



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

itqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 ANOS **FC**
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

***Legionella pneumophila*: estudo de suscetibilidade das estirpes portuguesas**

Ibéria Ramalho Dias Araújo

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Novembro 2020



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA



DESDE 1962
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

***Legionella pneumophila*: estudo de suscetibilidade das estirpes portuguesas**

Ibéria Ramalho Dias Araújo

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadora:
Professora Doutora Maria de Jesus Chasqueira (NMS | FCM)

Co-orientador:
Professor Doutor Paulo Paixão (NMS | FCM)

Nova Medical School | Faculdade de Ciências Médicas
Unidade de Infecção (Laboratório de Microbiologia)

Novembro 2020

Agradecimentos

Começo agradecendo à Deus primeiramente por esta oportunidade de realizar um mestrado e ainda ser num contexto europeu, superando todas minhas expectativas. Também à Ele sou grata pela minha trajetória e minhas superações que não teriam sido possíveis sem as pessoas que o Senhor colocou em minha vida durante este tempo.

Agradeço à meus pais, Ana Maria Ramalho Dias de Araújo e a Ivonaldo Dias de Araújo, por tudo que fizeram por mim. Esta tese também é mérito de vocês por todo apoio e dedicação que me deram.

Agradeço à Doutora Maria de Jesus Chasqueira como orientadora guiando meus passos ao proporcionar minha aprendizagem nesta trajetória sempre me compreendendo e me estimulando, exigindo e criticando na medida e nos momentos certos.

Agradeço ao Doutor Paulo Paixão como coordenador do mestrado por ter compreendido meu interesse dentro dos temas da tese e como co-orientador por todo empenho e conhecimento essenciais na realização desta tese.

Agradeço às Professoras Lúcia e Augusta por me transmitirem conhecimentos fundamentais para a produção deste estudo, a disponibilidade e a paciência ao me tornarem apta para a prática laboratorial necessária.

Agradeço novamente a todos estes profissionais pela compreensão e ajuda ao longo deste trabalho, pelo excelente acolhimento que a mim foi dedicado, pelo compromisso e por me capacitarem a esta pesquisa científica.

Agradeço à minha avó, à minhas irmãs e à Maria que direta ou indiretamente me ajudaram, facilitando meu dia a dia e me mostrando que eu era capaz deste desafio.

Agradeço aos meus filhos, Akíria e Augusto, por vocês simplesmente existirem, são minha razão de viver e tudo que mais amo. Hoje vocês são pequeninos, mas um dia lerão estas palavras e espero que compreendam que na vida é preciso ter fé, persistência e estudo constante.

Por fim, eu me sinto como comecei, pequena no meio de gigantes, porém com a sabedoria de que a ciência evolui com nossa própria evolução tanto pessoal como profissional, assim as descobertas são feitas através das pesquisas, assim a humanidade evolui pelo amor ao conhecimento. Sempre obrigada Deus.

Resumo

A *Legionella* é uma bactéria ubíqua de ambientes aquáticos e o agente etiológico da Doença dos Legionários (DL). A taxa de letalidade da DL tem variado desde 5% a 30% nos surtos que têm ocorrido a nível mundial. Na Europa, a doença tem uma taxa de mortalidade de 8%. Em Portugal já ocorreram vários surtos, entre eles o de Vila Franca de Xira que envolveu 403 doentes e 14 óbitos.

A *Legionella* infeta macrófagos alveolares humanos ocasionando uma pneumonia potencialmente fatal. O tratamento da DL é eficaz, porém cada vez mais têm sido relatadas falhas devido ao aparecimento de mecanismos de resistência. É, pois, importante estudar o padrão de suscetibilidade da *Legionella* aos antibióticos e este é o objetivo do presente trabalho. Nele foram realizados testes de suscetibilidade à azitromicina, à ciprofloxacina e à levofloxacina em 42 isolados clínicos recuperados em Portugal, entre 1987 e 2016.

O protocolo do EUCAST 2017 recomenda a utilização do meio com carvão ativado, mas como há discussões sobre a sua interferência na determinação da concentração inibitória mínima (MIC), testamos dois meios, o BCYE- α (com carvão) e o BYE (sem carvão) utilizando a estirpe de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para a qual estão definidos os valores de MIC. Os ensaios realizados confirmaram a alteração do MIC quando se utiliza meio com carvão, aumento de 4 vezes para azitromicina e 8 vezes para ciprofloxacina e levofloxacina *versus* os valores obtidos no meio padrão, o meio Agar Mueller Hinton. Reproduzidos os testes nas mesmas condições em meio sem carvão (BYE), obtivemos valores de MIC normais para a ciprofloxacina e levofloxacina, mas para azitromicina o valor do MIC ainda se elevou mais. Com estes valores pensamos em realizar os testes de suscetibilidade neste meio, mas, ao testar-se o crescimento da *L. pneumophila* ATCC 33152, não se obteve qualquer crescimento na concentração necessária para a técnica dos MICs.

Para o presente trabalho foi necessário aferir as concentrações bacterianas utilizadas nos testes de suscetibilidade, mas dado que os 42 isolados apresentaram morfologia diversa, foi necessário efetuar contagens das UFC/mL pela técnica de Miles e Misra para conseguir essa padronização.

O estudo utilizou o método recomendado pelo EUCAST de 2017 e os resultados revelaram a existência de um isolado com resistência à azitromicina entre os 42 testados.

Considera-se que a realização de estudos similares permitirá conhecer o padrão de resistência da *Legionella* em Portugal, contribuindo para uma adequação do tratamento da DL, evitando falhas terapêuticas e custos relacionados com hospitalizações prolongadas.

Palavras-chave: *Legionella*, suscetibilidade, E-test

Abstract

Legionella is a ubiquitous bacterium in aquatic environments and the etiological agent of Legionnaires' Disease (DL). The lethality rate of DL has varied from 5% to 30% in outbreaks that have occurred worldwide. In Europe, the disease has a mortality rate of 8%. In Portugal, several outbreaks have already occurred, including that in Vila Franca de Xira, which involved 403 patients and 14 deaths.

Legionella infects human alveolar macrophages causing potentially fatal pneumonia. The treatment of DL is effective, but failures have been reported due to the appearance of resistance mechanisms. It is therefore important to study the pattern of susceptibility of *Legionella* to antibiotics and this is the objective of the present work. There were tests for susceptibility to azithromycin, ciprofloxacin and levofloxacin in 42 clinical isolates recovered in Portugal, between 1987 and 2016.

The EUCAST 2017 protocol recommends the use of the medium with activated carbon, but as there are discussions about its interference in determining the minimum inhibitory concentration (MIC), we tested two media, BCYE- α (with charcoal) and BYE (without charcoal) using the reference strain *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 for which the MIC values are defined. The tests carried out confirmed the change in the MIC when using charcoal medium, an increase of 4 times for azithromycin and 8 times for ciprofloxacin and levofloxacin *versus* the values obtained in the standard medium, the Agar Mueller Hinton medium. Reproducing the tests under the same conditions in a charcoal-free medium (BYE), we obtained normal MIC values for ciprofloxacin and levofloxacin, but for azithromycin the MIC value was even higher. With these values we thought about carrying out the susceptibility tests in this medium, but, when testing the growth of *L. pneumophila* ATCC 33152, there was no growth in the concentration necessary for the MIC technique.

For the present study, it was necessary to measure the bacterial concentrations used in the susceptibility tests, but given that the 42 isolates had different morphology, it was necessary to perform CFU / mL counts using the Miles and Misra technique to achieve this standardization.

The study used the method recommended by EUCAST 2017 and the results revealed the existence of an isolate with resistance to azithromycin among the 42 tested.

It is considered that the performance of similar studies will allow to know the resistance pattern of *Legionella* in Portugal, contributing to an adequate treatment of LD, avoiding therapeutic failures and costs related to prolonged hospitalizations.

Keywords: *Legionella*, susceptibility, E-test

Índice

Agradecimento.....	i
Resumo.....	ii
Abstratc.....	iii
Índice.....	iv
Anexos.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	ix

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Bactéria do Género <i>Legionella</i>	1
1.1.1 Contextualização histórica.....	1
1.1.2 Taxonomia e Tipificação de Estirpes	2
1.1.3 Características do género	4
1.2 Doença dos Legionários.....	6
1.2.1 Dados Epidemiológicos.....	8
1.2.2 Epidemiologia em Portugal	11
1.2.3 Fatores de Risco.....	13
1.2.4 Quadro clínico.....	14
1.2.5 Diagnóstico	15
1.2.5.1 Cultura	16
1.2.5.2 Pesquisa de antígenos na urina	17
1.2.5.3 Outros métodos diagnósticos.....	18
1.2.6 Terapêutica Recomendada para DL.....	19
1.2.6.1 Mecanismos de ação dos antibióticos.....	20
1.3 Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana.....	21
1.3.1 Testes de suscetibilidade antimicrobiana de <i>L. pneumophila</i>	23

1.3.1.1 Determinações EUCAST para os TSA de <i>L. pneumophila</i>	25
1.3.1.2 Mecanismos de Resistência das Bactérias	26
1.4 Objetivo deste estudo	28
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	30
2.1 Amostras em estudo.....	30
2.1.1 Proveniência das estirpes em estudo	30
2.1.2 Seleção dos isolados para o estudo.....	31
2.2 Meio de conservação dos isolados	31
2.3 Meio de cultura	32
2.4 Testes de suscetibilidade antimicrobiana	33
2.5 Protocolo da Coloração de Gram	35
2.6 Protocolo de preparação das suspensões bacterianas	35
2.7 Quantificação das suspensões pelo Método de Miles e Misra	36
2.8 Protocolo para os testes de suscetibilidade	38
2.9 Controle <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.10 Controle <i>Legionella</i> serogrupo 1	38
2.11 Aprovação do Comité de Ética	39
2.12 Tratamento estatístico	39
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	40
3.1 Avaliação da morfologia	42
3.2 Preparação das suspensões.....	44
3.3 Testes de suscetibilidade antimicrobiana	45
3.3.1 Seleção do meio de cultura	45
3.3.2 Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana dos isolados em estudo	46
3.3.2.1 Controle dos testes de suscetibilidade	47

3.3.2.2 E-test das estirpes de <i>Legionella</i>	49
Capítulo 4 – Conclusão	57
4.1 Meio de cultura	57
4.2 Suscetibilidade aos antimicrobianos da <i>L. pneumophila</i>	58
4.3 Conclusão final.....	58
Bibliografia	61

Anexos

I-	Coleção de isolados clínicos de <i>Legionella</i> do laboratório de microbiologia recuperados em Portugal entre 1987 e 2016	78
II-	Testes de suscetibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 utilizando a metodologia do E-test conforme o protocolo EUCAST 2020 realizado em diferentes meios para avaliação da interferência dos seus compostos nas leituras da MIC	80
III-	Meio BCYE- α	82
IV-	Escala de McFarland	83
V-	Aprovação pelo Comité de Ética	84

Índice de figuras

I-	Morfologia dos bacilos de <i>Legionella</i> analisada através da coloração pelo método de Gram	04
II-	Distribuição dos casos de doença dos legionários por 100 000 habitantes por país, UE/EEE, 2018	10
III-	Cultura de <i>L. pneumophila</i> em BCYE- α com incubação de 48h a 37°C.	16
IV-	Distribuições de MIC para <i>L. pneumophila</i> segundo o protocolo dos Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana para <i>L. pneumophila</i> publicado pelo EUCAST em 2017	26
V-	Distribuição da coleção de estirpes de <i>L. pneumophila</i> com os perfis alélicos (ST) notificados de 1987 a 2016 por região em Portugal	30
VI-	Esquema de trabalho da preparação das suspensões bacterianas	36
VII-	Esquema de trabalho da quantificação das suspensões pelo Método de Miles e Misra	37
VIII-	Método Miles e Misra para quantificação de bactérias usado para <i>L. pneumophila</i> em BCYE- α	37
IX-	Distribuição dos isolados de <i>L. pneumophila</i> deste estudo por região em Portugal.....	41
X-	Morfologia dos isolados de <i>L. pneumophila</i> em culturas	42
XI-	Culturas de <i>L. pneumophila</i> ATCC 33152 após incubação em placas com meio BCYE e meio BYE	45
XII-	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos da <i>L. pneumophila</i> , em meio BCYE- α utilizando a metodologia do E-test, 48 h de incubação a 35 °C conforme o protocolo EUCAST 2017	55
XIII-	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos do isolado de <i>L. pneumophila</i> HSC30	56

Índice de tabelas

I-	Isolados clínicos e ambientais em estudo recuperados em Portugal, entre 1987 e 2016.	40
II-	Resultados do estudo morfológico dos 42 isolados de <i>L. pneumophila</i> analisadas.	43
III-	Quantificação do nº de unidades formadoras de colónias em isolados de <i>L. pneumophila</i> representativos das diferentes morfologias encontradas na amostra em estudo.....	44
IV-	Resultado dos MICs (mg/L) da estirpe de referência <i>Legionella</i>	47
V-	Resultado dos MICs (mg/L) da estirpe de referência <i>Estafilococos</i>	47
VI-	Distribuição dos resultados dos MICs dos 42 isolados de <i>L. pneumophila</i>	50
VII-	Resultados individualizados dos testes de sensibilidade dos 42 isolados de <i>L. pneumophila</i> à azitromicina, levofloxacina e ciprofloxacina	51
VIII-	Distribuição da percentagem cumulativa de MIC (mg/L) para os 42 isolados de <i>L. pneumophila</i>	52
IX-	Distribuição da percentagem cumulativa de MIC (mg/L) para <i>Legionella</i> publicada pelo EUCAST 2017	54
X-	Amplitude de suscetibilidade, MIC ₅₀ e MIC ₉₀ dos três antibióticos testados para todos isolados de <i>Legionella pneumophila</i>	54

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Bactéria do Género *Legionella*

1.1.1 Contextualização histórica

No verão de 1976, os Estados Unidos comemoravam o bicentenário da Declaração da Independência e em 21 de julho, ocorreu a abertura do 58º Congresso da Legião Estadual da Pensilvânia no qual participaram veteranos de guerra. Neste evento ocorreu um surto de uma doença misteriosa. O congresso aconteceu no Stratford-Bellevue Hotel, localizado na Broad Street, no centro da Filadélfia (57, 70, 85, 131), onde estiveram alojados 600 dos 4.400 participantes. Como não havia um registo centralizado de participação no evento a investigação do surto foi difícil (57, 70).

A doença manifestou-se após 13 dias da abertura do evento, quando os casos já tinham regressado a suas casas, espalhadas por toda a Pensilvânia. Os doentes apresentavam sintomas diversos, desde sintomas semelhantes aos da gripe até a falência de vários órgãos. O primeiro alerta foi dado, ao 13º dia após a abertura do evento, por um médico da Administração Veterana que informou ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) sobre a morte de 4 congressistas por pneumonia. A apenas uma hora depois o número de falecimentos aumentou de 4 para 11. No total, essa epidemia afetou 182 pessoas das quais 147 foram internadas e 29 morreram (13, 57, 67, 70, 92). Inicialmente pensou tratar-se de uma pneumonia atípica causada por uma nova estirpe de vírus influenza (57, 85, 130), porém os métodos diagnósticos, como a cultura, a serologia, a coloração de tecidos e a toxicologia, não encontraram o agente etiológico (57, 130).

A equipe do CDC definiu como maiores fatores de risco para a enfermidade ter idade avançada, ser do sexo masculino, ter hábitos tabágicos e ter permanecido no hall do hotel ou na rua em frente. Foram colocados como fator de risco moderados beber água do hotel e foram excluídos a ingestão de alimentos ou gelo, a permanência em alguma sala de reunião específica e a contaminação de pessoa a pessoa (57).

A imprensa divulgou amplamente tudo o que aconteceu e as dificuldades para encontrar o “responsável”, juntamente com a gravidade da pneumonia e o fato de os pacientes serem aposentados da legião americana, foram empregues muitos recursos para as pesquisas epidemiológicas (76). As dificuldades foram inúmeras, como coordenar jurisdições locais, estaduais e federais, a ansiedade devida a um recente surto de gripe que tinha sido mal resolvida, a falta de definição de caso e os desafios relacionados com a documentação da propagação aérea (57).

