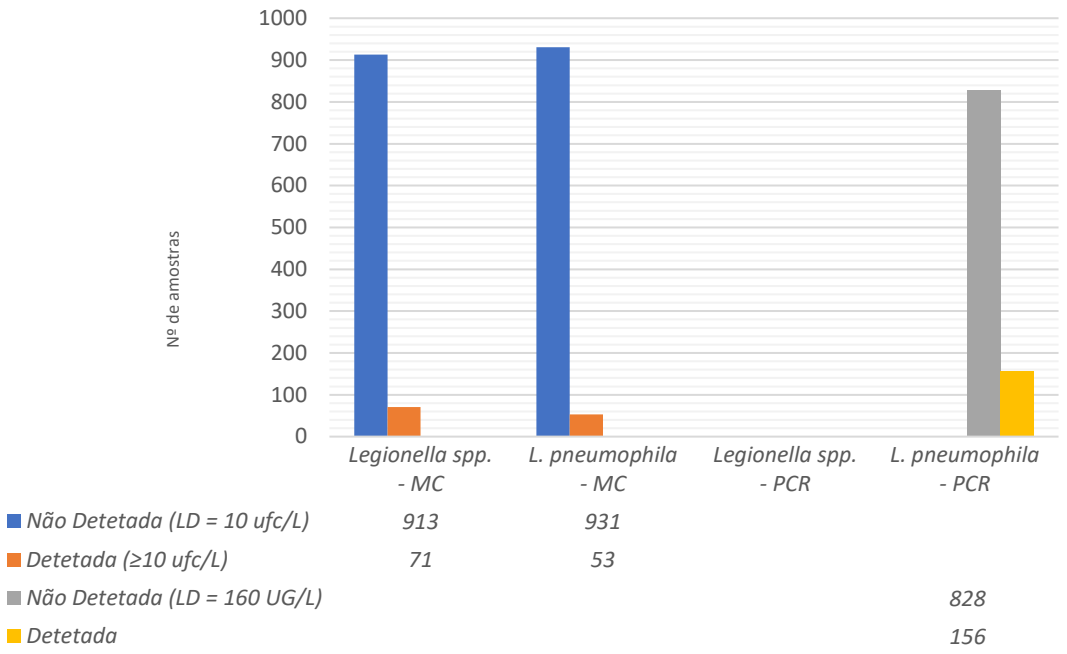

Figura 5: 2017 - Pesquisa e Quantificação de *Legionella spp.* e *L. pneumophila* por MC (ufc/L) e PCR (UG/L).

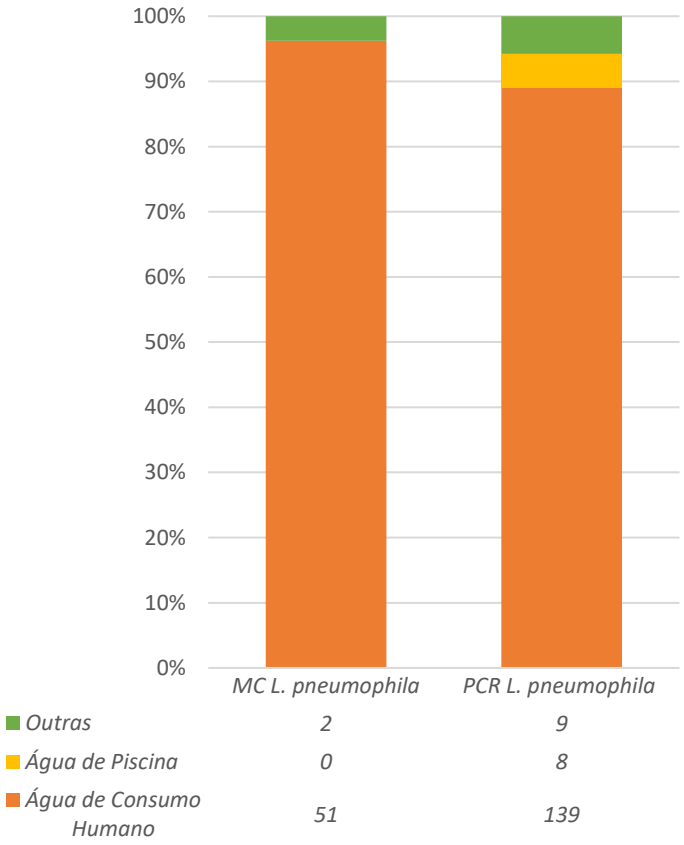

Figura 6 Distribuição por tipo amostras positivas para *L. pneumophila* - 53 amostras positivas por MC e 156 amostras positivas por PCR.

Em 2018, foram processadas 1126 amostras pelos dois métodos. Pelo método cultural em 99 amostras foi detetada *Legionella spp*. das quais 69 eram *L. pneumophila.* A percentagem relativamente à deteção de *L. pneumophila* corresponde a 6,13% (Figura 7). Pelo métodos molecular independente do cultivo, 158 amostras tinham o agente patogénico, o que corresponde a 14,03% das amostras.

A Figura 7 apresenta, adicionalmente, resultados da pesquisa de *Legionella spp.* (outras espécies de *Legionella* sem especificação*),* por RT-PCR. Em 2018, foram analisadas 147 amostras para *Legionella spp.* A bactéria foi detetada em 139 casos, o que corresponde a 94,56% das amostras de água testadas.

Na Figura 8 é visível a comparação entre os tipos de amostras em que foi detetada a *L. pneumophila*. Pelo método cultural, das 69 amostras, 62 (89,85%) correspondem a águas de consumo humano, 5 (7,25%) a águas de piscina e 2 (2,90%) a restantes tipos. Pela técnica de RT-PCR, das 158 detetadas, 141 (89,24%) são águas de consumo humano, 13 (8,23%) águas de piscinas e 4 (2,53%) a outras águas. A variação quanto ao tipo de águas não foi significativa, foi semelhante entre ambos os métodos tendo em conta a percentagem.

Em duas amostras das 1126 analisadas (T18A1; T18A2), colhidas no mesmo ponto de amostragem, *L. pneumophila* foi detetada apenas pelo método dependente do cultivo. Os resultados pela técnica RT-PCR ficaram abaixo do limite de deteção (160 UG/L). As amostras pertencem a outras águas, que correspondem a águas termais.

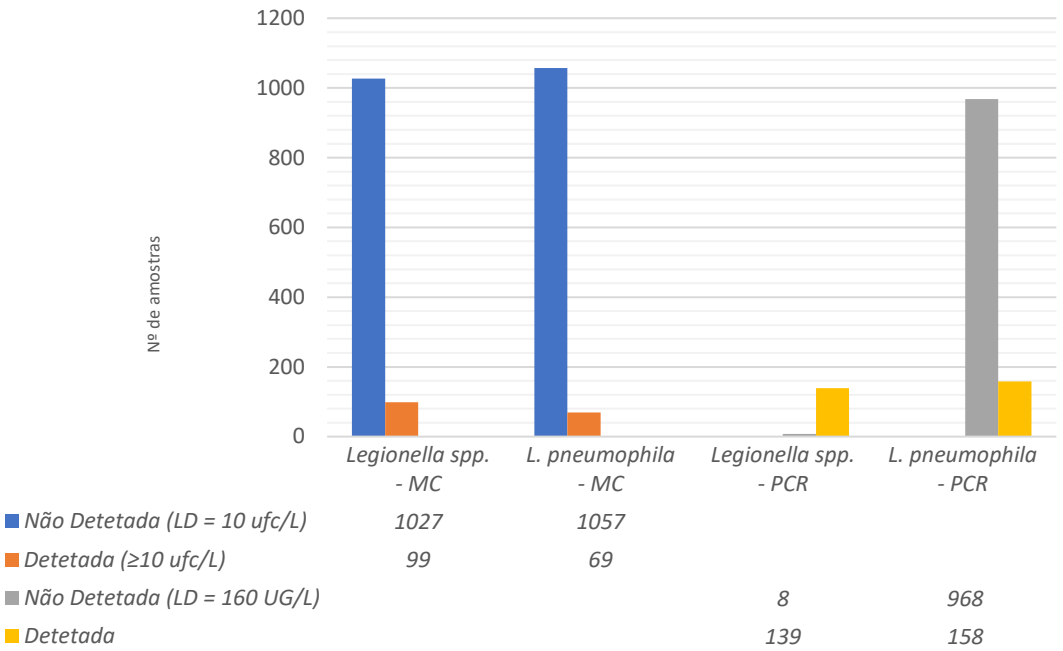

Figura 7 2018 - Pesquisa e Quantificação de *Legionella spp.* e *L. pneumophila* por MC (UFC/L) e PCR (UG/L).