Investigadores do ramo da Hanseníase e *Rickettsia* do CDC, chefiados por Charles C. Shepard, observaram que as cobaias apresentaram sintomas óbvios de infecção após serem inoculados com tecido pulmonar de pacientes falecidos. Foram observados alguns bacilos gram-negativos em tecidos de cobaias, porém pensou se tratar da flora ou contaminantes normais (67).

Em janeiro de 1977, o microbiologista do CDC Joseph McDade incomodado com a falta de resolução do surto, voltou a observar as lâminas com cortes de fígado de cobaias inoculadas com amostras recolhidas de doentes. Ele viu microrganismos e resolveu inocular ovos embrionados, sem utilizar antibióticos. Desta forma conseguiu um inóculo que foi usado para infectar outras cobaias as quais desenvolveram sinais da doença (57, 84, 130).

Em 18 de janeiro de 1977, o CDC anuncia a descoberta de uma nova bactéria (67, 70). Era o agente etiológico responsável pelo surto do congresso da legião estadual. Esta descoberta só havia sido possível devido à persistente aplicação de princípios epidemiológicos e laboratoriais básicos como reexaminar as suposições (67). A doença passou a chamar-se de Doença dos Legionários (DL) devido ao grupo de pessoas afetadas nessa epidemia e a espécie da bactéria de *Legionella pneumophila* (37, 57, 67, 79, 85, 92, 131). Apesar do sistema de ar condicionado do hotel ter sido acusado, a fonte da infecção nunca foi identificada (70). Posteriormente, estudos utilizando soros colhidos em doentes que tinham falecido com sintomatologia idêntica e sem identificação do agente, permitiu identificar outros surtos de DL (4, 29, 37, 70, 92).

Em 1968, foram descritos 144 casos de uma síndrome respiratória com febre que durava três a quatro dias. Esta enfermidade atingiu 95% dos trabalhadores e pessoas que visitaram o Departamento de Saúde da cidade de Pontiac, em Michigan. Mesmo não apresentando sinais de pneumonia como a DL, as autoridades de saúde pública foram capazes de comprovar que a mesma bactéria era responsável pelas duas doenças (70, 85). Então essa infecção brônquica aguda, febril, benigna e autolimitada, com o mesmo agente etiológico da DL foi chamada Febre de Pontiac (13, 37).

1.1.2 Taxonomia e Tipificação de Estirpes

A taxonomia classifica a *Legionella* como pertencente a (<https://lpsn.dsmz.de/subspecies/legionella-pneumophila-pneumophila>):

Classe: *Gammaproteobacteria*

Ordem: *Legionellales*

Família: *Legionellaceae*

Gênero: *Legionella*

Em 1979, o género *Legionella* foi estabelecido por Brenner, etimologicamente significa “pequena legião ou exército” (Brenner, 1979). Atualmente, a família *Legionellaceae* é composta por apenas pelo género *Legionella* o qual é subdividido em 62 espécies e mais de 70 serogrupos (79). A espécie *Legionella pneumophila* possui 16 serogrupos (37) e representa o principal agente etiológico da DL. As espécies podem apresentar diferentes estirpes sendo estas definidas como um isolado ou um conjunto de isolados que possuem mesmo fenótipo e/ou genótipo o diferenciando de outros da mesma espécie (122).

Para a caracterização destas estirpes podem ser utilizados métodos fenotípicos e genotípicos. No caso, da *L. pneumophila*, o método fenotípico mais utilizado é baseado em anticorpos monoclonais (MAb) direcionados contra os epítomos dos lipopolissacarídeos da superfície celular bacteriana através da técnica de imunofluorescência (29). Foram utilizados dois painéis até o momento para identificação dos serogrupos, o de Joly e o painel de Dresden sendo este último recomendado pelo Grupo Europeu de Estudo para Infecções por *Legionella* (ESGLI). Dos métodos de genotipagem, o método padrão para subdividir a espécie *L. pneumophila* consiste na técnica de Tipificação Baseada em Sequências (SBT). Na tipificação da estirpe pela SBT estudam-se as sequências de sete alelos (*fla A*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* e *neuA*) para estabelecer o perfil alélico ou tipo de sequência (ST). Esta metodologia possibilita que sejam comparados os resultados obtidos com STs já conhecidos, os quais estão disponíveis no banco de dados do Grupo de Trabalho Europeu para Infecções por *Legionella* (EWGLI), (59).

Em Portugal, a diversidade genética de *Legionella* foi caracterizada ao serem analisados 89 isolados clínicos, coletados entre 1987 e 2012, em 22 hospitais das cinco regiões do país. Todas as amostras eram de *Legionella pneumophila* e, pela análise utilizando o protocolo de SBT, foram caracterizados 30 STs, dos quais, doze únicos em Portugal. O ST100 foi o mais encontrado, tendo sido identificado em 32 isolados epidemiologicamente relacionados. Com este estudo podemos perceber que a população de bactérias do género *Legionella* que causam doença são da espécie *L. pneumophila* e das estirpes temos uma mistura em relação a sua filogenética, ou seja, umas que foram apenas encontradas neste país e outras que são encontradas em todo o mundo (19).

1.1.3 Características do género

As bactérias do género *Legionella* são bacilos gram-negativos, intracelulares, aeróbicos, sem formação de esporos. São o agente etiológico da Doença dos Legionários e da Febre de Pontiac (4,27, 29, 37, 42, 85, 92, 94).

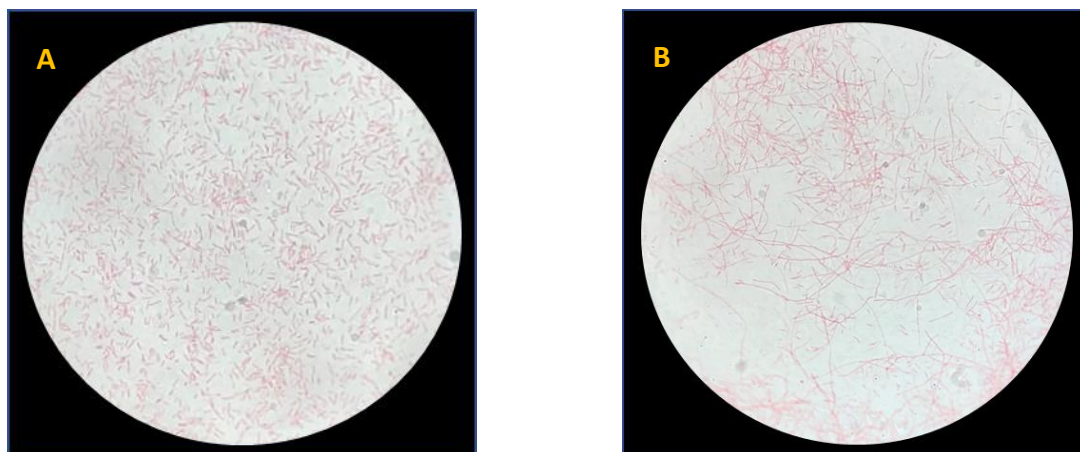


Figura 1 – Morfologia dos bacilos de *Legionella* analisada através da coloração pelo método de Gram (1000x) após cultura em BCYE com incubação de 48h a 37 °C: **A**, bacilos curtos (estirpe de referência – *L. pneumophila* ATCC 33152), e **B**, bacilos filamentosos (estirpe clínica – *L. pneumophila* sg1 genótipo ST 37), fotos recolhidas durante o presente trabalho.

As bactérias do género *Legionella* medem geralmente de 0,3 a 0,9 µm de largura com 1,5 a 20 µm de comprimento (27, 29, 37, 70) (Figura 1). São móveis com um ou mais flagelos na posição polar ou subpolar. Normalmente, a *Legionella* é encontrada como pequenos cocobacilos (medindo 0,3 a 0,6 µm por 3 µm) nos tecidos ou secreções infetadas e tornam-se alongadas e filamentosas (com 8 a 50 µm de comprimento) quando presentes em certos meios de cultura (29, 37, 70, 85).

Estas bactérias são ubíquas de ambientes aquáticos de água doce, assim podem ser encontradas em rios, lagos e sistemas de água produzidos artificialmente como torres de arrefecimento, equipamentos industriais, mecanismos de irrigação, sistemas de canalização domésticos, chuveiros, banheiras de hidromassagens, fontes de água, spas termais, dispositivos respiratórios e nebulizadores (4, 11, 27, 29, 37, 42, 92, 94, 104, 117, 123). Algumas espécies, como a *L. longbeachae*, foram encontradas em misturas de terras e compostagem nos EUA, Austrália e Reino Unido, além de solo de terras agrícolas tailandesas (85, 121).

Na natureza, estas bactérias parasitam amibas e protozoários ciliados, os seus hospedeiros naturais, que lhes propiciam um fornecimento de nutrientes e proteção contra biocidas, antibióticos, ácidos, stress osmótico e térmico (4, 29, 41, 42, 92, 94). Devido à estreita relação entre hospedeiros e patógenos, na sua coevolução pode haver troca de material genético através da transferência horizontal de genes (HGT). Assim a *Legionella* pode ter adquirido genes eucariotas o que resultou no desenvolvimento de mecanismos que permitem infectar células humanas, ou seja, a adaptação da *Legionella* à vida intracelular nos seus hospedeiros naturais causou um acumular de genes de virulência distintos que coletivamente permitiram a replicação em macrófagos (1, 65, 98).

Esses protozoários parasitados com *Legionella* são encontrados frequentemente nas comunidades microbianas formando os biofilmes os quais garantem a sua persistência no meio, favorecem a sua disseminação, parecem ampliar a sua resistência e a sua virulência (2, 42, 94, 105, 109). Estudos provaram que os fatores de virulência, como a presença de pili, proteínas de superfície e a produção de enzimas, variam de acordo com as cepas e os diferentes hospedeiros, proporcionando níveis variados de patogenicidade (10, 105). Portanto, a *Legionella* pode ser encontrada naturalmente em biofilmes e a prevenção da sua formação é também uma medida importante de controle da proliferação e virulência da bactéria (1, 37, 109, 113).

Alguns fatores que aumentam a formação destas organizações de microrganismos são a presença de nutrientes, corrosão, incrustações, a manutenção da temperatura da água entre 25°C e a 50°C e a estagnação ou baixo fluxo da água (11, 37, 94, 113, 118). Portanto, deve ser dada atenção ao encerramento de edifícios ou partes deles, pois pode aumentar o risco de crescimento de *Legionella* nos sistemas de água e equipamentos associados se não forem mantidas as condições de prevenção adequadas (118). A *Legionella* é encontrada em maior quantidade em habitats aquáticos artificialmente construídos e neste meio ela pode sobreviver não apenas em protozoários, mas também em fungos (2, 41). Estas bactérias resistem a pH de 5,0 a 8,5 e a temperaturas entre 0°C e 68°C, sendo ótima entre 35°C e 45°C (11, 37, 42, 94).

O ciclo de vida da *Legionella* é bifásico, ou seja, possui uma fase replicativa e outra transmissiva sendo que a bactéria apresenta morfologia distinta em cada uma das fases.

Através de proteínas de superfície existentes na membrana externa da bactéria, ela adere, e penetra no hospedeiro por da fagocitose. Com diferentes sistemas de secreção de proteínas, o bacilo irá controlar o metabolismo da célula hospedeira para o fornecimento de nutrientes e para impedir a sua destruição. Assim, nas estirpes virulentas, irá formar o vacúolo contendor de *Legionella* (VCL), ou seja, um compartimento único revestido por mitocôndrias, ribossomas e pequenas vesículas provenientes do retículo endoplasmático

que impedem a via endocítica bactericida pelos lisossomas estabelecendo um nicho replicativo seguro. Já nas estirpes não virulentas, o VCL irá fundir-se com o lisossoma o que provocará sua destruição. No meio intracelular, a bactéria inicia a fase replicativa e, quando os nutrientes se esgotam, ela entra na fase transmissível, podendo ficar numa forma intracelular madura (MIF), que consiste em cistos inertes e extremamente infeciosos. Ao evadir-se da célula parasitada irá iniciar um novo ciclo de infecção noutro hospedeiro ou entra na forma viável mas não cultivável (VBNC) a qual representa um estado metabólico lento não replicativo que garante a sobrevivência em ambientes severos (2, 4, 37, 92, 94, 131). Na forma replicativa, a bactéria apresenta-se filamentosa, não flagelada, resistente ao sódio e com baixa virulência, já na forma transmissível, o bacilo adquire flagelo tornando-se móvel, é curto, apresenta-se virulento e resistente ao stress. Esse ciclo de vida multifásico exige complexos mecanismos reguladores para controlar a diferenciação microbiana que, até o momento, só são parcialmente compreendidos necessitando de mais estudos (2, 4, 92, 94, 131).

Legionella é uma bactéria exigente que necessita de meios especiais para crescer no laboratório. Aproximadamente 30 espécies de *Legionella* podem infectar o homem sendo atribuído à *L. pneumophila* cerca de 90% dos episódios de doença, o que a caracteriza como a mais virulenta das espécies, assim como o seu serogrupo 1, que foi identificado em 70 % a 92% dos casos confirmados por cultura (29, 37, 72, 92). Outras espécies associadas à DL são *L. longbeachae*, *L. bozeman* e *L. micdadei* que representam 2 a 7% das infecções por *Legionella* (92).

1.2 Doença dos Legionários

A Doença dos Legionários é uma pneumonia atípica causada pelas bactérias do género *Legionella* (29). Como já foi referido estas bactérias são encontradas naturalmente nos ambientes aquáticos, porém, devido à criação de reservatórios de água artificiais, passou-se a favorecer sua proliferação mais próxima do homem provocando o desenvolvimento da Doença dos Legionários nas pessoas suscetíveis (85, 131). A palavra pneumonia deriva do grego *pneumonía* que significa inflamação do pulmão (15), define-se como uma doença do parênquima pulmonar a qual ocorre quando um agente infeccioso penetra no espaço alveolar, local onde acontece as trocas gasosas, provocando uma inflamação local. A Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) refere-se a uma pneumonia adquirida fora do ambiente hospitalar, ou não associada à prestação de cuidados de saúde (25, 38, 58, 95), diferindo então da Pneumonia Hospitalar (PH) ou Nosocomial (PN), isto é, do grego *nosokomeion* que refere ao local onde se tratam os doentes, hospital (15).

O diagnóstico de pneumonia é realizado na presença de tosse e um ou mais dos seguintes sintomas: expetoração, falta de ar, dor torácica, sinais focais no exame físico do tórax, por exemplo alterações do murmúrio vesicular ou fervores localizados, e pode-se achar manifestações sistêmicas como confusão, cefaleia, sudorese, calafrios, mialgias e febre as quais corroboram com opacidade pulmonar que pode ser detetada por radiografia torácica (25, 95). A PAC pode ser classificada em típicas e atípicas, embora exista uma polémica nesta divisão devido à dificuldade de sua distinção clínica (15). Na PAC típica, o patógeno responsável por até 75% dos casos é o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), ela apresenta quadro clínico-radiológico clássico geralmente com início súbito e predominantemente pulmonar com tosse produtiva, normalmente responde bem ao tratamento com β -lactâmicos e as amostras são cultiváveis em meio bacteriológico padrão (15, 81).

Já na PAC atípica, os agentes etiológicos não são os habituais, dentre eles, destacam-se a *Legionella spp.*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydophila pneumoniae*. No início dos anos 2000, foi estimado que as bactérias do género *Legionella* são responsáveis por 2 a 9% dos casos de PAC (9, 15, 31, 85). A incidência da *L. pneumophila* como agente etiológico da PAC foi estimada ser de 4% nos EUA e Canadá, 9% na Europa, 3% na América Latina e 6% na Ásia e África (9). Na Austrália, a incidência de *Legionella* como causa da PAC foi de 3,4% (31). Nos Estados Unidos, esta bactéria é responsável por aproximadamente 8.000 a 18.000 hospitalizações por ano (85).

Em Portugal, a *Legionella spp.* foi responsável por 4% dos doentes com PAC hospitalizada e 6% dos doentes com PAC que necessitaram de cuidados intensivos (95). No Brasil, a DL não é uma doença de declaração obrigatória e estima-se que 6% das mortes por pneumonia tenham como causa a *L. pneumophila*. Em 2013, ocorreram cerca de 5.000 mortes relacionadas a infeções por *Legionella* neste país (89). A incidência da DL difere conforme a localização geográfica podendo ser responsável por até 16% dos casos de PAC, ocorrendo mais casos na bacia Mediterrânica e em doentes com mais comorbidades (15).

Os patógenos atípicos desenvolvem um quadro diferente do clássico, caracterizado com frequência por uma pneumonia apresentando manifestações sistêmicas, que não respondem bem ao tratamento com β -lactâmicos e não são cultiváveis em meio bacteriológico padrão, ou seja, gelose de sangue e gelose de chocolate (15, 81). A DL é uma pneumonia atípica cujos sintomas podem levar a uma doença grave que necessita de internamento hospitalar e potencialmente ocasionar a morte. A *L. pneumophila* comporta-se como um patógeno oportunista do ser humano ao infetar os macrófagos alveolares quando a bactéria é inalada sobre a forma de aerossóis (94). Como já foi referido, quando os macrófagos fagocitam a *Legionella*, inicia-se uma complexa cascata de processos, incluindo a inibição da destruição oxidativa, modificações no transporte de organelas, a redução da acidificação e o bloqueio da maturação do fagossoma. Com isso, a bactéria inibe a atividade biocida do fagócito e converte o fagossoma num local para sua replicação (29).

As bactérias multiplicam-se e ao acabarem os nutrientes, evadem-se provocando a apoptose dos macrófagos (4, 94). Assim, elas podem infectar novos macrófagos disseminando a infeção pelo pulmão com inflamação nos alvéolos e, portanto, dando origem à pneumonia. A doença pode progredir causando dano alveolar difuso e grave destruição do tecido pulmonar levando à morte (41). Os pacientes mais suscetíveis são os que apresentam comorbidades que dificultam ainda mais a resolução do quadro favorecendo o seu agravamento.

Parar eliminar a *Legionella*, pode-se aquecer a água entre 70 °C e 80 °C, realizar limpeza e desinfecção das canalizações como através da hipercloração, da utilização de radiação luz ultravioleta e unidades de ionização de cobre-prata (11, 89).

1.2.1 Dados Epidemiológicos

Desde 1977, a prevalência da DL está a aumentar, segundo os dados do ECDC, gráfico 1, possivelmente devido a um maior conhecimento da existência desta doença, a novos métodos diagnóstico, ao envelhecimento da população e ao aumento da ocorrência de comorbidades (29, 99).

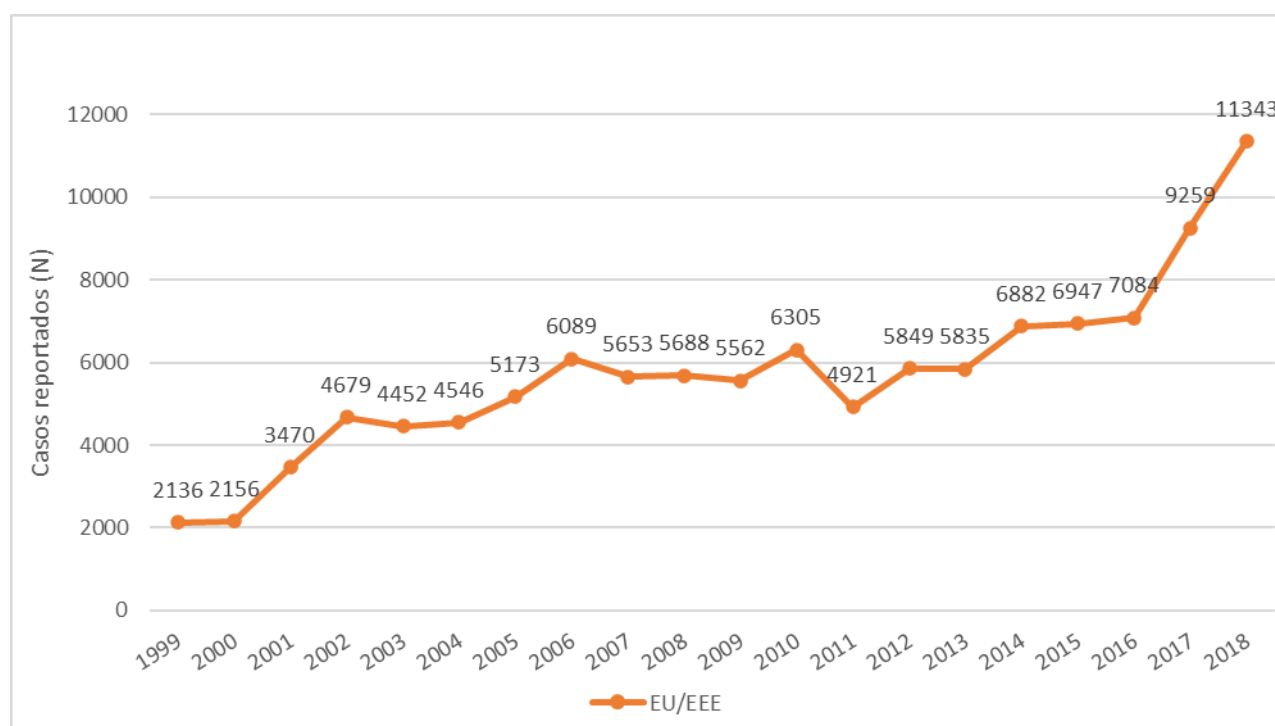


Gráfico 1 – Distribuição do número de casos reportados associados a DL na EU/EEE entre 1999 e 2018 (39, 48, 131).

Apesar deste aumento, existe a percepção que há uma subnotificação dos casos, um número elevado de pessoas infectadas não é notificado porque o sistema de vigilância é ineficiente ou a notificação não é

obrigatória, falta de informação sobre a doença, indisponibilidade de meios para diagnóstico (29, 85, 99, 104, 110). Atualmente a DL está cada vez mais importante do ponto de vista de saúde pública por ser uma pneumonia potencialmente grave com distribuição por todo mundo. Já a febre de Pontiac vem sendo relatada com menos frequência que anteriormente (77, 90), provavelmente por ser benigna, autolimitada e facilmente confundida com outras patologias.

Na história da doença destacam-se algumas datas como 1957, ano em que uma doença respiratória aguda de causa desconhecida na qual 78 pessoas foram hospitalizadas e 2 morreram em Austin, Minesota (97). Todos os doentes eram funcionários de uma fábrica de embalagens de carnes e este acontecimento ficou documentado como o primeiro surto de DL (97). Posteriormente, outros surtos têm sido retrospectivamente identificados (85, 131).

Segundo o relatório epidemiológico anual da Rede Europeia de Vigilância de Doença dos Legionários (ELDSNet) publicado em 2019, o número de notificações aumentou de 1,2 por 100 000 habitantes em 2013 para 1,8 por 100 000 habitantes em 2017. Nesse ano, os 30 países reportaram 9.238 casos. Destes casos foi possível efetuar o follow-up em 6.976 doentes dos quais 574 (8%) tiveram um desfecho fatal (43).

Houve um aumento de 30% na incidência de casos de 2016 para 2017, sendo Espanha, França, Itália e Alemanha responsáveis por 68% de notificações. Ainda de acordo com este relatório, a incidência na União Europeia e Espaço Económico Europeu (EU/EEE) variou entre menos de 1,0 por 100 000 habitantes em 13 países (Bulgária, Croácia, Chipre, Finlândia, Grécia, Hungria, Islândia, Irlanda, Lituânia, Polónia, Roménia, Eslováquia e Reino Unido) para mais de 3,0 por 100 000 em quatro países (Dinamarca, Itália, Holanda e Eslovénia). Esta discrepância na incidência revela uma provável subestimação nos países com taxas muito baixas, sendo uma prioridade o aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico e a estimulação para notificação da DL nestes locais (43).

A distribuição de casos obedece um padrão sazonal de ocorrência e 58% do total aconteceu entre junho e outubro. Dos casos notificados, 69% foram adquiridas na comunidade, 21% estiveram associados a viagens e apenas 8% associados a instalações de saúde, sendo os 2% restantes associados com outras situações. Em relação a idade, 91% dos casos foram pessoas com mais de 45 anos, apresentando uma taxa de notificação $\leq 0,1$ por 100 000 habitantes nos doentes com menos de 25 anos de idade subindo para 4,6 por 100 000 habitantes em pessoas com 65 anos ou mais. Em relação ao sexo, a DL predominou no sexo masculino, com uma razão global de 2,4:1. Na EU/EEE, o constante aumento do número de casos relatados, provavelmente deve-se vários aspetos, a melhoria da vigilância, o envelhecimento da população, padrões de viagens e mudanças nos fatores de clima e tempo provocando o aumento da proliferação bacteriana e/ou um aumento no uso de sistemas que produzem aerossóis (43).

Conforme o último relatório epidemiológico anual da ELDSNet, o número de notificações aumentou de 1,8 por 100 000 habitantes em 2017 para 2,2 por 100 000 habitantes em 2018, correspondendo um aumento de 23% no número de casos. Neste ano, foram relatados 11.343 casos de DL e 696 óbitos representando uma taxa de fatalidade de 8%. Observou-se uma maior notificação em quatro países (França, Alemanha, Itália e Espanha) representando 71% de todos os casos notificados.

As taxas de notificação variaram de menos de 1,0 por 100.000 habitantes em 10 países (Bulgária, Chipre, Finlândia, Grécia, Hungria, Irlanda, Lituânia, Polónia, Romênia e Reino Unido) a 3.0 por 100.000 ou mais em sete países (Bélgica, Dinamarca, França, Itália, Holanda, Eslovênia e Espanha (Figura 2).

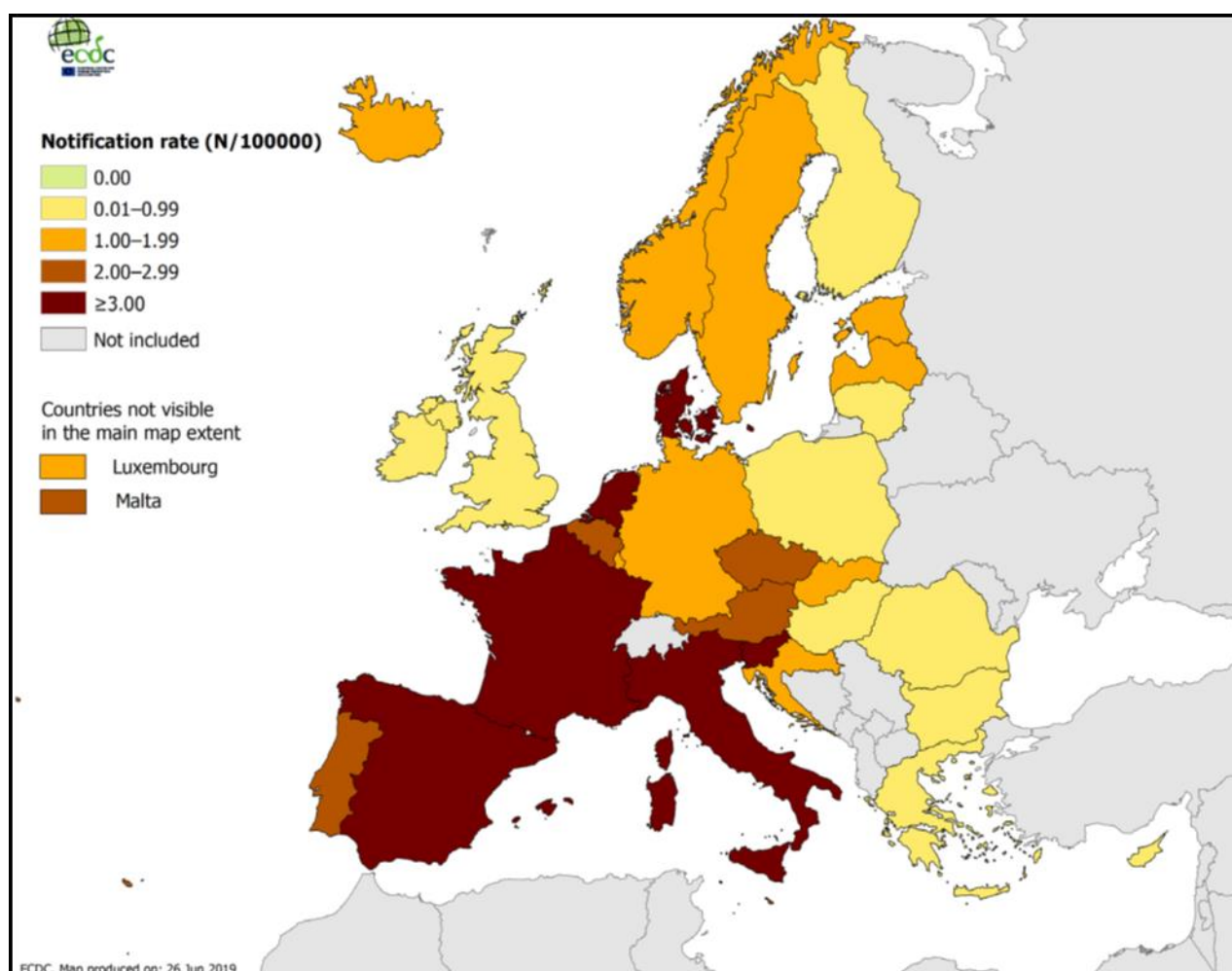


Figura 2 – Distribuição dos casos de doença dos legionários por 100 000 habitantes por país, UE/EEE, 2018 (47).

A maioria dos doentes eram do sexo masculino correspondendo a 70,7% dos casos. Em relação à idade, grande parte das pessoas (48,7%) apresentava 65 anos ou mais. Quanto à fonte de transmissão da infeção, foi reportado que 72% foram adquiridas na comunidade, 20% estiveram associados a viagens, somente 6% a instalações de saúde e 2% associados com outras situações ou não se conseguiu definir (47).

Nos Estados Unidos, a prevalência da DL tem vindo a aumentar, o número de casos relatados cresceu quase nove vezes desde 2000, chegando a quase 10.000 casos em 2018 (18).

1.2.2 Epidemiologia em Portugal

Em 1999, a Doença dos Legionários entra para as Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) conforme a Portaria nº 1071/98 de 31 de dezembro, mas somente em 2004 se torna exigida a notificação laboratorial com a criação do Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários através da circular normativa nº 5/DEP de 22 de abril. A vigilância da DL foi melhorada pela instituição de um Sistema de Vigilância em Saúde Pública através da Lei n.º 81/2009 de 21 de agosto. Entre 2004 e 2013, a incidência de DL foi de 0,9 casos por 100 000 habitantes com um registo de 870 casos (39, 48, 131).