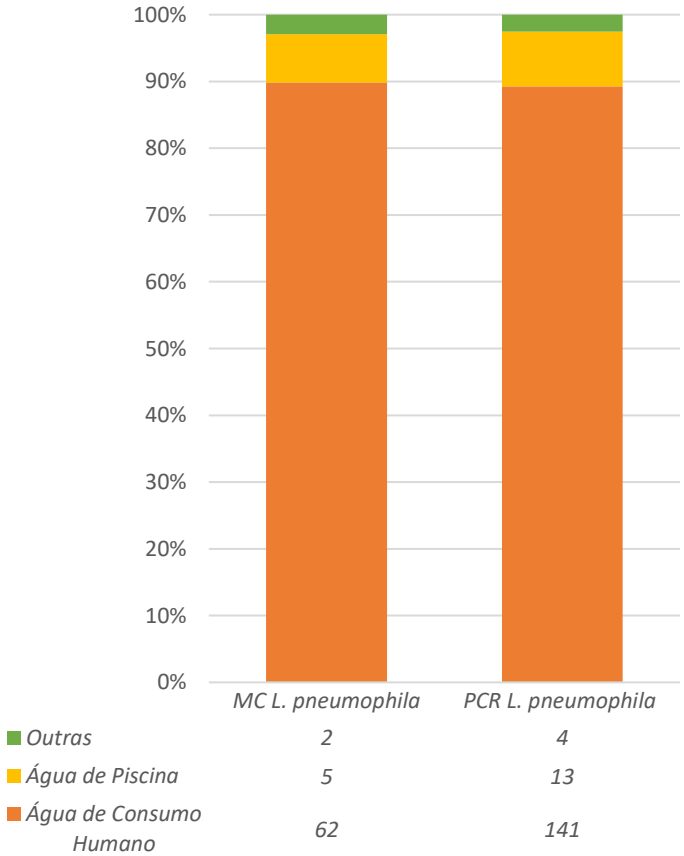

Figura 8 Distribuição por tipo amostras positivas para *L. pneumophila* – 69 amostras positivas por MC e 158 amostras positivas por PCR.

Em 2019, foram analisadas 1242 amostras, pelos dois métodos. Pelo método cultural a *Legionella spp.* foi detetada em 60 amostras, das quais 48 eram *L. pneumophila*. A percentagem relativamente à deteção de *L. pneumophila* corresponde a 3,86%. Pela técnica de RT-PCR, a bactéria estava presente em 150 amostras (Figura 9), o que representa 12,08%.

A Figura 9 apresenta, adicionalmente, resultados da pesquisa de *Legionella spp.*, por RT-PCR. Em 2019, foram analisadas 379 amostras para *Legionella spp*. A bactéria foi detetada em 294 casos, o que corresponde a 77,57% das amostras de água testadas para outras espécies de *Legionella* sem especificação.

Da análise da Figura 10 é possível fazer uma comparação entre os tipos de amostras em que foi detetada a *L. pneumophila.* Pelo método cultural, das 48 amostras positivas 43 (89,58%) corresponderam a águas de consumo humano, 4 (8,33%) a águas de piscinas e 1 a outro tipo de água. Pela técnica de RT-PCR das 150 amostras positivas, 127 (84,67%) corresponderam a águas de consumo humano, 9 (6,00%) a águas de piscinas e 14 (9,33%) a outro tipo de águas 9,33% de amostras.

Das 1242 amostras analisadas, na H19A1 a *L. pneumophila* foi detetada apenas pelo método cultural. O resultado pela técnica RT-PCR, próximo do limite de deteção (160 UG/L), foi dado como “Não Detetada”. A amostra corresponde a uma amostra de água de consumo humano.

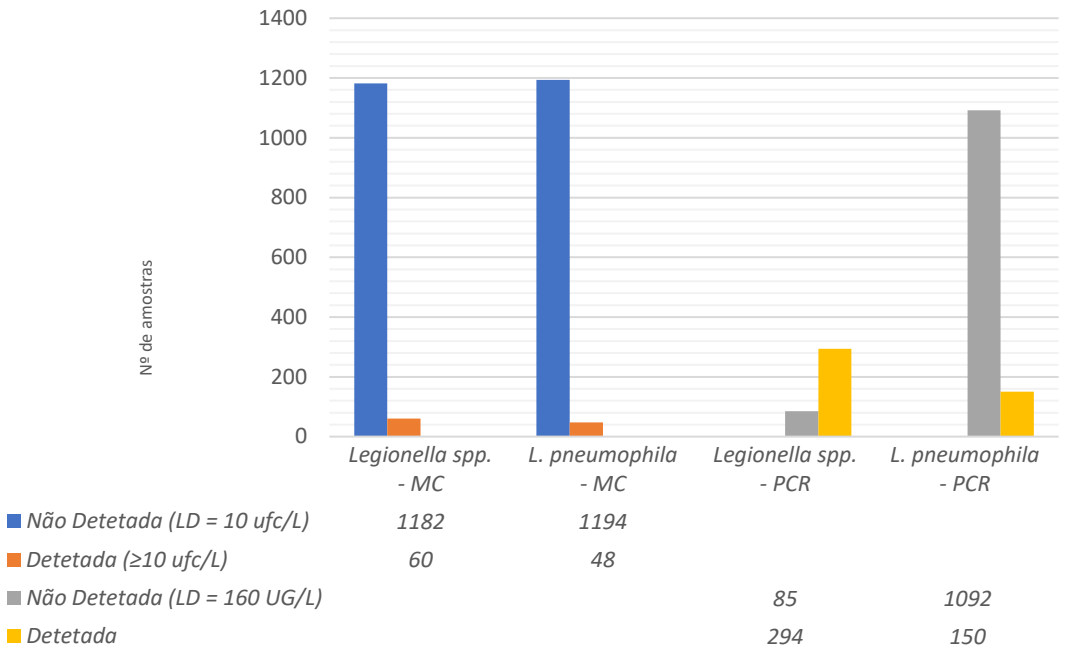

Figura 9 2019 - Pesquisa e Quantificação de *Legionella spp.* e *L. pneumophila* por MC (ufc/L) e PCR (UG/L)