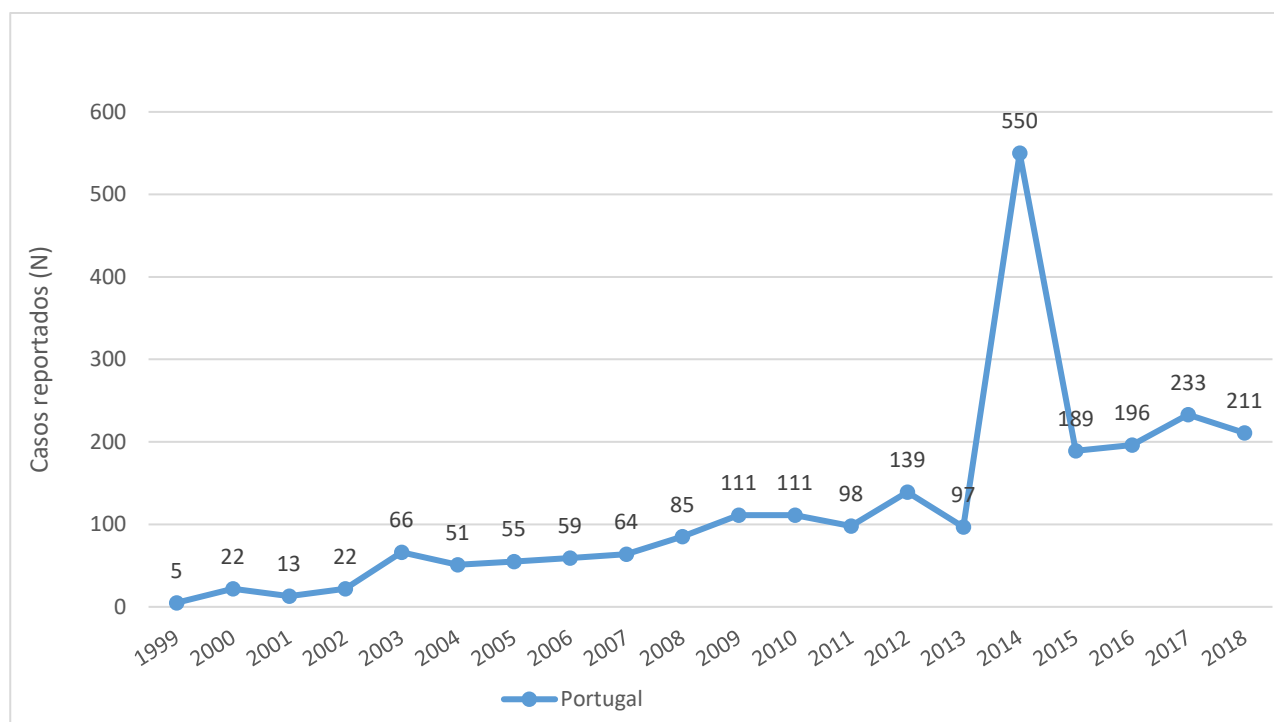


Gráfico 2 – Distribuição do número de casos reportados de DL em Portugal de 1999 a 2018 (39, 48, 131)

Em 2014, houve um surto de Doença dos Legionários no concelho de Vila Franca de Xira que representa a maior epidemia da DL já registada em Portugal (Gráfico 2) e está incluída entre as maiores relatadas no mundo. Foram identificados 403 casos dos quais 377 confirmados, destes 366 doentes necessitaram de hospitalização e 14 faleceram, equivalendo a uma mortalidade de 3,5%. Foram afetados 3 concelhos, o de Vila Franca de Xira, Loures e Lisboa, sendo o primeiro o que registou mais doentes. As investigações

microbiológicas indicaram como fonte de transmissão uma torre de arrefecimento de uma das fábricas existentes na região (26, 63, 115).

A partir de janeiro de 2015, tornou-se obrigatório a notificação eletrônica pela aplicação informática do SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica) que está disponível on-line (<https://sinave.min-saude.pt>) através do Despacho da DGS nº 5855/2014 de 5 de maio. Já a Portaria da DGS nº 22/2016 de 10 de fevereiro determina a obrigatoriedade de notificação eletrônica para todos os laboratórios a partir de janeiro de 2017 (39).

Desde 2015, o número de notificações de DL em Portugal mantém-se em média na ordem de 200 casos por ano (gráfico 2).

Dos surtos mais recentes destacam-se o de 2017, que ocorreu num hospital público integrado ao Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental onde ocorreram 58 casos e 5 óbitos, a maioria dos pacientes foram mulheres com 70 anos ou mais. Outro surto relevante aconteceu em 2018, num hospital particular também incluído no distrito de Lisboa onde foram relatados 15 casos e nenhuma morte. Necessitaram de internamento hospitalar 14 doentes sendo que 3 tiveram de recorrer a de terapia intensiva. A maioria foram mulheres e quase todos com idade superior a 50 anos (39, 111).

Em 2018, o número reportado de DL em Portugal foi de 211 casos dos quais 45% com idade entre 45 e 65 anos e 48% com idade de 65 anos ou mais. Quanto ao gênero, a maioria (68,2%) foi do sexo masculino. Quanto à fonte de infeção, em 58,3% dos casos a doença foi adquirida na comunidade, já 17% esteve associada a viagens, 12,3% a instalações de saúde e os 12,4% restantes não se conhece a origem (48). Em Portugal, houve um aumento do número de casos de DL que pode estar associado à obrigatoriedade da notificação e, devido ao surto de Vila Franca de Xira em 2014, pensa-se que ocorreu um maior incentivo à vigilância epidemiológica. Apesar disso, percebe-se uma certa estabilização do número de casos reportados nos últimos quatro anos, evidenciando a necessidade de novas medidas para evitar as subnotificações e subdiagnósticos.

Em novembro de 2020, as Autoridades de Saúde da região norte de Portugal comunicaram à DGS a identificação de um cluster de Doença dos Legionários que evoluiu até ao número de 76 casos. A média de idade dos doentes foi de 74 anos [46-97], no total ocorreram 13 óbitos com idades de 74 a 92 anos. O Instituto Nacional Saúde Dr. Ricardo Jorge analisou amostras de produtos biológicos dos doentes, tendo identificado o genótipo ST 15. A dispersão geográfica dos casos foi compatível com uma eventual fonte ambiental sujeita aos efeitos das alterações climáticas que se verificou em território nacional durante o período de incubação dos referidos casos. A investigação epidemiológica e ambiental foi desenvolvida pelas Autoridades de Saúde, de acordo com as normas e orientações da DGS. A avaliação ambiental conduziu a resultados PCR positivos para *Legionella pneumophila* nas torres de refrigeração de duas unidades fabris, pelo que foram

suspensas as suas atividades, após intervenção efetiva e comprovada laboratorialmente, foi autorizado o seu funcionamento. O evoluir da situação continua a ser acompanhada pelas Autoridades de Saúde.

1.2.3 Fatores de Risco

As pessoas mais suscetíveis à DL são as que apresentam idade superior a 50 anos, sexo masculino, tabagismo, condições debilitantes subjacentes como uso de imunossuppressores, doença pulmonar crônica, diabetes, doenças hematológicas malignas sob quimioterapia citotóxica, leucemia de células pilosas, tumores sólidos, tratamento com bloqueador do fator de necrose tumoral- α (FNT- α), recetores de transplante de órgãos e outras patologias pulmonares que facilitem uma infeção secundária (8, 29, 37, 92, 94, 101, 131).

Muitas vezes a DL ocorre no período de rejeição de recetores de transplante o que aumenta a morbilidade e mortalidade. A presença de neutropenia não é muito clara constituir um fator de risco e a infeção pelo HIV não se sabe ainda se favorece o surgimento da doença. O homem infeta-se inalando aerossóis de $<10 \mu\text{m}$ contaminados com a bactéria, provenientes de sistemas de água produzidos artificialmente (4, 29, 37, 104, 117).

Em 2016, foi relatado um caso de provável transmissão pessoa a pessoa que ocorreu durante o surto de Vila Franca de Xira, representando o único relato existente até hoje de infeção inter-humana (26, 42, 94, 115). Os números conhecidos apontam que na população em geral só 0,1 a 5% desenvolvem a doença, por outro lado, para as pessoas expostas que estão no hospital, 0,4 a 14% adoeceram (13, 109). A transmissão raramente ocorre após aspiração de água contaminada ou por contacto direto da água contaminada com feridas cirúrgicas. Para uma fonte causar infeção vai depender da concentração bacteriana, da virulência da *Legionella* colonizadora, da eficácia da disseminação e do tipo de aerossol. Já para uma pessoa adquirir a doença depende da exposição cumulativa a determinada fonte, ou seja, depende da distância da fonte, frequência e duração de exposição (29).

A incidência da DL tem um padrão sazonal, ocorrendo mais durante o verão, provavelmente devido ao aumento da temperatura favorecendo a proliferação da bactéria (37, 101) e ao aumento do uso de torres de arrefecimento dos sistemas de climatização. A legionelose adquirida na comunidade corresponde a 75% dos casos notificados tendo como principal fonte torres de arrefecimento industrial e sistemas de aquecimento, ventilação e ar condicionado (AVAC) (99, 104, 115, 117). Já na maioria dos casos esporádicos é muito raro conseguir-se determinar o foco da infeção devido à dificuldade de estabelecer uma ligação definitiva a uma fonte (94). Certas condições meteorológicas também influenciam no aumento na taxa de transmissão como chuva, humidade superior a 60% e baixa pressão (11, 99, 104). A espécie *L. longbeachae* já foi recuperada de solos agrícolas e associada a casos de DL cuja transmissão parece estar relacionada ao contacto direto com

a terra utilizada para vasos e à má higiene das mãos após práticas de jardinagem. Na Austrália e Nova Zelândia esta espécie chega a ser responsável por 30 a 55% dos casos (85, 93, 101).

1.2.4 Quadro clínico

A DL é uma pneumonia na qual os pacientes manifestam sintomas multissistêmicos sem um quadro patognomônico, apresentando-se como uma pneumonia atípica (21, 30). A história clínica cursa com um período de incubação de 2 a 14 dias, podendo chegar até 20 dias (13, 131), com ou sem pródromos como cefaleia, mialgia, astenia e anorexia. Frequentemente o doente apresenta febre acima de 38,8°C, exceto em alguns pacientes imunocomprometidos (21, 30, 42, 107, 131).

O paciente relata tosse geralmente seca, com dispneia que eventualmente é acompanhada de dor pleurítica (30% dos casos) (21, 37, 107, 109, 131). Pode estar presente uma bradicardia relativa, ou seja, uma frequência cardíaca abaixo do esperado apesar de febre (13, 42). Cerca de metade dos doentes têm sintomas gastrointestinais e/ou sintomas neurológicos (21, 42, 109). Entre os sintomas gastrointestinais pode surgir a diarreia (25 a 50% dos casos), náuseas, vômitos e dores abdominais (10 a 30% dos casos), (131). Dos sintomas neurológicos, a doença pode cursar com confusão e delírio (50% dos casos) (130), convulsões e perda da coordenação (ataxia) (13, 42, 109).

Descobertas laboratoriais inespecíficas são comuns, como a hiponatremia, a diminuição do fósforo no soro inicialmente, aumento da creatina quinase, mioglobínúria, leucocitose com linfopenia relativa, aumento da velocidade de sedimentação de hemoglobina, elevação dos níveis de proteína C-reativa, aumento das enzimas hepáticas, aumento da ferritina no soro (mais do que duas vezes) e hematúria microscópica (29, 42, 109).

Na radiografia torácica, o padrão é semelhante ao de outras causas de pneumonias não permitindo distinção entre elas (21, 131). Na DL é mais comum possuir um infiltrado irregular e unilobar que evolui para a consolidação encontrado mais nas bases pulmonares (42, 109). Em alguns pacientes imunossuprimidos, particularmente naqueles com uso de glucocorticoides, podem ocorrer opacidades nodulares redondas, expandindo-se e formando cavitações em aproximadamente 10% dos casos. Apesar da terapia adequada, as cavitações podem surgir até 14 dias após o início do quadro (29, 131). Alterações radiológicas podem continuar presentes por um período longo, mesmo depois da melhora clínica (131).

Muito ocasionalmente, a DL pode cursar com manifestações extrapulmonares, como esplenomegalia, ruptura do baço, pericardite, miocardite, infecções de feridas, endocardite, artrite, infecções do sistema nervoso central (29, 42).

Na doença grave, ocorre uma pneumonia com infiltrados pulmonares bilaterais, pressão arterial diastólica menor que 60 mm Hg e uma insuficiência respiratória que requer ventilação mecânica em 20% a

25% dos casos (13, 64). Quanto ao prognóstico, tem sido referido que a taxa de letalidade varia de 5% a 30% em vários surtos de PAC enquanto que para a pneumonia adquirida no hospital, essa taxa pode atingir 28% (109).

1.2.5 Diagnóstico

De acordo com as recomendações da Sociedade Portuguesa de Pneumologia, deve pesquisar-se *Legionella* em todos os casos de PAC com necessidade de internamento quando há um surto por esta bactéria, nos doentes com PAC grave na presença de fatores de risco e nos pacientes que não respondem ao tratamento antibiótico empírico (86, 95). O diagnóstico laboratorial pode ser feito por cultura do agente em amostras respiratórias ou tecidos, pela pesquisa de antígenos em secreções respiratórias ou tecidos, pela pesquisa de antígenos na urina, pela pesquisa de anticorpos no soro ou pela pesquisa do DNA (85).

A definição de caso de Doença dos Legionários para União Europeia consiste na presença do critério clínico, pessoa com pneumonia, e de um ou mais critérios laboratoriais (46).

Critérios laboratoriais para caso confirmado:

Pelo menos um dos três seguintes:

- Isolamento de *Legionella* spp. de secreções respiratórias ou outra amostra biológica de local estéril;
- Detecção de antígeno *L. pneumophila* na urina;
- Aumento significativo no título de anticorpos específicos para o serogrupo 1 de *L. pneumophila* em amostras de soro emparelhadas;

Critérios laboratoriais para um caso provável:

Pelo menos um dos quatro seguintes:

- Detecção do antígeno *L. pneumophila* em secreções respiratórias ou tecido pulmonar usando reagentes derivados de anticorpos monoclonais;
- Detecção de *Legionella* spp. por pesquisa de DNA em secreções respiratórias, tecido pulmonar ou outra amostra biológica de local estéril;
- Aumento significativo do título de anticorpos específicos para *L. pneumophila* não sg1 ou outra *Legionella* spp. em amostras de soro emparelhadas;
- Aumento de título numa única amostra de soro do anticorpo específico para *L. pneumophila* sg1.

1.2.5.1 Cultura

A identificação do agente etiológico a partir de amostras respiratórias ou de tecidos é considerado o método padrão e permite o diagnóstico de “caso confirmado” da DL (85). Na Europa, só 10% dos casos de DL utilizando este recurso para o diagnóstico (47). As investigações epidemiológicas completas implicam a comparação dos isolados ambientais e clínicos em busca da relação de causa/efeito pelo que a realização da cultura é fundamental para a realização destes estudos.

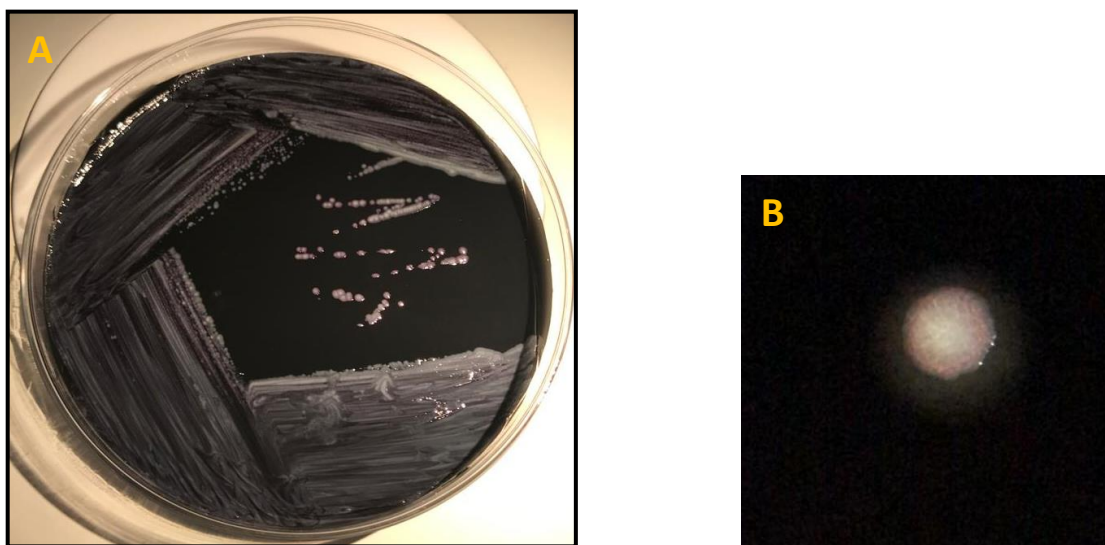


Figura 3 – Cultura de *L. pneumophila* em BCYE- α com incubação de 48h a 37 °C. **A)** A olho nu, as colônias tem cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, são redondas, de bordas ligeiramente irregulares, convexas, translúcidas, de superfície lisa e brilhante, **B)** Analisadas à lupa com amplificação de 40x, apresentam a aparência típica de vidro fosco (moído) e tom anilado, fotos recolhidas durante o presente trabalho.

As culturas dispõem de uma especificidade de 100%, mas apresenta uma sensibilidade baixa, que varia de 20 a 80% dependendo do tipo de amostra, se foi realizado terapia antibiótica prévia, do requisito fastidioso da bactéria e da composição do meio utilizado para seu isolamento (29, 31, 42, 85). Amostras respiratórias tem de obedecer a um parâmetro de qualidade, isto é, ser uma amostra de trato respiratório inferior, ou seja, expetoração e não saliva, na avaliação microscópica, através da observação pela ampliação de 100x da lâmina corada pelo método de Gram, apresentar menos de 10 células epiteliais e mais de 25 leucócitos, por campo examinado (7, 24). Geralmente as colônias surgem ao fim de 3 a 5 dias de incubação da cultura (Figura 3), mas somente a partir do 10º dia de incubação que podemos classificar as amostras como negativas devido ao caráter fastidioso da *Legionella* (29, 85). A olho nu, as colônias tem cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, são redondas, de bordas ligeiramente irregulares, convexas, translúcidas, de superfície lisa e brilhante e, quando analisadas à lupa com amplificação de 40x, apresentam a aparência típica de vidro

fosco (moído) e tom anilado (Figura 3). A temperatura ótima de crescimento para *Legionella* é de 35°C. Uma atmosfera de 2 a 5% de CO₂ pode facilitar o crescimento de algumas espécies (29, 42).

Requerem meios especiais para cultura, pois são bactérias nutricionalmente exigentes sendo o meio mais utilizado o que é formado por cisteína, ferro, extrato de levedura, carvão, ácido α -cetoglutarato (buffered charcoal yeast extract agar) (29, 85). Neste meio o carvão ativado serve para adsorção do peróxido de hidrogênio e de radicais superóxidos produzidos pelas bactérias que, devido seu crescimento fastidioso, vão-se acumulando e originando um ambiente nocivo para o crescimento da *Legionella*. O tamponamento é realizado para se obter um pH 6.9 (37). Os sais de ferro e a L-cisteína são vitais para seu crescimento. Por tudo isso, é imprescindível informar ao laboratório quanto se tem a suspeita de DL para que a cultura seja realizada no meio adequado. A aplicação de antibióticos no meio para torná-lo seletivo é muito útil quando a amostra é proveniente de locais não estéreis, permitindo assim selecionar o crescimento da *Legionella* e inibindo o crescimento de microrganismos contaminantes. Como é o caso de amostras de expetoração, aspirado traqueobrônquico e lavado broncoalveolar onde podemos encontrar outros agentes que fazem parte da microbiota pulmonar, tais como, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella* e potenciais patógenos, como *Haemophilus*, *Neisseria* e *Pseudomonas* (28). Os antimicrobianos frequentemente adotados são a polimixina B para evitar o crescimento de gram-negativos, a anisomicina contra fungos e a vancomicina evitando a proliferação dos gram-positivos (37). Exemplo destes meios seletivos tem-se BCYE suplementado com cefamandol, polimixina B e anisomicina formando o meio BMPA; BCYE suplementado com glicina, vancomicina, polimixina B e cicloheximida chamado GVPC; BCYE suplementado com glicina, vancomicina, polimixina B e anisomicina constitui o MWY. Os meios ainda podem apresentar adição de corantes para diferenciar as espécies de *Legionella*, como DGVP e MWY (40, 119).

Uma importante limitação para a realização do método cultural consiste em que mais da metade dos doentes desenvolvem tosse seca (37), pelo que se o paciente não apresentar expetoração, amostra só pode ser obtida através de um aspirado naso-traqueal e se o paciente estiver em ventilação mecânica, a amostra pode ser obtida com realização de aspiração endotraqueal, lavado broncoalveolar ou toracocentese (em caso de derrame pleural), (24).

1.2.5.2 Pesquisa de antígenos na urina

A pesquisa de antígeno na urina, também chamada de antigenúria, é o teste de primeira linha e o de execução mais rápida, obtendo-se a resposta ao fim de 15 a 30 min. Pode ser realizado após início da antibioticoterapia e a pesquisa pode efetuar-se por ELISA ou imunocromatografia (85). Em 2014, dos casos de DL na Europa, 87% foram diagnosticados por este método (45). É o método para diagnóstico de DL mais realizado no mundo e tem ajudado na identificação de surtos epidêmicos, possibilitando uma ação mais rápida das autoridades de saúde (39). O antígeno pesquisado é um componente lipopolissacarídeo da

parede celular que começa a ser excretado nos 3 primeiros dias após o início dos sintomas, mas pode permanecer positivo até 2 meses ou mais, o que complica o diagnóstico em pacientes com pneumonias recorrentes (29, 85). Apresenta uma especificidade de 95 a 100% e uma sensibilidade de 70 a 90% (13, 29, 31, 37, 42, 85).

O teste da antigenúria pode falhar em até 30% dos casos de DL, dependendo da concentração do antígeno na urina e tem a limitação de atualmente apenas estar disponível para *L. pneumophila* sg1. Assim, resultados negativos não excluem a DL e resultados positivos dão o diagnóstico de “caso confirmado” somente para *Lp* sg1 (85).

1.2.5.3 Outros métodos diagnósticos

A pesquisa de antígeno em amostras respiratórias e tecidos por imunofluorescência direta permite uma resposta mais rápida com 2 a 4h e pode ser realizada após início da antibioticoterapia. Apresenta uma especificidade de 95% e uma sensibilidade de 25 a 75%, pois depende da qualidade da coloração, da habilidade do operador e de reações cruzadas com outras bactérias. Permite o diagnóstico de “caso provável” (29, 42). Este método é atualmente utilizado em menos de 1% nos países europeus (45).

A pesquisa de anticorpos no soro é comumente realizada por imunofluorescência indireta ou ELISA. Esta pesquisa é mais utilizada para estudos científicos de prevalência da doença e retrospectivos em casos de pneumonia de etiologia desconhecida. São necessárias duas amostras de sangue do doente com intervalo de pelo menos 10 dias para avaliar a seroconversão (aumento de quatro vezes o primeiro título). A primeira amostra de sangue deve ser realizada depois das duas primeiras semanas do início dos sintomas, pois é quando geralmente os anticorpos aparecem (29). Foi relatado que na maioria dos pacientes com cultura positiva para DL, a seroconversão não foi detectável até pelo menos três semanas após infecção e ela nunca ocorre em um quarto dos pacientes, pelo que este método não tem muita utilidade para o diagnóstico clínico de fase aguda. E há, nos pacientes imunossuprimidos que podem nem produzir anticorpos (29, 85). Pode haver também reações cruzadas com outras bactérias o que provoca falsos positivos prejudicando a especificidade. Este exame apresenta uma sensibilidade de 41 a 94% (37). Na Europa, o ECDC constatou a sua utilização em apenas 5% dos casos de DL reportados (45).

Por este método, teremos “caso confirmado” quando tivermos a seroconversão, com um 2º título igual ou superior a 128 para *Lp* sg1 e “caso provável” quando tivermos uma seroconversão para outra espécie ou serogrupo ou um título único superior ou igual a 256 (69).

A pesquisa do DNA é realizada por PCR, permite a identificação de todas as espécies de *Legionella* e não sofre influencia pela viabilidade da bactéria podendo ser realizada após o início do tratamento. Até ao momento, as técnicas para pesquisa de ácidos nucleicos ainda não estão padronizadas para DL (37). Conta com uma especificidade de 100% e foram relatadas sensibilidades de 80-100% para secreções do trato

respiratório inferior, de 30-80% para o soro e 0-90% para as amostras de urina (29, 85). Resultados positivos são considerados diagnóstico de “caso provável”. Na Europa, este método foi utilizado em 8% dos casos de DL (44).

1.2.6 Terapêutica Recomendada para DL

O tratamento da DL é realizado com fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclina e rifampicina (36, 68, 90, 129, 131). A maioria das bactérias desenvolvem resistência à rifampicina, por isso, ela só deve ser usada em associação fornecendo um efeito sinérgico positivo no tratamento contra *Legionella* (36, 116, 120). Esses antimicrobianos constituem o tratamento adequado, pois apresentam a capacidade de atingir uma concentração terapêutica no interior das células eucarióticas, e por isso são eficazes contra a *Legionella* que é um patógeno intracelular (36, 90, 129). Como foi referido anteriormente na sua maioria, a DL é uma pneumonia adquirida na comunidade e os pacientes são inicialmente tratados de forma empírica. A primeira linha de tratamento para as pneumonias são as penicilinas, pois a grande parte dos casos é devido a um número restrito de agentes que são suscetíveis a estes medicamentos. (54, 81, 125) Porém, os β -lactâmicos são pouco eficazes contra bactérias intracelulares e assim contra *Legionella* (15, 90, 129, 131). O tratamento empírico da PAC com estes antimicrobianos, leva à ocorrência de falhas terapêuticas nos casos ocasionados pela *Legionella*, provocando um atraso no início do tratamento adequado o qual representa o principal fator prognóstico da DL (13, 37, 64). Do tratamento recomendado, testes *in vitro* sugerem que os macrolídeos mais novos e as fluoroquinolonas tem uma melhor atividade contra a *Legionella*, além de terem menos efeitos secundários que a eritromicina, como flebite, distúrbios do trato gastrointestinal e interações medicamentosas (35, 37, 71, 95, 100, 116, 120, 131). A azitromicina possui maior acumulação no interior dos leucócitos e macrófagos alveolares que a claritromicina, o que poderá significar uma melhor eficácia *in vivo*, além de apresentar menos administrações diárias, menor volume de soro diário para diluição do antibiótico na administração IV e duração do tratamento mais curta (95). Atualmente, para principal tratamento para DL temos a azitromicina ou a levofloxacina (17, 61, 64, 101, 112, 116, 125). Pois, estes antibióticos apresentam maiores penetrações pulmonares, atividades mais potentes nos pulmões, melhores farmacocinéticas com posologias apenas de 1 a 2 vezes ao dia, bom perfil de segurança devido menores interferências com outros medicamentos. (125). O tratamento com fluoroquinolona deve ser preferido em pacientes com longa permanência e aqueles com infeção hospitalar para permitir uma maior cobertura de outros bacilos gram-negativos; e a recetores de transplante para evitar interações entre macrolídeos e medicações imunossupressoras (125). Nas formas mais graves da doença, a terapia com fluoroquinolonas parece ter maior eficácia que uso de macrolídeos, pois apresentam menor duração do internamento hospitalar, verifica-se uma diminuição da mortalidade, maior índice de doentes com cura clínica e menor

frequência de complicações (37, 100, 125). Apesar das fluoroquinolonas serem utilizadas há mais de 30 anos, a Food and Drug Administration (FDA), agência de proteção ao consumidor de medicamentos e alimentos do governo dos Estados Unidos da América, emitiu alertas sobre efeitos colaterais com o uso destes antibióticos, porém ressalva que os benefícios superam os riscos nos casos de infecções graves devido a bactérias suscetíveis ao antibiótico, como pneumonias ou infecções intra-abdominais (55).

A duração total do tratamento para pneumonia por *Legionella* varia de 7 a 10 dias e, para imunossuprimidos mais graves, vai até 21 dias (125). A importância da precocidade da terapia eficaz do paciente constitui o principal fator prognóstico já que está comprovado diminuir a mortalidade, pois a infecção tem progressão rápida e pode afetar vários órgãos (13, 37, 64). Curiosamente, mesmo com a terapia adequada, tem sido relatado na literatura falhas com o uso de macrolídeos e/ou fluoroquinolonas (90, 129).

1.2.6.1 Mecanismos de ação dos antibióticos

Os macrolídeos e as tetraciclina possuem atividade bacteriostáticas, já as fluoroquinolonas e a rifampicina possuem efeito bactericida. Algumas classes de antibióticos agem nos ribossomas das bactérias, que são formados pelas subunidades 30S e 50S, e não prejudicam os ribossomas das células animais porque eles são estruturalmente diferentes, são formados pelas subunidades 40S e 60S. Os macrolídeos atuam após a ligação com recetores localizados na subunidade 50S do ribossoma, particularmente na molécula 23S do RNA, impedindo a síntese das proteínas, interferindo na translocação e transpeptidação. As tetraciclina também agem no ribossoma bacteriano, porém ligam-se à subunidade ribossômica 30S impedindo que o RNA transportador se ligue ao complexo RNA mensageiro-ribossoma, assim inibindo a adição de novos aminoácidos durante a síntese de proteínas. As fluoroquinolonas inibem a topoisomerase bacteriana IV e a DNA-girase ou topoisomerase II. A DNA-girase alivia a tensão produzida quando o DNA se desenrola durante a replicação e transcrição, assim, ao ser inibida, provoca a morte da bactéria, por isso esta enzima é o principal alvo utilizado quando o agente é uma bactéria gram-negativa. Ela é constituída por duas subunidades A e duas subunidades B que são codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respetivamente. As subunidades A constituem o local de ação das quinolonas. Relativamente à inibição da topoisomerase IV verifica-se que interfere na separação do DNA recém-replicado durante a divisão celular, sendo a inibição desta enzima mais significativa nas bactérias gram-positivas. As rifampicinas impedem a síntese de RNA ao inibirem a RNA polimerase, ou seja, inibem a transcrição do RNA (3, 16, 36, 56, 75, 126).

1.3 Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) pretendem estimar o sucesso ou o fracasso de um tratamento antimicrobiano perante uma infecção e assim classificar o microrganismo em tratável ou não tratável de acordo com a concentração do antibiótico utilizado. Para além desta importante função, existem outras mais amplas no âmbito da saúde pública como, determinar a epidemiologia local e os níveis de resistência dos microrganismos que circulam, aspetos fundamentais para a definição de uma terapia empírica e consequente diminuição da disseminação de organismos com mecanismos de resistência. Os dados obtidos com os TSAs são ainda importantes para determinar as taxas de desenvolvimento de resistência e identificar práticas que aumentem ou diminuam o seu aparecimento (73, 74).

Os TSAs podem ser realizados através de métodos fenotípicos e / ou genotípicos. Os métodos fenotípicos podem prever sensibilidade e resistência, enquanto, os métodos genotípicos preveem somente resistência. Nos métodos fenotípicos, a resistência e a sensibilidade são quantificáveis (73). Nestes testes, é verificado a sensibilidade do microrganismo na presença do antibiótico e a mínima concentração do antimicrobiano que deve ser usada para inibir o crescimento do microrganismo a qual recebe o nome de Concentração Inibitória Mínima (MIC). De acordo com os *breakpoints* do MIC, a bactéria pode ser classificada em sensível (S), indeterminada ou intermediária (I) ou resistente (R). Assim, um organismo cujo crescimento é inibido com uma concentração muito baixa é classificado como mais sensível que um outro que o é a uma concentração mais elevada.

Os *breakpoints* do MIC podem ser determinados diretamente, caso dos testes de sensibilidade, usando meio líquido ou ágar, ou podem ser determinados indiretamente quando convertidos em diâmetros da zona de inibição nas técnicas de difusão de disco (73, 74).

Durante a última década, foram observados fenômenos biológicos de resistência aos antimicrobianos e os pontos de interrupção projetados para orientar a terapêutica não refletem esses eventos. Eles não conseguem distinguir entre microrganismo com ou sem mecanismos de resistência nem permitem a sua deteção precoce e/ou reproduzível. Assim foi muito importante a evolução dos *breakpoints* do MIC com a harmonização entre métodos de determinação em diferentes países ou dentro de um mesmo país para permitir comparações fidedignas das taxas de resistência, monitorização do aparecimento de resistência em sistemas de vigilância internacionais e avaliação dos resultados das estratégias de intervenção. Sem a padronização destes *breakpoints*, da terminologia utilizada e das metodologias para a sua definição torna mais difícil a comparação dos resultados da vigilância antimicrobiana e o diálogo entre médicos, a indústria farmacêutica e as autoridades reguladoras (73, 74).

As determinações dos *breakpoints* requerem o conhecimento de um conjunto de dados, tais como, dosagem, as distribuições dos MIC de organismos sem mecanismos de resistência, a farmacocinética e a farmacodinâmica do antimicrobiano e os resultados clínicos em situações clínicas específicas. Este processo nunca foi, e provavelmente nunca será, exato ou estritamente científico; isto é, conterá sempre alguns elementos relacionados com a filosofia local havendo um compromisso entre todos os fatores (73, 74).