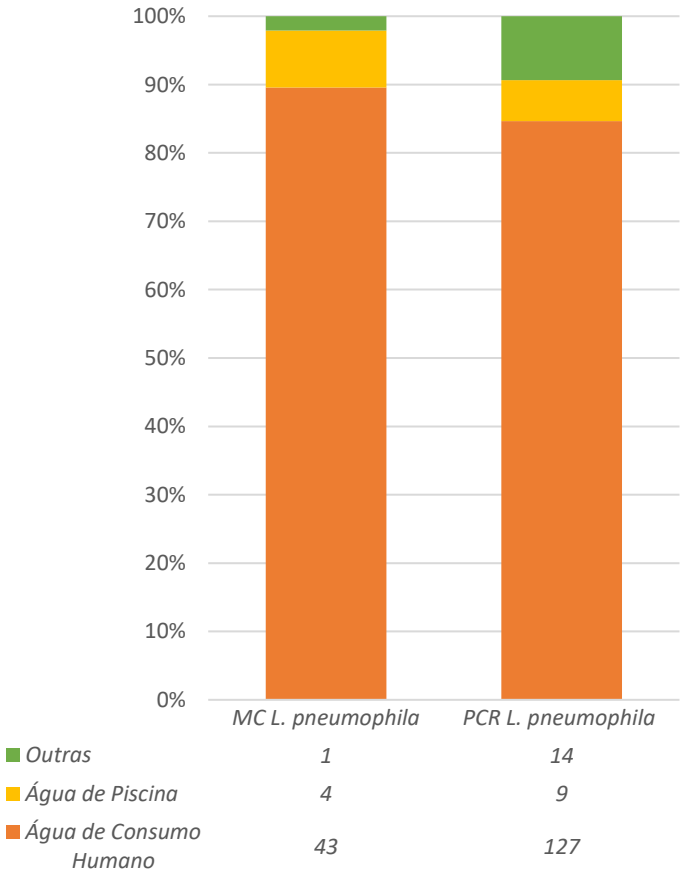

Figura 10 Distribuição por tipo amostras positivas para *L. pneumophila* - 48 amostras positivas por MC e 150 amostras positivas por PCR

Resumidamente, entre 2017 e 2019, forram analisadas 3352 amostras para *L. pneumophila* (Tabela 9), em média 1117 amostras analisadas foram analisadas por ano. Pelo método cultural, *L. pneumophila* foi detetada em 170 amostras, o que corresponde a 5,07%. Pela técnica de RT-PCR, a mesma bactéria foi detetada em 464 amostras. Uma análise dos resultados positivos obtidos ao longo dos 3 anos revela que pelo método dependente do cultivo, *L. pneumophila* não foi detetada em 64% das 464 amostras positivas pela PCR em tempo real. A coerência na deteção de resultados entre os dois métodos corresponde em 36% das amostras.

A Tabela 8 revela que, pela técnica de RT-PCR, a *L. pneumophila* em média foi detetada em 13,88% enquanto que o método cultural em 5,10%. É possível verificar que em média o método molecular independente do cultivo conseguiu detetar a bactéria em mais 8,77% das amostras do que o método dependente do cultivo.

O maior número de amostras analisadas para a deteção de *Legionella* correspondeu ao ano de 2019. A percentagem de amostras positivas para *L. pneumophila*, tendo em conta a média dos três anos, foi a mais baixa tanto pelo método cultural como pela RT-PCR (3,86% e 12,08%, respetivamente).

O ano de 2018 correspondeu ao ano em que foram detetadas mais amostras positivas para *L. pneumophila* pelo método cultural e o ano de 2017 apresentou a maior percentagem de *L. pneumophila* detetadas pela técnica de RT-PCR.

Tabela 8 Número de amostras positivas para *L. pneumophila* em função das amostras totais segundo PCR e MC.

Ano	**Total de amostras processadas para *Legionella***	**Nº de amostras positivas para *L. pneumophila***				
		MC	Percentagem	RT-PCR	Percentagem	↑ RT-PCR
2017	984	53	5,39%	156	15,85%	10,47%
2018	1126	69	6,13%	158	14,03%	7,90%
2019	1242	48	3,86%	150	12,08%	8,21%
Total	3352	170	5,07%	464	13,84%	
Média	1117	57	5,10%	155	13,88%	8,77%

4.3.1. Análise da monitorização num mesmo local de amostragem (2017-2019).

Os resultados provenientes dum ponto de amostragem acompanhado ao longo de 3 anos foram analisados (Tabela 2). As amostras de água de consumo humano foram colhidas em diferentes compartimentos de um edifício. No total foram recolhidas 57 amostras. O local foi vigiado, entre 3 a 4 vezes ao ano. Em 2017, forma analisadas 23 amostras, no ano de 2018 forma analisadas 14 amostras e em 2019, a vigilância continuou e foram analisadas 20 amostras de água desse local.

Das amostras de 2017, a quantificação de *L. pneumophila* não foi feita em todas as amostras onde a bactéria foi detetada por RT-PCR. Das 23 amostras examinadas, 3 (L17A7, L17B1 e L17B3) foram positivas para a presença de *L. pneumophila* pelo método cultural, o que corresponde a 13,04% e por RT-PCR, a bactéria foi detetada em 12 amostras o que corresponde a 52,17%.

Em 2018, foram analisadas 14 amostras de água. Há concordância nos resultados, entre os dois métodos. Nas amostras onde a *L. pneumophila* é detetada por PCR a presença da bactéria é verificada pelo método cultural. A bactéria patogénica estava presente em 10 amostras, representa 71,43% das amostras desse ano. Pelo método dependente do cultivo, 3 amostras apresentaram resultado de $>3.00x10^3$ UFC/L. As amostras corresponderam a valores de quantificação por RT-PCR como 8,14 $x10^4$ UG/L, 6,16 $x10^3$ UG/L, 8,13 $x10^4$ UG/L. A amostra L18A2 apresentou uma análise positiva para a presença do agente patogénico, no entanto, a sua quantificação por RT-PCR foi inferior ao limite de quantificação.

Em 2019, foram processadas 20 amostras, *L. pneumophila* foi detetada em 4 amostras (L19A4, L19B1, L19B2 e L19C1), corresponde a 29,82%. As três primeiras tiveram o crescimento máximo em meio de cultura e a última apenas teve 20 UFC/L. Pela técnica de RT-PCR, a bactéria foi detetada em 10 amostras o que representa 50%. Das amostras 5 apresentaram uma quantificação, por RT-PCR, inferior ao limite de quantificação. Segundo o método cultural nenhuma das amostras estava contaminada por *L. pneumophila*.

Tabela 9 Amostras provenientes para a vigilância da *L.pneumophila* no mesmo edifício, ao longo de 3 anos (2017-2019).

Ano	Código da amostra	MC – *L. pneumophila* (ufc/L)	RT-PCR – *L. pneumophila*	Quantificação de *L. pneumophila* por RT-PCR (UG/L)	
2017	L17A1	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17A2	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	-	
	L17A3	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17A4	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	-	
	L17A5	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17A6	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17A7	30	Detetada	-	
	L17A8	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17A9	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17B1	10	Detetada	-	
	L17B2	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17B3	$3.30x10^2$	Detetada	-	
	L17B4	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17B5	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17C1	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	$5,40 x10^3$	
	L17C2	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	$1,80 x10^4$	
	L17C3	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L17C4	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	$1,70 x10^4$	
	L17C5	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	$1,60 x10^4$	
	L17D1	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	$3,80 x10^3$	
	L17D2	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	$2,00 x10^3$	
	L17D3	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	$2,60 x10^3$	
	L17D4	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
2018	L18A1	$3.00x10^2$	Detetada	$1,40 x10^4$	
	L18A2	$2.50x10^2$	Detetada	$5,20 x10^2$	<608 *(UG/L)*
	L18A3	$3.50x10^2$	Detetada	$1,16 x10^4$	
	L18A4	$>3.00x10^3$	Detetada	$8,14 x10^4$	
	L18A5	$1.20x10^3$	Detetada	$5,28 x10^3$	
	L18B1	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L18B2	$7.50 x10^2$	Detetada	$8,17 x10^2$	
	L18B3	$6.50 x10^2$	Detetada	$7,05 x10^3$	
	L18B4	$>3.00x10^3$	Detetada	$6,16 x10^3$	
	L18B5	$2.10x10^3$	Detetada	$2,85 x10^3$	
	L18B6	$>3.00x10^3$	Detetada	$8,13 x10^4$	
	L18C1	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L18C2	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
	L18C3	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
2019	L19A1	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	

L19A2	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
L19A3	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
L19A4	>3.00x10^3	Detetada	1,30 x10^6	
L19A5	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	6,00 x10^2	<608 *(UG/L)*
L19A6	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)		
L19B1	>3.00x10^3	Detetada	1,64 x10^6	
L19B2	>3.00x10^3	Detetada	3,91 x10^6	
L19B3	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	6,00 x10^2	<608 *(UG/L)*
L19B4	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	7,43 x10^2	
L19B5	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
L19C1	20	Detetada	8,57 x10^3	
L19C2	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
L19C3	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
L19C4	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	5,72 x10^2	<608 *(UG/L)*
L19C5	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
L19C6	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	4,34 x10^2	<608 *(UG/L)*
L19C7	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	
L19C8	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Detetada	1,68 x10^2	<608 *(UG/L)*
L19C9	Não Detetada (LD = 10 ufc/L)	Não Detetada (LD = 160 UG/L)	-	

No que respeita a evolução da deteção de *L. pneumophila* no local de amostragem estudado (Figura 11), segundo o método cultural, ao longo dos 3 anos, das 57 amostras testadas a primeira amostra em que foi detetada esta bactéria foi L17A7, depois L17B1 e a seguir L17B3 (3.30X10^2 UCF/L).