Em 1997, para padronizar os *breakpoints* do MIC na Europa, a Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas (ESCMID) criou o Comité Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST). No início, a harmonização foi apenas ilusória. Só a partir de 2002, o ESCMID reorganizou o EUCAST que estabeleceu *breakpoints* separados, um clínico para orientar a terapêutica e outro como valor de corte epidemiológico para detetar e monitorar mecanismos de resistência. Para isso, foi definida a estirpe selvagem ou wild-type (WT), estas estirpes não apresentam mecanismos de resistências fenotipicamente detetáveis. Atualmente, o termo “*breakpoint* microbiológico” refere-se ao ponto de interrupção clínico e é usado para definição de S, I e R. O valor de limite epidemiológico ou epidemiological cut-off value (ECOFF) refere aos microrganismos com mecanismos de resistência adquirida que são identificados quando há sensibilidade reduzida em comparação com o MIC mais elevado do WT (22, 73, 74). Isto é, separa as estirpes selvagens (microrganismos sem mecanismos de resistência) das não selvagem (microrganismos com mecanismos de resistência adquiridos) em relação ao agente testado (22, 51).

Em 2019, o EUCAST decidiu redefinir as definições das categorias dos testes de suscetibilidade, mantendo as abreviaturas de S, I e R. A necessidade de proceder a estas alterações vem na sequência da conscientização de que a definição de I gerava algumas dúvidas na classificação dos isolados. As mudanças nas categorias S e R foram mínimas, maioritariamente situaram-se na relação entre a suscetibilidade e o nível de exposição. Mas no que se refere à categoria I, as mudanças foram acentuadas e têm impacto clínico, técnico e na vigilância das resistências. E ainda, a alteração de alguns *breakpoints* (51).

Conjuntamente com estas alterações foi igualmente clarificado que o *breakpoint* está relacionado com o nível de exposição a que o microrganismo é sujeito. Sendo que, a exposição depende de vários fatores, tais como, as vias de administração (oral, intravenoso, etc), a dose, o intervalo de dosagem, o tempo de infusão, o metabolismo e a excreção do agente antimicrobiano (51).

Assim as novas definições classificam um microrganismo como S (suscetível) quando, num regime de dosagem padrão, é provável um sucesso terapêutico. Classificam como I (suscetível com exposição aumentada) quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico porque a exposição ao antimicrobiano foi aumentada, devido ao ajuste do regime de dosagem ou pelo aumento da concentração no local da infeção. Quanto ao conceito de resistente aplica-se quando há uma alta probabilidade de falha da terapêutica mesmo que se aumente a exposição. Em resumo, a diferença entre S e I é a quantidade de antimicrobiano

no local da infecção para obter a resposta clínica adequada. Deixa de haver a terminologia de estripe com sensibilidade intermédia, para passar a existir estirpes suscetíveis com exposição aumentada (51).

1.3.1 Testes de suscetibilidade antimicrobiana de *L. pneumophila*

A suscetibilidade da *Legionella* aos antibióticos é difícil de interpretar o que complica a realização rotineira destes testes pelo laboratório.

Os valores de *breakpoint* para definir resistência epidemiológica para a bactéria são limitados devido, por um lado, à falta de padronização dos TSA e à natureza fastidiosa da *Legionella*, por outro, devido ao seu carácter intracelular (50, 125).

O MIC obtido deve ser interpretado tendo em conta os níveis intracelulares já estabelecidos para cada antimicrobiano, portanto, os resultados *in vitro* e a evolução clínica são incertos (50). Por exemplo, apesar de boa atividade *in vitro* contra a *Legionella*, alguns antibióticos (como β -lactâmicos e aminoglicosídeos) apresentam fraca penetração intracelular tendo por isso uma resposta ineficaz na terapia (126).

Para realizar os testes de suscetibilidade antimicrobiana para *Legionella* são utilizados três métodos diferentes: teste de suscetibilidade extracelular (teste de diluição padrão em ágar ou em meio líquido), modelos intracelulares *in vitro* e modelos de infeção animal (29).

Os modelos intracelulares *in vitro* têm em consideração as concentrações intracelulares e as atividades dos antibióticos. Nestes testes têm sido usados macrófagos alveolares, monócitos humanos, neutrófilos, e modelos de cultura de tecidos usando linhas celulares tais como HeLa ou HL-60 (29). Para realizar os testes as células são contaminadas com *Legionella* e posteriormente adiciona-se ao meio de cultura um antimicrobiano. A capacidade do antimicrobiano para inibir o crescimento intracelular da bactéria é aferida através da quantificação da concentração de bactéria ao longo do tempo. O tempo que a bactéria necessita para voltar a multiplicar-se intracelularmente, após a eliminação do antimicrobiano do meio de cultura, é usado para definir a sua atividade intracelular.

Nos modelos de infeção animal, é avaliado o efeito da aplicação de um antimicrobiano a cobaias de laboratório infetadas com *Legionella*.

Em geral os métodos de infeção animal apresentam boa correlação com a suscetibilidade que se tem verificado nos casos de doença humana, porém, são tecnicamente complicados e caros. Além disso, a farmacocinética varia entre animais e pessoas, e não é possível testar ao mesmo tempo diferentes estirpes ou fármacos (29).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana extracelulares são realizados em meios convencionais e permitem a análise de diferentes estirpes e antimicrobianos ao mesmo tempo. Para o modelo extracelular podemos usar os meios líquidos aos quais são adicionadas várias diluições do fármaco. Estas são distribuídas

em poços de uma placa aos quais se adiciona uma cultura pura da bactéria, posteriormente quantifica-se o crescimento bacteriano. No caso de o antimicrobiano ser efetivo, não haverá crescimento bacteriano. Estes testes são mais baratos e de fácil execução. Para a realização do teste no meio sólido, inoculamos uniformemente a superfície do ágar com uma suspensão padronizada de cultura pura. No caso dos E-test aplicamos uma tira fina impregnada com um gradiente predefinido de antibiótico. Como esta tira apresenta uma escala exponencial de concentração do antimicrobiano, a bactéria irá crescer gerando uma zona de inibição em forma de uma elipse ao redor da tira. O MIC poderá ser lido no ponto de interseção da elipse com a tira. Esta técnica de relativa fácil execução, tem como desvantagem o custo considerável das tiras. Existe também o método de difusão em disco o qual contém uma concentração padronizada do antibiótico. Este disco é aplicado, como a tira, no meio sólido previamente inoculado com a cultura pura. A sensibilidade da bactéria é classificada de acordo com o diâmetro de inibição ao redor deste disco (29, 50).

No caso da *Legionella* existem diferentes meios sólidos para se realizar os TSAs, e com rendimentos diferentes (60). Os meios podem divergir em vários aspectos, por exemplo, quanto ao uso do carvão vegetal, que tem sido debatido há muito tempo, pois com sua adição, tem-se demonstrado uma elevação nos valores de MIC (14, 34, 66, 82, 83, 120). O carvão vegetal é necessário para viabilizar o crescimento da bactéria conforme mencionado anteriormente. No entanto, este composto pode provocar a absorção dos antibióticos alterando assim a sua atividade. Por esta razão, o MIC de alguns antimicrobianos é alterado neste meio (82, 120, 126). O meio de crescimento que se tem revelado mais adequado ao desenvolvimento da *Legionella in vitro* é o BCYE- α . Que, como já foi referido anteriormente, é constituído por extrato de levedura, carvão vegetal, ferro, L-cisteína, α -cetoglutarato. O pH do meio deve ser ajustado para pH 6,9, pois é o mais adequado ao crescimento da bactéria, pelo que se adiciona ácido N-2-acetamino-2-aminoetanossulfônico (ACES). A *Legionella* não cresce sem cisteína, pois este aminoácido é usado como fonte de energia, carbono e nitrogênio (37, 92). Outro nutriente essencial consiste no ferro que é necessário para a virulência e a replicação bacteriana, tal como foi demonstrado num estudo onde macrófagos e monócitos foram tratados com quelantes de ferros e depois infetados com *Legionella*, não suportaram sua replicação intracelular (2, 92). Outro é o α -cetoglutarato, composto importante para o metabolismo normal da bactéria (92).

Como a *Legionella* foi identificada há apenas cerca de 40 anos e poucos estudos foram realizados neste campo. O interesse maior surgiu nos últimos anos devido a relatos de falhas terapêuticas em pacientes com DL que, mesmo sendo tratados com os antibióticos adequados não apresentavam melhoras clínicas. Entretanto já foram identificadas algumas estirpes com mecanismos de resistência (14, 34, 35, 72, 80, 90, 106, 112, 114, 116, 120, 124, 129).

1.3.1.1 Determinações EUCAST para os TSA de *L. pneumophila*

O Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) é um comité permanente organizado pela Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID), Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) e pelos comités nacionais europeus (74). O EUCAST harmonizou os valores de *breakpoint* na Europa.

Em dezembro de 2017, o EUCAST publicou a diretriz para a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana de *L. pneumophila* (50). Pelo fato de haver incerteza na correlação entre o MIC e o resultado clínico para esta bactéria, foi preconizado utilizar este teste só para detetar mecanismos de resistência.

Podemos demonstrar a presença de mecanismos de resistência quando obtivermos MIC acima dos ECOFFs. Como ainda não havia dados suficientes para determinar os ECOFFs, o EUCAST disponibilizou uma tabela com distribuição de MIC indicando os pontos de interrupção para estirpes selvagens de *L. pneumophila* de diferentes serogrupos. Na determinação deveria ser utilizado o método recomendado no documento (Figura 4).

O documento apresenta um protocolo fácil, reproduzível e prontamente disponível para laboratórios de rotina. O meio indicado consiste em ágar de extrato de levedura de carvão tamponado suplementado com α -cetoglutarato (BCYE- α). O MIC é obtido utilizando os E-test devendo a leitura dos resultados ser realizada como anteriormente descrito, isto é, no ponto de interseção da elipse com a tira de gradiente. Para analisar a suscetibilidade do isolado compara-se o MIC visualizado com as distribuições de MIC apresentadas na figura 4. Assim, se o MIC estiver abaixo ou igual à MIC mais alto provisória para a população do WT, o isolado é suscetível. Se o isolado apresentar um MIC acima do MIC mais alto para organismos do WT, o isolado não é suscetível.

Figura 4 – Distribuições de MIC para *L. pneumophila* segundo o protocolo dos Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana para *L. pneumophila* publicado pelo EUCAST em 2017 (50).

Antimicrobial agent	n	≤0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	≥32	Reference ¹
Azithromycin	183			3	43	108	18	7	3			1			[1]
	100		8	31	43	1	8	6			3				[2]
Clarithromycin	183				1	110	70	1	1						[1]
	100		1	57	20	16	3	1						2	[2]
Erythromycin	183			2	30	119	25	5	1	1					[1]
	100			2	32	57	6	1					2		[2]
Ciprofloxacin	183						2	177	3	1					[1]
	100				3	35	57	2	1	2					[2]
Levofloxacin	183				2	1	177	2	1						[1]
	100			24	63	10		1	2						[2]
Moxifloxacin	183						2	176	5						[1]
	100					8	87	2	1		2				[2]
Rifampicin	183	7	132	39											[1]
	100		97	1						1	1				[2]
Doxycycline	183								5	48	106	24			[1]
	100			1			1	4	20	69	3	2			[2]
Tigecycline	183								1	15	82	80	5		[1]
	100						1	14	57	21	7				[2]

1: [1] incluí apenas o serogrupo 1; [2] incluí os serogrupos 1, 6, 8 e 10.

 MIC do WT

O EUCAST não determinou os MICs nem os intervalos alvo de controle de qualidade. Entretanto, os MIC de *Legionella pneumophila* NCTC 12821 e ATCC 33152 devem estar dentro do WT e devem ser utilizados para assegurar que as condições de crescimento sejam apropriadas. Já para o controle de qualidade das tiras de gradiente, deve ser seguida as orientações do fabricante para controle de testes em microrganismos não exigentes (50).

1.3.1.2 Mecanismos de Resistência das Bactérias

Um microrganismo apresenta resistência antimicrobiana quando o seu crescimento não é inibido pela maior concentração do antibiótico tolerada pelo hospedeiro (126). Mecanismos de resistência adquirido pela *L. pneumophila* são raros (50, 90), porém nos últimos anos têm sido relatados alguns casos (14, 34, 35, 72, 80, 90, 106, 112, 114, 116, 120, 124, 129).

Na fase inicial da descoberta da doença dos legionários, o tratamento realizado com o uso de eritromicina isolada ou em associação com a rifampicina, mas devido a relatos de falhas terapêuticas, no final

dos anos 80, começou-se a recorrer a outros antibióticos (88, 100). No início da década de 90, o tratamento de escolha passou a ser os macrolídeos e as e as fluorquinolonas mais recentes (62, 100). Em 2014, já se tinha demonstrado no Canadá a diminuição da sensibilidade à azitromicina, verificando-se que alguns isolados de *L. pneumophila* serogrupo 1 apresentaram MICs acima das estirpes WT (80, 90). Até o momento, foram relatados casos de resistência à ciprofloxacina devido a uma mutação pontual no gene *gyrA* (14, 50, 90, 112) e resistência aos macrolídeos que parece ser devido à bomba de efluxo LpeAB (72, 90, 124, 129) ou como mutações em genes que codificam a cadeia 23S RNAr e as proteínas ribossomais L4 e L22 (35, 72).

Em 2014, Bruin e colaboradores relataram o aparecimento de uma resistência. durante a terapia de um paciente com pneumonia grave internado num hospital holandês a ser tratado com ciprofloxacina. A *Legionella* do paciente foi investigada pelas autoridades nacionais de vigilância, foram realizados testes de suscetibilidade para ciprofloxacina com E-test, constatou-se um MIC fora do valor da gama de amplitude do tipo selvagem, caracterizando uma potencial resistência. É descrito na literatura a existência de mutações na Região de Determinação de Resistência à Quinolonas (QRDR) da topoisomerase tipo II (DNA-girase). Assim, foram pesquisados padrões de resistência na bactéria e foi identificada uma mutação pontual no QRDR do gene *gyrA*. Essa mutação consistia na troca do aminoácido da posição 83 (sistema de numeração de *Escherichia coli*) sendo esta troca responsável pela alteração da suscetibilidade à ciprofloxacina. Apesar da *Legionella* geralmente provocar uma pneumonia grave, neste caso, a doença foi agravada pela MIC elevada de ciprofloxacina do isolado. Segundo os autores este é o primeiro relato de uma *L. pneumophila* resistente a ciprofloxacina (14, 87).

Em 2015, foi realizado um estudo de coorte envolvendo 82 pacientes não relacionados com DL que tinham sido internados num hospital universitário na França entre 2006 e 2011. Foram recolhidas 139 amostras do trato respiratório inferior para diagnóstico. Todos os pacientes apresentaram teste de antígeno urinário para *L. pneumophila* positivo, em 15 pacientes foi obtido crescimento da *L. pneumophila* a partir da primeira amostra respiratória colhida, em 61 pacientes foi detetado o DNA da *Legionella* por PCR e 19 pacientes não possuíram teste positivo tanto por cultura como por PCR. Usando a combinação de pesquisas moleculares e genómicas, as amostras do trato respiratório inferior foram analisadas para a presença de mutações na *gyrA* QRDR durante o internamento dos pacientes. Foi detetado um aumento rápido de alelos mutantes *gyrA83* nas amostras de dois pacientes a fazer terapia com fluoroquinolona, um deles apresentou 94% de aumento de alelos mutantes no quarto dia de internamento e outro paciente mostrou 75% e 85% desse aumento no terceiro dia e quinto dia, respetivamente. Para este paciente, já havia sido colhida uma amostra no primeiro dia do internamento com o isolamento de uma estirpe de *L. pneumophila* sg1 sensível à fluorquinolonas. Este estudo demonstrou que nos doentes em análise havia uma população sensível à fluorquinolonas que foi reduzindo *in vivo* aumentando a população de mutantes *gyrA83* resistentes à

fluoroquinolonas. Estes dois doentes sofreram uma pneumonia grave e prolongada com recuperação após tratamento combinado de uma fluoroquinolona e um macrolídeo (112).

Em 2017, Descours et al. realizou um estudo no qual demonstrou que mutações em genes que codificam o 23S rRNA e proteínas ribossomais L4 e L22 conferiam diminuição da sensibilidade aos macrolídeos devido a uma mudança conformacional no ribossoma que dificulta a ligação destes fármacos (35). Relatos na literatura têm referido também o surgimento de maior tolerância aos macrolídeos devido à bomba de efluxo LpeAB (72, 129). A bomba de efluxo é um mecanismo de resistência no qual a droga é bombeada para fora da célula (36). Em 2017, Vandewalle-Capo e colaboradores correlacionaram a sensibilidade reduzida à azitromicina de amostras clínicas com a presença de genes LpeAB (124). Em 2019, Natås et al. analisou 122 isolados de *L. pneumophila* recolhidas entre 2001 e 2017 na Noruega, sendo 55 amostras de pacientes com DL e 67 amostras obtidas do ambiente. A resistência à azitromicina foi encontrada em 17,2% das estirpes e o genótipo ST1 mostrou que continha o componente da bomba de efluxo LpeAB (90). Em agosto do mesmo ano, a equipa de Jia publicou um estudo com 149 isolados de *L. pneumophila* sg1, recuperadas de amostras respiratória e de água do ambiente colhidas na China, entre 2005 e 2012. Destes 25 isolados apresentaram sensibilidade reduzida para azitromicina sendo identificada a expressão do gene da bomba de efluxo LpeAB como responsável pela resistência (72).

1.4 Objetivo deste estudo

Na Europa, a taxa de notificação de DL passou de 1,79 por 100 000 habitantes, em 2017 para 2,19 em 2018. Neste mesmo ano, foram reportados 11.343 casos e uma taxa de letalidade de 8%. Neste período, em Portugal foram reportados 211 casos e 16 óbitos (48). Esta doença geralmente causa surtos e devido ao impacto potencialmente grande sobre os recursos humanos, económicos, saúde, turismo, produtividade, comércio e indústria tornam a deteção e a investigação precoces destes surtos essenciais (49). A doença é uma importante causa de morbilidade e mortalidade e como os indícios apontam para um aumento gradual dos casos a DL, representa um problema em saúde pública (46).

A DL desenvolve uma pneumonia potencialmente grave que necessita de diagnóstico e terapêutica adequados o mais rápido possível em prol do prognóstico e da sobrevivência do paciente. Nos últimos anos, foram descritos relatos de falhas no tratamento de DL mesmo com o emprego da terapia adequada. Investigando estes casos, descobriram-se mecanismos de resistência aos antibióticos prescritos para tratar a infeção. Devido a esta diminuição da sensibilidade aos medicamentos de referência, há uma necessidade de investigar o desenvolvimento dessa resistência, prevenir novas falhas de tratamento ao direcionar antimicrobianos mais eficazes de acordo com a evolução apresentada por estas bactérias. Como a DL pode estar associada a alta taxa de letalidade é necessário vencer o desafio terapêutico.

O presente trabalho pretende conhecer o padrão de suscetibilidade das estirpes clínicas que foram identificadas em Portugal durante o período de 1987 a 2016 e monitorizar o desenvolvimento de resistências em isolados clínicos e ambientais recuperados num hospital da área de Lisboa com vários casos de infeção nosocomial, no período de 1987 a 2006.

A finalidade de conhecer a epidemiologia local de resistência antimicrobiana é relevante para a implementação de medidas de controle eficazes que combatam a propagação de microrganismos resistentes. Para mensurar a progressão do surgimento dessas resistências através da comparação com outros estudos e para prever mudanças em estirpes clínicas direcionando melhor o tratamento, evitando falhas terapêuticas.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Neste trabalho, foi analisada a suscetibilidade de 42 isolados de *L. pneumophila* a três antimicrobianos (azitromicina, ciprofloxacina e levofloxacina).

Durante todo o trabalho as manipulações que envolveram a utilização de bactérias seguiram as regras de boas práticas laboratoriais, tendo sido realizadas na câmara de segurança biológica (Nuair, ClassII).

2.1 Amostras em estudo

2.1.1 Proveniência das estirpes em estudo

As estirpes em estudo são provenientes da coleção do laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Médica, constituída por 178 isolados recuperados em Portugal entre 1987 e 2016 (Anexo I). Os isolados clínicos foram enviados por hospitais portugueses das cinco NUTS (Unidades Territoriais para Fins Estatísticos) de Portugal continental, os isolados ambientais foram recuperados da água do sistema de distribuição de um hospital da área de Lisboa com vários surtos ao longo de 29 anos (figura 5).

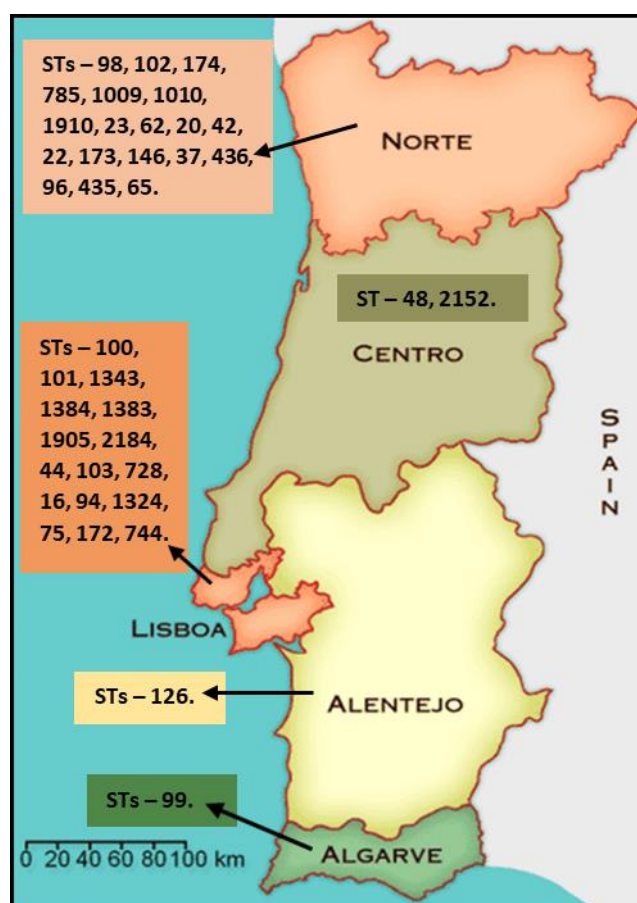


Figura 5 – Distribuição da coleção de estirpes de *L. pneumophila* com os perfis alélicos (ST) notificados de 1987 a 2016 por região em Portugal.

2.1.2 Seleção dos isolados para o estudo

De acordo com a classificação pela técnica SBT, existiram 39 perfis alélicos (ST) de *L. pneumophila* em Portugal no período entre 1987 e 2016. Destes perfis, 15 são exclusivamente portugueses.

Para o presente estudo, foi selecionado um isolado de cada perfil alélico representado na coleção, estão assim abrangidos todos os perfis alélicos provenientes das notificações de DL em Portugal durante 29 anos. Foram selecionadas 15 isolados clínico cujo perfil é específico de Portugal (Anexo I) e 24 cujos perfis se encontram espalhados pelo mundo (Anexo I).

Adicionalmente foram analisados mais três isolados da estirpe ST100 que deu origem a vários casos de infeção nosocomial de DL num hospital da área de Lisboa. Um representativo dos primeiros casos de DL, isolado recuperado em 1988 e o outro isolado entre os casos do último surto que ocorreu em 2006. Os isolados ambientais analisados foram recuperados do sistema de distribuição de água do hospital um em 1989 e o outro em 2006.

2.2 Meio de conservação dos isolados

Os isolados estavam preservados a -80 °C no meio tioglicolato com 15% de glicerol, meio preparado no laboratório de acordo com o seguinte protocolo:

Material:	Reagentes:
Copo	<i>Thioglycollate</i> (Merck)
Proveta	Glicerol (Merck)
<i>Erlenmayer</i>	Água destilada
Rolha de algodão	

- Pesar 2,84 gr de *thioglycollate*
- Dissolver em 85 mL de água destilada
- Juntar glicerol, de forma a obter uma concentração de 15%
- Autoclavar a 120 °C durante 20 minutos
- Distribuir o meio em criotubos estéreis (1 mL).
- Efetuar a operação na câmara de segurança biológica.
- Guardar os criotubos entre 2 a 8 °C

2.3 Meio de cultura

Como referido anteriormente o meio BCYE- α é o mais indicado para a cultura de *Legionella*. Este meio é utilizado porque tem os nutrientes adequados ao crescimento da *Legionella* e porque devido ao caráter fastidioso da bactéria existe a necessidade de adsorção pelo carvão dos produtos como o peróxido de hidrogênio e dos radicais superóxidos produzidos pela bactéria durante o seu crescimento e que se vão acumulando originando um ambiente nocivo.

Meio BCYE- α

Este meio foi preparado no laboratório a partir de *Legionella* CYE agar base (Anexo III), e o suplemento *Legionella* BCYE growth (Anexo III), seguindo o protocolo:

Material: Proveta de 100 mL Copo de 100 mL Erlenmeyer de 500 mL	Reagentes: Água destilada <i>Legionella</i> CYE agar base (Oxoid) <i>Legionella</i> BCYE growth supplement (Oxoid)
---	--

- Pesar 2.77gr de *Legionella* CYE agar base
- Adicionar 100 mL de água destilada.
- Ferver na placa elétrica. Ir agitando.
- Autoclavar (Heraeus – Kendro) a 120°C durante 20 minutos.
- Deixar arrefecer até atingir a temperatura de 50°/60°C
- Adicionar um frasco de *Legionella* BCYE growth supplement e misturar.
- Distribuir 20 mL em cada placa de *Petri* (90 mm de diâmetro). Efetuar a operação em câmara de fluxo laminar Classe II (Nuair) ou junto de um bico de *Bunsen*.
- Efetuar o teste de esterilidade, colocar uma placa na estufa a 37 °C (Mettler) durante 48 horas. Observar a presença de crescimento.
- Conservar as restantes placas entre 2 a 8 °C.

Meio BYE

Para além do meio BCYE- α foi utilizado no presente trabalho o meio Bufferes Yeast Extract agar base (BYE) porque na literatura foram identificadas referências à interferência do carvão vegetal nos MICs observados no meio BCYE- α (82, 120, 129), assim, foram realizados antibiogramas em meio BYE, utilizando estirpes de referência para a verificação desta interferência. Foi ainda verificado se todos os isolados em estudo têm capacidade de crescer em meio sem carvão.

O meio BYE é constituído por agar de extrato de levedura tamponado diferendo do BCYE apenas por não apresentar carvão vegetal. A este meio foi adicionado o suplemento para *Legionella* (Anexo III). O meio foi preparado no laboratório de acordo com o seguinte protocolo:

Material: Proveta de 500 mL Copo de 100 mL Erlenmeyer de 500 mL	Reagentes: Água destilada Yeast extract Agar <i>Legionella</i> BCYE growth supplement
---	--

- Pesar 2gr Yeast extract.
- Pesar 3gr Agar.
- Adicionar 200 mL de água destilada.
- Ferver na placa elétrica. Ir agitando.
- Autoclavar (Heraeus – Kendro) a 120°C durante 20 minutos.
- Deixar arrefecer até atingir a temperatura de 50°/60°C
- Adicionar dois frascos de *Legionella* BCYE growth supplement e misturar.
- Distribuir 20 mL em cada placa de *Petri* (90 mm de diâmetro). Efetuar a operação em câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire) ou junto de um bico de *Bunsen*.
- Efetuar o teste de esterilidade, colocar uma placa na estufa a 37°C (Memmert) durante 48 horas. Observar a presença de crescimento.
- Conservar as restantes placas entre 2 a 8°C.

2.4 Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Na realização dos testes de suscetibilidade foi utilizado o protocolo preconizado pelo EUCAST 2017. Todos os testes foram realizados a partir de culturas com 48h de incubação a 37°C.

Para a realização dos testes de suscetibilidade, foi seguido o protocolo do EUCAST 2017 para a *Legionella pneumophila* com as seguintes otimizações:

1. Fazer uma subcultura do isolado em meio BCYE- α e incubar durante 48 horas a 37 °C.
2. Suspende as colónias em água estéril para a densidade de um padrão 0.5 McFarland.
3. Mergulhar por 15 seg uma zaragatoa estéril.
4. Inocular as placas BCYE- α , com a zaragatoa, espalhando o inóculo uniformemente por toda a superfície em dois sentidos perpendiculares. Deixar secar completamente (aproximadamente 15 min).

5. Aplicar uma tira com gradiente de antimicrobiano (método E-test), colocar uma tira por placa, meio preparado nas 48h anteriores.
6. Incubar durante 48 horas a 37 °C. Se o crescimento não for adequado, incubar as placas durante 24 horas adicionais.
7. Ler os MICs no ponto de interseção da elipse com a tira de gradiente, utilizar lupa estereoscópica.
8. Interpretações dos resultados: comparar o MIC obtido com as distribuições de MIC na tabela do EUCAST 2017. A suscetibilidade provável do isolado pode ser relatada com base no fato de a MIC estar abaixo ou igual a MIC mais alto provisória para a estirpe selvagem.
9. Confirmar os resultados que se situarem acima do MIC para estirpe selvagem.

Para a execução dos testes de suscetibilidade de *L. pneumophila* foi necessário realizar a suspensão das colônias em água esterilizada com a densidade de 0.5 da escala McFarland. A escala McFarland (Anexo IV) refere-se a uma série de diferentes suspensões de opacidades conhecidas que permitem a padronização das suspensões microbianas.

Nesta escala, um padrão de 0.5 McFarland consiste numa suspensão de concentração bacteriana igual $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Como a concentração bacteriana varia de acordo com o tamanho dos microrganismos, foi necessário a realização da análise morfológica de todas as em estudo, dado que a *Legionella* apresenta pleomorfismo que varia de acordo com alterações de temperatura, presença/ausência de nutrientes e o meio em que vive (29, 37, 70, 85).

O estudo morfológico das estirpes foi realizado utilizando a coloração de Gram, segundo protocolo discriminado abaixo.

Todas as estirpes de *Legionella* testadas neste trabalho foram previamente inoculadas em BCYE- α e incubadas por 72 h a 37 °C em meio BCYE- α .

Com as morfologias das estirpes de *Legionella* definidas, foi necessário padronizar a concentração a utilizar no método E-test. Assim, foi executada a análise da densidade ótica (DO) num espectrofotômetro e de seguida quantificada a suspensão bacteriana pelo Método de Miles e Misra.

Nos testes de suscetibilidade foram testados três antimicrobianos: azitromicida [0.016 a 256 $\mu\text{g/mL}$], ciprofloxacina [0.002 a 32 $\mu\text{g/mL}$] e levofloxacina (0.002 a 32 $\mu\text{g/mL}$). As tiras de E-test (BioMérieux, França) foram colocadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Na leitura foi considerado o MIC mais elevado quando o halo não era simétrico à volta da tira. Todas leituras foram realizadas por dois elementos do laboratório de forma independente para não haver

interferência nas leituras. Sempre que existiram divergências nos valores, a leitura foi realizada por um terceiro elemento.

2.5 Protocolo da Coloração de Gram

1. Preparar o esfregaço a partir de uma cultura com 48h de incubação. Deixar secar ao ar;
2. Fixar à chama passando o lado oposto ao esfregaço 3 vezes na chama do bico de Bunsen;
3. Cobrir o esfregaço com cristal violeta, deixar atuar durante 60 segundos;
4. Lavar com água corrente;
5. Cobrir o esfregaço com lugol, deixar por 60 segundos;
6. Lavar com água corrente;
7. Inclinar a lâmina e gotejar com álcool a 95% por cerca de 15 segundos;
8. Lavar com água corrente;
9. Cobrir o esfregaço com safranina, deixar atuar 30 segundos;
10. Lavar com água corrente;
11. Secar a lâmina ao ar;
12. Pingar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observar ao microscópio com objetiva de imersão (100x).

2.6 Protocolo de preparação das suspensões bacterianas

Para obter suspensões de *Legionella* em água estéril numa concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, foi necessário a padronização de suas opacidades. Para isso, foi executada a análise da DO a 595 nm no espectrofotômetro WPA UV 1101 (Biotech photometer) de suspensões realizadas a partir de culturas em BCYE- α incubadas durante 48h a 37 °C.