As amostras que apresentaram teores mais altos segundo o mesmo método foram L18A4, L18B4, L18B6, L19A4, L19B1 e L19B2 (todas com um valor superior a 3.00x10^3 UCF/L).

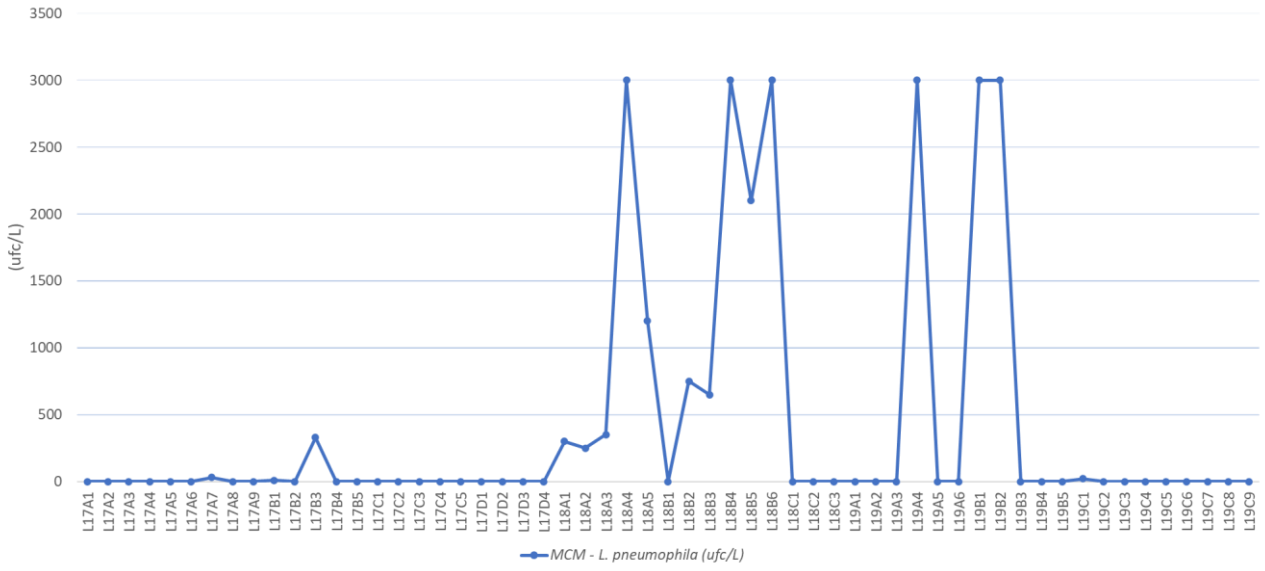

Figura 11 Gráfico das 57 amostras testadas para *L. pneumophila* pelo método cultural.

Pelo método cultural, das 57 amostras 17 estavam contaminadas por *L. pneumophila*, corresponde a 29,82% (Figura 12). Segundo este método 70,18% das amostras estavam isentas de *L. pneumophila*.

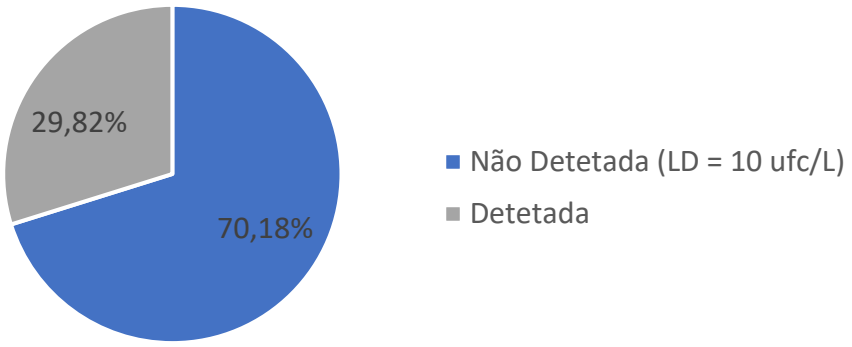

Figura 12 Gráfico que representa em percentagem as amostras Detetadas e Não Detetadas pelo método cultural para *L. pneumophila*

Pela técnica de RT-PCR, o panorama é diferente. Segundo o método molecular independentes do cultivo, mais de metade das amostras analisadas (56,14%) estão contaminadas pela bactéria *L. pneumophila* (Figura 13), o que corresponde a 32 amostras, 25 amostras estavam isentas do agente patogénico.

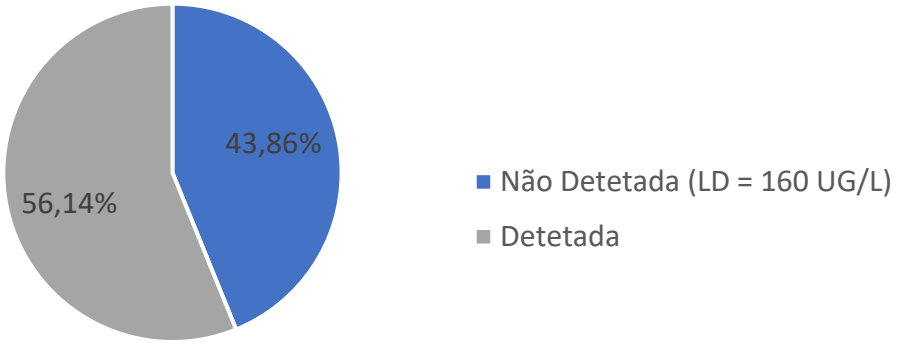

Figura 13: Gráfico que representa em percentagem as amostras Detetadas e Não Detetadas por RT-PCR para *L. pneumophila*

4.4. Discussão

A pesquisa e quantificação de *Legionella* é exigida pelos órgãos reguladores, no entanto, há dúvidas na escolha do método de deteção a usar. O método cultural é considerado o método padrão, convencional, e a técnica de RT-PCR tem-se mostrado uma alternativa promissora. (69) O objetivo deste estudo foi comparar resultados obtidos pelo método dependente do cultivo e método molecular independente do cultivo para a vigilância de *Legionella* em águas. O estudo de *L. pneumophila* apresenta dificuldades. Existem entraves na deteção de organismos viáveis mas não cultiváveis (VBNC). O crescimento em placa desta bactéria é baixo. O tratamento com biocidas leva à perda de crescimento nos meios de cultura, reduzindo as concentrações de *L. pneumophila* para níveis indetetáveis. (108)

A maioria das amostras analisadas são de águas de consumo humano e são as amostras em que a bactéria *L. pneumophila* foi mais detetada, o que indica que a bactéria ocorre nos sistemas de água tratada. (109) A presença *L. pneumophila* é confirmada em águas de piscina. (62) Os resultados dos anos 2018 e 2019 revelam a presença da bactéria segundo os dois métodos. No entanto, nos resultados de 2017, o método cultural não detetou contaminação por *L. pneumophila* em águas das piscinas ao contrário da técnica de PCR (Figura 6).

O método padrão, dependente do cultivo permite o isolamento e a quantificação de espécies cultiváveis de *Legionella* a partir de amostras de água, mas possui limitações. A técnica consome muito tempo, apesar de haver um padrão de consenso internacional para deteção e enumeração (ISO 11731: 1998). O crescimento excessivo de outras bactérias acompanhantes, a presença de células viáveis mas não cultiváveis (VBNC), a perda de viabilidade de bactérias após a colheita da amostra e durante o tratamento da mesma (estágio descontaminação com calor ou ácido), limitam o uso do método cultural. Os microrganismos expostos a ambientes adversos, como a restrição de nutrientes, stress oxidativo, calor, irradiação UV, sofrem alterações fisiológicas ou morfológicas que dificultam a deteção e enumeração precisa de *Legionella*. (102,107) Após o tratamento térmico, parte da população de *L. pneumophila* entra no estado VBNC. A desinfeção térmica

é comumente usada para impedir a proliferação de *Legionella* em sistemas de água. Em resposta ao stress, as populações de *Legionella* cultiváveis podem mudar para um estado viável mas não cultivável. A importância dessas células VBNC *Legionella* é continuamente debatida. (68)

O método molecular, RT-PCR, permite a manipulação de um grande número de amostras. (107) No entanto, até meados de 2019 a principal desvantagem do seu uso era a incapacidade de avaliar a viabilidade das bactérias, ou seja, pela técnica de PCR não era possível distinguir entre microrganismos viáveis e não viáveis, detetando apenas sua presença ou ausência. As bactérias viáveis são capazes de causar infeções em seres humanos e são problemáticas a nível de saúde pública. (110) O reagente do kit de deteção foi melhorado pelo fabricante, o se pode ter refletido na ligeira diminuição da percentagem de deteção em 2019, valores abaixo da média dos três anos avaliados (Tabela 8), isto porque, deixaram de ser detetadas as bactérias não viáveis na técnica de RT-PCR. Em 2019, os resultados obtidos pelo método cultural também estão abaixo da média dos 3 anos. O resultado revela a eficácia da vigilância. A desinfeção, está a ter sucesso, a nível da descida da presença do microrganismo no local de amostragem avaliado, uma vez que, a diminuição da contaminação por *L. pneumophila* foi evidente segundo os dois métodos, dependente do cultivo e molecular independente do cultivo.

Das amostras analisadas por PCR em tempo real para a pesquisa da presença de *Legionella spp*. não *L. pneumophila*, nos anos de 2018 e 2019, a contaminação foi detetada, respetivamente, em 94,56% e 77,57% dos casos (Figura 7; Figura 9). As espécies de *Legionella spp.* sem especificação devem receber maior consideração no diagnóstico, pois apesar de *L. pneumophila* ser a maior causadora de doença do legionário, não é a única. Existem mais espécies patogénicas para o ser humano (Tabela 10). (111,112)

Existe diferença considerável entre os resultados de RT-PCR e os resultados segundo o método convencional para *L. pneumophila* nas amostras de água. A percentagem de deteção para PCR é maior do que a obtidas pelo método cultural, tanto nas amostras gerais obtidas nos 3 anos, como nas amostras provenientes do ponto de amostragem estudado ao longo dos 3 anos. Elevadas concentrações *L.*

pneumophila na água aumentam o risco de infeção por este agente. (113) Um método de deteção eficaz é fundamental para a pesquisa e quantificação de *Legionella*, pois o método dependente do cultivo pode levar até 14 dias para obter um resultado, e os resultados são variáveis (Tabela 9), o que indica uma baixa recuperação. Por sua vez, a técnica de RT-PCR é mais rápida. No entanto, é de frisar que 3 amostras (T18A1, T18A2 e H19A1) nas quais a *L. pneumophila* é detetada apenas pelo método cultural. Uma das hipóteses que explica o resultado é a colheita ter sido feita em 2 frascos de 1 litro, não sendo esta uma amostra composta (colheu-se 1L para PCR e outro litro para o método cultural). A outra hipótese explicativa é a perda de material genético durante o procedimento da PCR, pois as unidades genómicas foram inferiores ao limite de deteção (LD = 160 UG/L). (114)

Quanto ao ponto de amostragem acompanhado durante os 3 anos, os resultados mostram que em 2017 *L. pneumophila*, segundo o método cultural é detetada em 3 amostras, e segundo RT-PCR em 12 amostras. Como a quantificação de UG não foi feita em todos as amostras onde a bactéria foi detetada por PCR, é difícil a comparação, mas a presença do microrganismo é clara.

As 6 amostras (L18A4, L18B4, L18B6, L19A4, L19B1 e L19B2) segundo a quantificação de *L. pneumophila*, pelo método dependente do cultivo, é superior a $3{,}00 \times 10^3$ UFC/L. Os valores da quantificação por RT-PCR, das respetivas amostras variam a nível exponencial das unidades genómicas por litro ($8{,}14 \times 10^4$, $6{,}16 \times 10^3$, $8{,}13 \times 10^4$, $1{,}30 \times 10^6$, $1{,}64 \times 10^6$, $3{,}91 \times 10^6$). O que torna difícil a comparação dos resultados dos dois métodos. Semelhante acontece com outras amostras quando as UFC são comparadas com as UG. O enorme obstáculo em termos legislativos é a falta de correlação entre unidades genómicas e as unidades formadoras de colónias, ainda não é possível a comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos, os resultados inferiores ao LD, pela técnica RT-PCR são equivalentes aos resultados “Ausência de DNA”. (105) Em termos legislativos, não é possível a utilização do método molecular independente do cultivo como um único método de pesquisa devido à falta de correlação com o método cultural convencional.

Os resultados do ano de 2019 mostraram que a incidência de *Legionella* diminuiu o que leva a assumir a eficiência da vigilância feita pelas autoridades de saúde. A continuação do programa de vigilância para *Legionella* e a utilização de técnicas complementares para a deteção deste agente patogénico é fundamental. Desta forma, o diagnóstico é muito mais fidedigno. A revisão das diretrizes é importante, devido às lacunas ainda existentes, uma vez que, o método tradicional está enraizado e é obrigatório. Apesar de ainda haver alguma discussão acerca da comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos referidos (cultural versus RT-PCR), estes podem ser usados de uma forma expedita e complementar na análise de amostras ambientais. O RT-PCR deve ser a primeira escolha sempre que é necessário um resultado rápido. Este método é capaz de gerar resultados definitivos em menos de 12 horas, o que se traduz numa mais valia em situações de risco. As amostras positivas para *Legionella*, por PCR em tempo real devem ser confirmadas pelo método cultural, o que permitirá complementar a identificação da espécie e serogrupo da *Legionella* em causa. É de salientar a importância de começar a estudar novas espécies causadoras de infeções por *Legionella*, para além da *L. pneumophila* tais como as referidas ma Tabela 10.

Tabela 10 Outras espécies de Legionella patogénicas para o ser humano. (57)

Espécies de Legionella patogénicas para o ser humano	
L. anisa	*L. dumoffit*
L. birminghamensis	*L. feeleti*
L. bozemanii	*L. gormanii*
L. cincinnatiensis	*L. hackeltae*
L. israelensis	*L. jordanis*
L. longbeachae	*L. maceachernii*
L micdadet	*L. oakridgensts*
L. parisiensts	*L. pneumophila*
L. samthelenst	*L. santicrucis*
L. tucsonensis	*L. wadsworthti*

4.5. Considerações Finais e Perspetivas Futuras

A partir da análise dos resultados laboratoriais obtidos nos têS anos é possível tirar algumas conclusões. A contaminação determinada pelo método cultural não reflete a verdadeira escala do problema. O estado do VBNC é considerado uma estratégia de sobrevivência a longo prazo da maioria das bactérias Gram-negativas com um programa específico de diferenciação. O estado do VBNC é visto como um estado lesionado do qual as células podem recuperar. Nesse estado, as bactérias param de crescer em meio de cultura, mas mantêm certas características das células viáveis, como atividade metabólica, integridade da membrana e, mais controversamente discutida, virulência. (59)

Dada a frequência de *L. pneumophila* na água, a virulência do organismo e o facto da dose infeciosa ser baixa, é esperado um número muito maior de infeções do que realmente acontece. Portanto, é possível que existam outros determinantes ainda desconhecidos da infeção. (57) A presença de *Legionella* VBNC pode levar a resultados enganosos em relação ao sucesso de uma medida de controlo. (102) A presença de *L. pneumophila* na água não significa que a doença do legionário ocorra. No entanto, uma vigilância regular de *Legionella spp.* em sistemas de água naturais e artificiais é cada vez mais importante numa tentativa de evitar casos de doença dos legionários. (115)

As diretrizes da OMS, da UE e da DGS exigem uma avaliação de risco adequada e suficiente e uma inspeção regular da avaliação nas alterações necessárias para manter vigilância de *Legionella*. É necessário um melhor entendimento da epidemiologia da doença dos legionários para aprimorar a identificação de nichos ambientais, melhorar a avaliação de riscos, a investigação e o controlo de casos e surtos, além de priorizar recursos. As técnicas moleculares rápidas são necessárias para um diagnóstico laboratorial com alto poder discriminatório para confirmar fontes ambientais e controlar surtos. A identificação e avaliação da ameaça de *Legionella* em sistemas de água e implementação de medidas adequadas de desinfeção, manutenção destes sistemas de água e reconhecer os riscos. (116) A resistência em estirpes ambientais deve ser sistematicamente investigada e novas alternativas de tratamento devem ser

encontradas. Atualmente, existe a discussão sobre o significado e a relevância para a saúde do estado de *Legionella* VBNC. (68) É fundamental uma revisão das diretrizes. A falta de correlação entre os resultados dos testes e o risco à saúde humana já foi previamente reconhecida. (102) As necessidades futuras são a pesquisa da ecologia de *Legionella spp.* para entender melhor a virulência e os riscos de doenças das diferentes formas do ciclo de vida e patogénese do agente causador da DL. (116)

Em suma, os métodos atuais de pesquisa e avaliação de risco também são desajustados. É, urgentemente, necessário um melhor entendimento da epidemiologia da doença dos legionários para aperfeiçoar a identificação de nichos ambientais, melhorar a avaliação de riscos, a investigação e o controlo de casos e surtos, além de priorizar recursos. Técnicas moleculares rápidas são necessárias para um diagnóstico laboratorial, e novos ensaios de genotipagem com alto poder discriminatório para confirmar fontes ambientais e controlar surtos também são importantes. Estudos futuros na exposição da patogenicidade das espécies de *Legionella* não *L. pneumophila* são necessários para avaliar o seu potencial significado na saúde pública.

4.6. Bibliografia

1. Tapsell LC, Neale EP, Satija A, Hu FB. Foods, Nutrients, and Dietary Patterns: Interconnections and Implications for Dietary Guidelines. Advances in Nutrition. 2016; 7(3): 445–54.

2. Suzzi G, Corsetti A. Food Microbiology: The Past and the New Challenges for the Next 10 Years. Frontiers in Microbiology. 2020; 11.

3. Martini SA, Phillips M. Nutrition and Food Commodities in the 20th Century. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009; 57(18): 8130–5.

4. Santos, M. I., Correia, C., Cunha, M. I. C., Saraiva, M. M., Novais, M. R. Valores Guia para Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos Prontos a Comer Preparados em Estabelecimentos de Restauração. Revista da Ordem dos Farmacêuticos. 2005; 64: 66-68.

5. Bondi M, Messi P, Halami PM, Papadopoulou C, Niederhausern S de. Emerging Microbial Concerns in Food Safety and New Control Measures. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2014; 3: 251512.

6. Bintsis T. Microbial Pollution and Food Safety. AIMS Microbiology. 2018; 4(3): 377–96.

7. Guerrant DI, Moore SR, Lima AAM, Patrick PD, Schorling JB, Guerrant RL. Association of Early Childhood Diarrhea and Cryptosporidiosis with Impaired Physical Fitness and Cognitive Function Four-Seven Years Later in Apoor Urban Community in Northeast Brazil. The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene. 1999; 61(5): 707–13.

8. Montoya A, Mody L. Common Infections in Nursing Homes: a Review of Current Issues and Challenges. Aging Health. 2011; 7(6): 889–99.

9. ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos: Técnicas de Análisis Microbiológico. Editorial Acribia. 1984. 431.

10. Goburdhun D, Beeharry MD, Reega K, Ruggoo A, Neetoo H. Assessment of the Microbiological Quality of Popular Food Items on Sale in Secondary School Canteens of Mauritius. Italian Journal of Food Safety. 2019; 8(1): 7326.

11. Christison CA, Lindsay D, von Holy A. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbiological Survey of Ready-to-Eat Foods and Associated Preparation Surfaces in Retail Delicatessens, Johannesbur. Food Control. 2008; 19(7): 727–33.

12. Viegas S, Brazão R, Fernandes P, Dias M da G, Oliveira L, Grupo de Trabalho Ocorrência Microbiológica na Cadeia Alimentar (GTOMCA). Guia Para o Estabelecimento de Critérios Microbiológicos em Géneros Alimentícios. 2017 [cited 2020 May 12]. Available from:http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4701/3/Guia%20Crit%C3%A9rios%20Microbiol%C3%B3gicos_VFinal_20170413.pdf

13. Hayes PR. Food Microbiology and Hygiene. New York: Chapman and Hall; 1995; 2: 516.

14. Gerba CP. Indicator Microorganisms. In: Environmental Microbiology. Academic

Press, 2009. 485–99.

15. Onyango AE, Okoth MW, Kunyanga CN, Aliwa BO. Microbiological Quality and Contamination Level of Water Sources in Isiolo County in Kenya. Journal of Environmental and Public Health. 2018; 1-10.

16. Luksamijarulkul P, Pumsuwan V, Pungchitton S. Microbiological Quality of Drinking Water and Using Water of a Chao Phya River Community, Bangkok. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1994; 25(4): 633–7.

17. Berg G. The Indicator System. In Indictors of Viruses in Water and Food. 1978; 1–13.

18. Lechevallier MW, Welch NJ, Smith DB. Full-Scale Studies of Factors Related to Coliform Regrowth in Drinking Water. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62(7): 2201-2211.

19. Levallois P, Villanueva CM. Drinking Water Quality and Human Health: An editorial. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019; 16(4); 631.

20. Dufour AP, Behymer TD, Cantú R, Magnuson M, Wymer LJ. Ingestion of Swimming Pool Water by Recreational Swimmers. Journal Of Water and Health. 2017; 15(3): 429–37.

21. ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods: 1. Their Significance and Methods of Enumeration. University of Toronto Press. 1978; 2: 431.

22. Tatini, R. S., Hoover, G. D., Lachica, F. V., & Speck, M. L. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of food. Chapter. 1984; 33: 411-423.

23. Ramalho R, Cunha J, Teixeira P, Gibbs PA. Improved Methods for the Enumeration of Heterotrophic Bacteria in Bottled Mineral Waters. Journal of Microbiological Methods. 2001; 44(2): 97–103.

24. Nkere CK, Ibe NI, Iroegbu CU. Bacteriological Quality of Foods and Water Sold by Vendors and in Restaurants in Nsukka, Enugu State, Nigeria: a Comparative Study of Three Microbiological Methods. Journal of Health, Population, and Nutrition. 2011; 29(6): 560–66.

25. Malcolm JF. The Classification of Coliform Bacteria. The Journal of hygiene. 1938; 38(4): 395–423.

26. Pinegar JA, Cooke EM. *Escherichia coli* in Retail Processed Food. Epidemiology and Infection. 1985; 95(1): 39–46.

27. Olsvik Ø, Wasteson Y, Lund A, Hornes E. Pathogenic *Escherichia coli* Found in Food. International Journal of Food Microbiology. 1991; 12(1): 103–13.

28. Ashbolt NJ, Grabow WO, Snozzi M. Indicators of Microbial Water Quality. Water Quality: Guidelines, Standards and Health, 2001; 289-316.

29. Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. Toxins. 2013; 5(5): 895–911.

30. Murray BE. The Life and Times of the *Enterococcus*. Clinical Microbiology Reviews. 1990; 3(1): 46–65.

31. Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. Toxins. 2016; 8(3): 73.

32. Kiu R, Hall LJ. An Update on the Human and Animal Enteric Pathogen *Clostridium perfringens*. Emerging Microbes and Infections. 2018; 7(1): 1-15.

33. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - ASAE. *Clostridium*. [cited 2020 May 25]. Available from: https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/clostridium.aspx

34. Jamshidi A, Zeinali T. Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. International Journal of Food Science. 2019; 3: 1-7.

35. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and Distribution of *Listeria spp.*, Including *Listeria* Species Newly Described since 2009. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016; 100(12): 5273–87.

36. Dortet L, Radoshevich L, Veiga E, Cossart P. *Listeria monocytogenes*. In: Encyclopedia of Microbiology. Elsevier; 2019; 4: 803–18.

37. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - ASAE. *Listeria*. [cited 2020 Apr 14]. Available from: https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/listeria-monocytogenes.aspx

38. Jordan K, McAuliffe O. *Listeria monocytogenes* in Foods. In: Advances in Food and Nutrition Research. Academic Press. 2018; 181–213.

39. Mercante JW, Winchell JM. Current and Emerging *Legionella* Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. Clinical Microbiology Reviews. 2015; 28(1): 95–133.

40. Diederen BMW. *Legionella spp*. and Legionnaires' Disease. Journal of Infection. 2008; 56(1): 1–12.

41. Fletcher S, Boonwaat L, Moore T, Chavada R, Conaty S. Investigating an Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Among Travellers Across Two Australian States. Western Pacific Surveillance and Response Journal: WPSAR. 2015; 6(2): 17–21.

42. Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. Pediatrics in Review. 2018; 39(6): 287–98.

43. Rasigade JP, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus*: a Pathogen with Still Unresolved Issues. Infection, Genetics and Evolution. 2014; 21: 510–14.

44. Jajere SM. A Review of *Salmonella enterica* with Particular Focus on the Pathogenicity and Virulence Factors, Host Specificity and Adaptation and Antimicrobial Resistance Including Multidrug Resistance. Veterinary World. 2019; 12(4): 504–21.

45. Saravanan S, Purushothaman V, Murthy TRGK, Sukumar K, Srinivasan P, Gowthaman V, et al. Molecular Epidemiology of Nontyphoidal *Salmonella* in Poultry and Poultry Products in India: Implications for Human Health. Indian Journal of Microbiology. 2015; 55(3): 319–26.

46. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - ASAE. *Salmonella*. [cited 2020 Apr 14]. Available from: http://www.asae.gov.pt/?cn=541054135462AAAAAAAAAAAA

47. De Bentzmann S, Plésiat P. The *Pseudomonas aeruginosa* Opportunistic Pathogen and Human Infections. Environmental Microbiology. 2011; 13(7): 1655–65.

48. Tümmler B, Klockgether J. Recent Advances in Understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a Pathogen. F1000Research. 2017; 6: 1261.

49. Fischer H, Pusch M. Use of the [14C] Leucine Incorporation Technique To Measure Bacterial Production in River Sediments and the Epiphyton. Applied and Environmental Microbiology. 1999; 65(10): 4411-18.

50. Calabrese JP, Bissonnette GK. Improved Membrane Filtration Method Incorporating Catalase and Sodium Pyruvate for Detection of Chlorine-Stressed Coliform Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 1990; 56(11): 3558-64.

51. Ashbolt NJ. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. Current Environmental Health Reports. 2015. 2(1): 95–106.

52. Daley K, Castleden H, Jamieson R, Furgal C, Ell L. Water Systems, Sanitation, and Public Health Risks in Remote Communities: Inuit Resident Perspectives from the Canadian Arctic. Social Science and Medicine. 2015; 135: 124–32.

53. Hunter PR, MacDonald AM, Carter RC. Water Supply and Health. PLOS Medicine. 2010; 7(11): e1000361.

54. Scully C. Respiratory medicine. In: Scully's Medical Problems in Dentistry. Elsevier Health Sciences. 2014; 7: 405–26.

55. Edelstein PH, Roy CR. Legionnaires' Disease and Pontiac Fever. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2015; 10: 2633–44.

56. Rubin LG. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Elsevier. 2017; 5: 948-952.

57. World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality: Microbiological Agents in Drinking Water: Addendum. 2002. [cited 2020 Apr 23]. Available from https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/microbiological-agents-in-drinking-water/en/

58. Zhan XY, Hui Hu C. *Legionella* Pathogenesis and Virulence Factors. Annals of Clinical and Laboratory Research. 2015; 3(2): 15.

59. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, et al. Starved Viable but Non-Culturable (VBNC) *Legionella* Strains Can Infect and Replicate in Amoebae and Human Macrophages. Water Research. 2018; 141: 428–38.

60. ECDC. Legionnaires' disease - Annual Epidemiological Report for 2015. 2017. [cited 2020 Apr 13]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2015

61. Xu L, Luo ZQ. Cell Biology of Infection by *Legionella pneumophila.* Microbes and Infection. 2013; 15(2): 157–67.

62. Leoni E, Legnani PP, Bucci Sabattini MA, Righi F. Prevalence of *Legionella spp*. in Swimming Pool Environment. Water Research. 2001; 35(15): 3749–53.

63. Lee S. An Overview of the European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation of Infections Caused by *Legionella* species. Perspectives in public health. 2018; 138(5): 241–47.

64. ECDC. European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by *Legionella* species. 2017. [cited 2020 Apr 13]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-technical-guidelines-prevention-control-and-investigation-infections

65. Tobin JO h., Swann RA, Bartlett CLR. Isolation of *Legionella pneumophila* from Water Systems: Methods And Preliminary Results. British Medical Journal. 1981; 282(6263): 515–17.

66. Diário da República Electrónico. Portaria 1071/98, 1998-12-31 - DRE. [cited 2020 Apr 17]. Available from: https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/285563/details/normal?q=Portaria+n.º1071%2F98%2Cde+31+de+Dezembro.

67. Paulo Gonçalves, Paula Lavado CB, Simões MJ. A Doença dos Legionários em Portugal, 2010-2013: Resultados da Vigilância Laboratorial no Âmbito do Programa De Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários. 2014; 3(7): 14-17.

68. Cervero-Aragó S, Schrammel B, Dietersdorfer E, Sommer R, Lück C, Walochnik J, et al. Viability and Infectivity of Viable but Non-Culturable *Legionella pneumophila* Strains Induced at High Temperatures. Water Research. 2019; 158: 268–79.

69. Díaz-Flores Á, Montero JC, Castro FJ, Alejandres EM, Bayón C, Solís I, et al. Comparing Methods of Determining *Legionella spp*. in Complex Water Matrices. BMC microbiology. 2015; 15(1): 91.

70. Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the *mip* gene. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41(7): 3327–30.

71. Wullings BA, Bakker G, Van Der Kooij D. Concentration and Diversity of Uncultured *Legionella spp.* in two Unchlorinated Drinking Water Supplies with Different Concentrations of Natural Organic Matter. Applied and Environmental Microbiology. 2011; 77(2): 634–41.

72. Divan Khosroshahi N, Farivar TN, Johari P. Identification of *Legionella pneumophila* in Intubated Patients with TaqMan Real Time PCR. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015; 8(3): e15094.

73. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, et al. Legionnaires' Disease: Description of an Epidemic of Pneumonia. New England Journal of Medicine. 1977; 297(22): 1189–97.

74. Shands KN, Ho JL, Meyer RD, Gorman GW, Edelstein PH, Mallison GF, et al. Potable Water as a Source of Legionnaires' Disease. The Journal of the American Medical Association. 1985; 253(10): 1412–16.

75. Zumla A, Weyell R, Tettmar RE. Legionnaires' Disease: Early Lessons From 1988 London Outbreak. The Lancet Infectious Diseases. 1988; 331(8597): 1275.

76. García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, González-Diego P, Jiménez-Buñuales T, et al. Legionnaires' Disease Outbreak in Murcia, Spain. Emerging infectious diseases. 2003; 9(8): 915–21.

77. Castilla J, Barricarte A, Aldaz J, García cenoz M, Ferrer T, Pelaz C, et al. A large Legionnaires' Disease Outbreak in Pamplona, Spain: Early Detection, Rapid Control and No Case Fatality. Epidemiology and Infection. 2008; 136(6): 823–32.

78. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, et al. Epidemiology and Clinical Management of Legionnaires' Disease. The Lancet Infectious Diseases. 2014; 14(10): 1011–21.

79. Chasqueira MJ, Rodrigues L, Nascimento M, Ramos M, Marques T. Genetic Diversity and Evolutionary Relationships Among *Legionella pneumophila* Clinical Isolates, Portugal, 1987 to 2012. Eurosurveillance. 2014; 19(46): 20965.

80. Dias A, Cysneiros A, Lopes FT, Von Amann B, Costa C, Dionísio P, et al. The Typical Presentation of an Atypical Pathogen During an Outbreak of Legionnaires' Disease in Vila Franca de Xira, Portugal, 2014. Revista Portuguesa de Pneumologia. 2017; 23(3): 117–23.

81. Russo A, Gouveia CM, Soares PMM, Cardoso RM, Mendes MT, Trigo RM. The Unprecedented 2014 Legionnaires' Disease Outbreak in Portugal: Atmospheric Driving Mechanisms. International Journal of Biometeorology. 2018; 62(7): 1167–79.

82. George F, Shivaji T, Pinto CS, Serra LAO, Valente J, Albuquerque MJ, et al. Um Grande Surto da Doença dos Legionários numa Cidade Industrial em Portugal. Revista Portuguesa de Saúde Pública. 2016; 34(3): 199–208.

83. Direção-Geral da Saúde. [cited 2020 Apr 20]. Available from: https://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/legionella.aspx

84. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope3 DH. Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. Applied and Environmental Microbiology. 1981; 41(1): 9-16.

85. Steele TW. Legionnaires' Disease in South Australia, 1979-1988. Medical Journal of Australia. 1989; 151(6): 322, 325–6, 328.

86. Katz SM, Hammel JM. The Effect of Drying, Heat, and pH on the Survival of *Legionella pneumophila*. Annals of Clinical and Laboratory Science. 1987; 17(3): 150–56.

87. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(3): 506–26.

88. Newton HJ, Ang DKY, Van Driel IR, Hartland EL. Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*. Clinical Microbiology Reviews. 2010; 23(2): 274–98.

89. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee J V., Keevil CW. Influence of Temperature and Plumbing Material Selection nn Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in a Model Potable Water System Containing Complex Microbial Flora. Applied and Environmental Microbiology. 1994; 60(5): 1585–92.

90. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. The life cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation is Linked to Virulence and Metabolism. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2018; 8: 3.

91. Buse HY, Hoelle JM, Muhlen C, Lytle D. Electrophoretic Mobility of *Legionella pneumophila* Serogroups 1 to 14. FEMS Microbiology Letters. 2018; 365(10): fny067.

92. Committee NRC (US) SDW. Drinking Water and Health. Washington, D.C.: National Academies Press. 1982; 4: 108–136.

93. National Academies of Sciences, Engineering and M. Management of *Legionella* in Water Systems. Washington, D.C.: National Academies Press. 2019; 1–10.

94. Brady MF, Sundareshan V. Legionnaires' Disease (*Legionella* Infection). StatPearls Publishing. 2018; 31(4): 325-333.

95. Brand BC, Sadosky AB, Shuman HA. The *Legionella pneumophila icm* locus: a Set of Genes Required for Intracellular Multiplication in Human Macrophages. Molecular Microbiology. 1994; 14(4): 797–808.

96. Neumeister B, Faigle M, Sommer M, Zähringer U, Stelter F, Menzel R, et al. Low Endotoxic Potential of *Legionella pneumophila* Lipopolysaccharide Due to Failure of Interaction with the Monocyte Lipopolysaccharide Receptor CD14. Infection and Immunity. 1998; 66(9): 4151–57.

97. Coil DA, Anne J. Twitching Motility in *Legionella pneumophila*. FEMS Microbiology Letters. 2009; 293(2): 271–77.

98. Gomez-Valero L, Rusniok C, Jarraud S, Vacherie B, Rouy Z, Barbe V, et al. Extensive Recombination Events and Horizontal Gene Transfer Shaped the *Legionella pneumophila* Genomes. BMC Genomics. 2011; 12(1): 536.

99. Vandersmissen L, De Buck E, Saels V, Coil DA, Anné J, Anné A. *Legionella pneumophila* Collagen-Like Protein Encoded by a Gene with a Variable Number of Tandem Repeats Is Involved in the Adherence and Invasion of Host Cells. FEMS Microbiology Letters. 2010; 306(2): 168-176

100. Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences. 2013; 14(11): 21660–75.

101. Murray S. *Legionella* Infection. Canadian Medical Association Journal. 2005; 173: 1322.

102. Whiley H. *Legionella* Risk Management and Control in Potable Water Systems: Argument for the Abolishment of Routine Testing. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2017; 14(1): 12.

103. Correia AM, Gonçalves J, Gomes JP. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. New England Journal of Medicine. 2016; 374: 497–98.

104. Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63(5): 2047–53.

105. Direção-Geral da Saúde. Prevenção e Controlo de *Legionella* nos Sistemas De Água. Comissão Setorial para Água. 2014; (Instituto Português da Qualidade em parceria com a EPAL, Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A). [cited 2020 Sep 13]. Available from: https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/prevencao-e-controlo-de-legionella-nos-sistemas-de-agua.aspx

106. Tang, Yi-Wei. Molecular Medical Microbiology. Academic Press. 2015; 3: 1611–25.

107. Borges A, Simões M, Saavedra MJ. Detection of *Legionella spp* . in Natural and Man-made Water Systems Using Standard Guidelines. Journal of Microbiology Research. 2012; 2(4): 95–102.

108. Kirschner AKT. Determination of Viable *Legionellae* in Engineered Water Systems: Do We Find What We Are Looking For? Water Research. 2016; 93: 276–88.

109. Cervero-Aragó S, Rodríguez-Martínez S, Puertas-Bennasar A, Araujo RM. Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free *Legionella* and *Amoebae*-Associated *Legionella*. PLoS One. 2015; 10(8): e0134726.

110. Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Marin M, et al. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. Applied and Environmental Microbiology. 2011; 77(5): 1708–17.

111. Muder RR, Yu VL. Infection Due to *Legionella species* Other Than *L. pneumophila*. Clinical Infectious Diseases. 2002; 35(8): 990–98.

112. Lode H, Kemmerich B, Schäfer H, Grothe R, Hartmann R, Ehret W, et al. Significance of Non-pneumophila *Legionella species* in Adult Community-Acquired and nosocomial Pneumonias. Klinische Wochenschrift. 1987; 65(10): 463–68.

113. Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, et al. *Legionella* Infection Risk from Domestic Hot Water. Emerging Infectious Diseases. 2004; 10(3): 457–64.

114. Lee J V., Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, et al. An international Trial of Quantitative PCR for Monitoring *Legionella* in Artificial Water Systems. Journal of Applied Microbiology. 2011; 110(4): 1032–44.

115. Vaccaro L, Izquierdo F, Magnet A, Hurtado C, Salinas MA, Gomes TS, et al. First Case of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella anisa* in Spain and the Limitations on the Diagnosis of *Legionella* Non-pneumophila Infections. PLoS One. 2016; 11(7): e0159726.

116. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' Disease. The Lancet. 2016; 387(10016): 376–85.