Foram quantificadas suspensões com várias DO, de forma a obter uma com a concentração de bactérias desejada, como explicado no esquema figura 6.

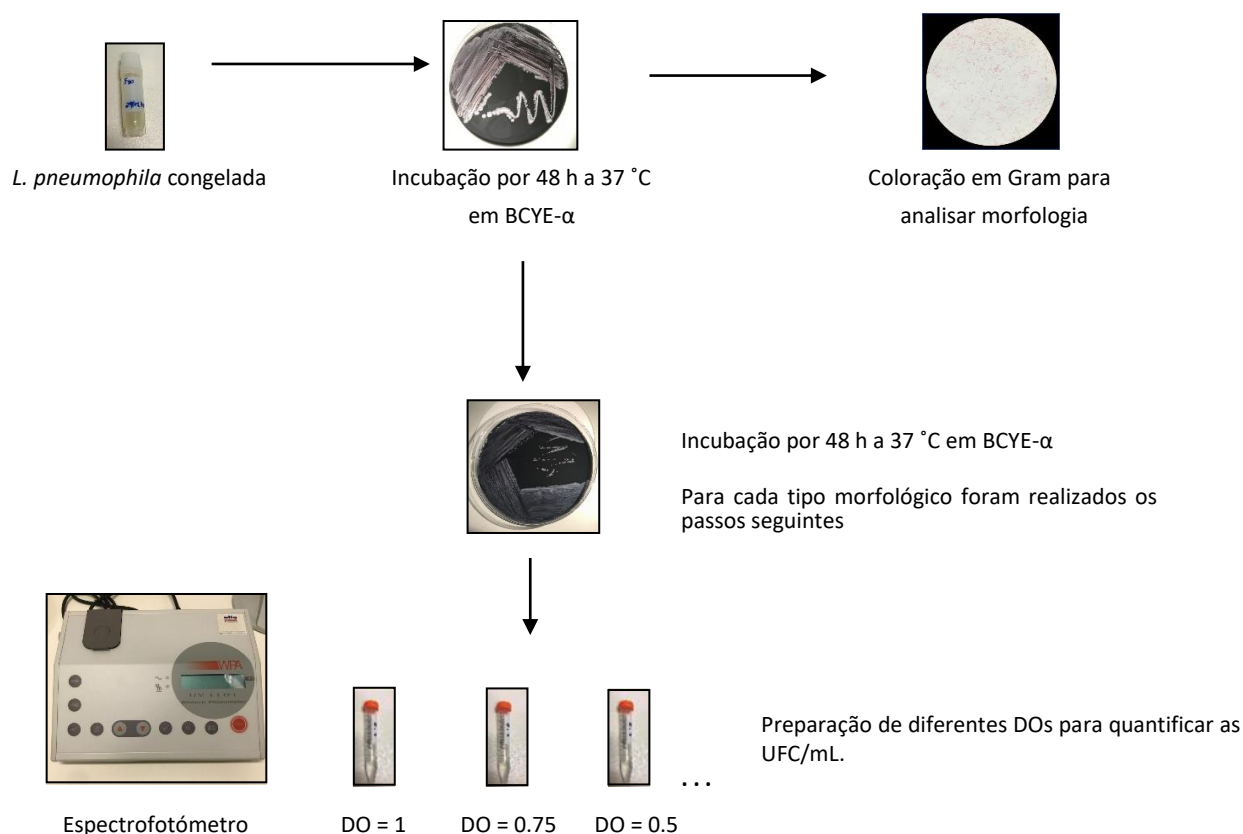


Figura 6 – Esquema de trabalho da preparação das suspensões bacterianas.

2.7 Quantificação das suspensões pelo Método de Miles e Misra

A quantificação das bactérias presentes nas suspensões foi realizada através da técnica de Miles e Misra. Nesta técnica determina-se a concentração das suspensões com recurso ao plaqueamento das gotas de 30 µL. Para cada DO foram efetuadas diluições seriadas de 10 em água estéril (figura 7), cada diluição foi plaqueada em triplicado, ou seja, para cada diluição foram plaqueadas 3 gotas de 30 µL em BCYE-α. A contagem das UFC foi realizada após 48 h de incubação a 37 °C com recurso à lupa estereoscópica (figura 8). As concentrações (UFC/ml) das suspensões foram obtidas após a leitura do número de colónias em cada diluição. Para os cálculos foi utilizado o valor em que a contagem se situou entre 3 e 30 UFC/gota (média aritmética das três gotas) através da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{UFC/gota} \times 10^3}{30} \times \frac{1}{\text{diluição}}$$

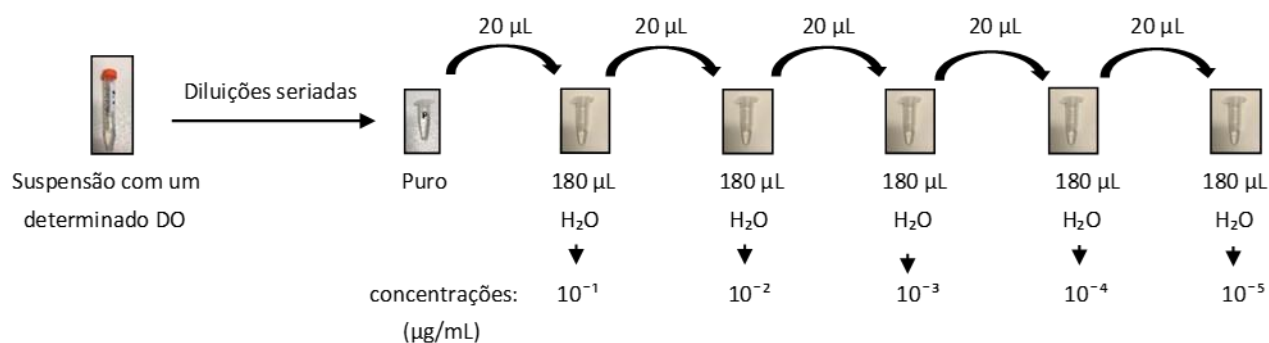


Figura 7 – Esquema de trabalho da quantificação das suspensões pelo Método de Miles e Misra.

Protocolo:

- Dentro da câmara de segurança biológica, preparar as diluições das suspensões com a DO previamente ajustada. A partir da solução pura, foi retirar 20 µL e adicionar a um eppendorf contendo 180 µL de água estéril e assim sucessivamente.
- Cada placa de ágar BCYE- α foi utilizada para quantificar a concentração de bactérias de uma determinada DO. Cada quadrante da placa era usado para analisar uma diluição ao dispensar 30 µL de cada uma, em triplicado.
- Deixar as gotas secar com a tampa da placa semifechada.
- Incubar por 48 h a 37 °C.
- Calcular as UFCs utilizando a diluição cuja contagem se situou no intervalo entre 3 e 30 UFCs/gota.

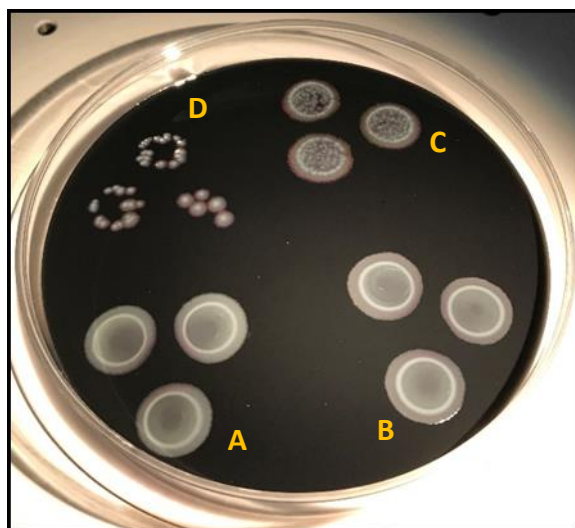


Figura 8 – Método Miles e Misra para quantificação de bactérias usado para *L. pneumophila* em BCYE- α com incubação de 48h a 37 °C nas seguintes diluições: **A)** Puro **B)** 10^{-2} **C)** 10^{-4} **D)** 10^{-5} , fotos recolhidas durante o presente trabalho.

2.8 Protocolo para os testes de suscetibilidade

O protocolo para testes de suscetibilidade antimicrobiana de *Legionella pneumophila* do EUCAST 2017 foi adaptado para as condições do laboratório e de acordo com as necessidades do estudo, porém todas as recomendações foram seguidas. Assim, depois de realizadas todas análises anteriores, foi elaborado para este estudo um protocolo específico:

1. Descongelar as os isolados e plaquear em meio BCYE, incubar por 48 h a 37 °C
2. Observar a cultura à lupa estereoscópica para confirmar se é uma cultura pura. Fazer um esfregaço de uma colônia, corar pelo método de Gram. Observar a morfologia dos bacilos ao microscópio ótico.
3. Fazer nova subcultura em meio BCYE e incubar 48 h a 37°C
4. Fazer as suspensões de acordo com a morfologia dos bacilos:
 - se bacilos filamentosos, fazer uma suspensão com DO=0.1
 - Se bacilos curtos, fazer uma suspensão com DO=0.1 e diluir 1/5.
 - Se bacilos com as duas morfologias, fazer uma suspensão com DO=0.1 e diluir ½

As suspensões assim obtidas apresentavam a concentração equivalente a 0,5 da escala McFarland, ou seja, $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL.

2.9 Controle *Staphylococcus aureus*

Para o controle de qualidade do estudo foi utilizada a estirpe de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 após a incubação durante 24 h em gelose de sangue a 36 °C. A bactéria foi inoculada em meio agar Mueller Hinton (Biomereux) e os MICs obtidos foram comparados com os valores estabelecidos pelo Comitê Europeu de Ensaio de Suscetibilidade Antimicrobiana 2020 (53).

Para avaliar a interferência do carvão vegetal na determinação do MIC, esta bactéria foi inoculada em meio BCYE-α e em meio BYE (meio sem carvão). A cultura foi incubada por 24 h a 36 °C.

2.10 Controle *Legionella* serogrupo 1

Como preconizado pelo protocolo para testes de suscetibilidade antimicrobiana de *L. pneumophila* do EUCAST 2017, foi utilizada como referência a *L. pneumophila* ATCC 33152 para assegurar que as condições de crescimento são adequadas do meio BCYE (50). Para avaliar a reprodutibilidade do protocolo em meio sem carvão, as suspensões com a turbidez de 0.5 McFarland, obtidas pelo método acima referenciado, foram

inoculadas em meio BYE e analisadas com 48 h de incubação a 37 °C. Para analisar a interferência do carvão vegetal no seu crescimento, esta estirpe foi plaqueada sem diluições em meio BYE.

2.11 Aprovação do Comité de Ética

Este trabalho científico foi devidamente aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Nova de Lisboa (Anexo V).

2.12 Tratamento estatístico

Os resultados foram apresentados de forma descritiva em tabelas.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

No presente trabalho foi avaliada a suscetibilidade a três antibióticos, utilizados no tratamento de DL, de uma amostra constituída por 42 isolados de *L. pneumophila* selecionada entre os 178 isolados da coleção existente no laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Médica, tabela 1, figura 9.

Tabela 1 – Isolados clínicos e ambientais em estudo recuperados em Portugal, entre 1987 e 2016.

Identificação isolado	Ano de isolamento	Espécie e serogrupo	ST	Perfil específico de Portugal
HSC12	1991	<i>L. pneumophila</i> sg 14	1383	X
HSC23	1996	<i>L. pneumophila</i> sg 12	728	
HSC30	1997	<i>L. pneumophila</i> sg 1	172	
HSM6	2000	<i>L. pneumophila</i> sg 8	1324	
HSM7	2000	<i>L. pneumophila</i> sg 10	1343	X
HVNG	2000	<i>L. pneumophila</i> sg 1	102	X
E3	2005	<i>L. pneumophila</i> sg 1	44	
E7	2005	<i>L. pneumophila</i> sg 1	99	
E16	2007	<i>L. pneumophila</i> sg 1	174	X
E22	2008	<i>L. pneumophila</i> sg 1	146	
E30	2010	<i>L. pneumophila</i> sg 1	75	
E31	2010	<i>L. pneumophila</i> sg 1	22	
E32	2010	<i>L. pneumophila</i> sg 1	1009	X
E33	2010	<i>L. pneumophila</i> sg 1	1010	X
E36	2010	<i>L. pneumophila</i> sg 1	173	
E48	2014	<i>L. pneumophila</i> sg 1	65	
E53	2014	<i>L. pneumophila</i> sg 1	96	
E54	2014	<i>L. pneumophila</i> sg 1	62	
E55	2014	<i>L. pneumophila</i> sg 1	1910	X
E95	2014	<i>L. pneumophila</i> sg 1	1905	X
E98	2014	<i>L. pneumophila</i> sg 1	436	
E99	2014	<i>L. pneumophila</i> sg 1	20	
E100	2015	<i>L. pneumophila</i> sg 1	2184	X
E102	2015	<i>L. pneumophila</i> sg 1	101	X
E105	2015	<i>L. pneumophila</i> sg 1	2152	X
E107	2015	<i>L. pneumophila</i> sg 1	744	
E110	2015	<i>L. pneumophila</i> sg 1	16	
E111	2015	<i>L. pneumophila</i> sg 1	42	
E115	2015	<i>L. pneumophila</i> sg 1	785	X
E119	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	103	
E120	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	98	X
E123	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	435	
E126	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	1	
E127	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	23	
E128	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	94	
E129	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	48	
E130	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 1	37	
ME136676	2016	<i>L. pneumophila</i> sg 14	1384	X
HSC2	1988	<i>L. pneumophila</i> sg 1	100	X
A6*	1989	<i>L. pneumophila</i> sg 1	100	X
E12	2006	<i>L. pneumophila</i> sg 1	100	X
A460*	2006	<i>L. pneumophila</i> sg 1	100	X

*isolados ambientais

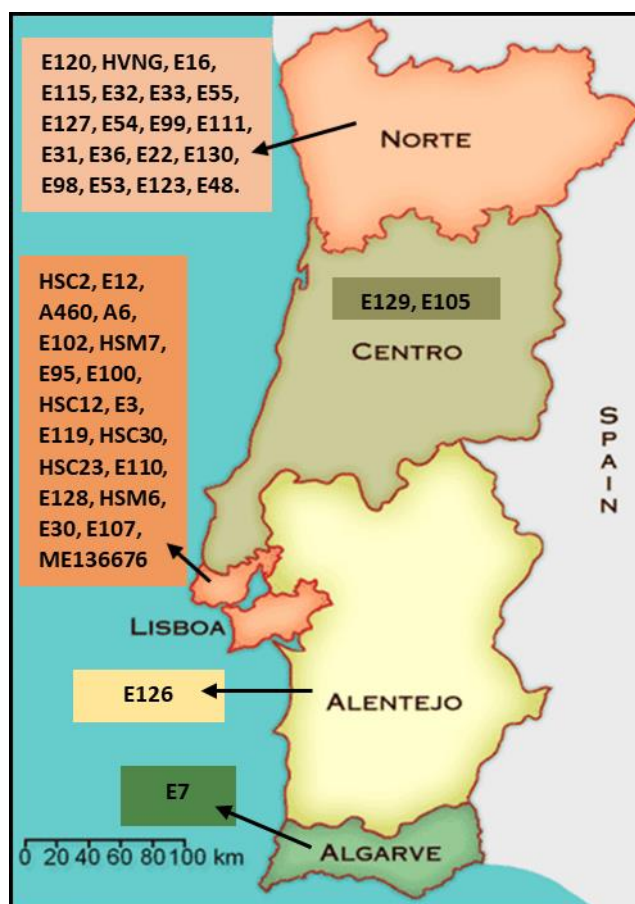


Figura 9 – Distribuição dos isolados de *L. pneumophila* deste estudo por região em Portugal.

Seguindo as determinações do protocolo de referência do EUCAST 2017 para realização dos testes de suscetibilidade antimicrobiana de *Legionella pneumophila*, foi preciso obter suspensões de *L. pneumophila* correspondente à escala 0.5 de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (IV). No entanto, como a concentração bacteriana varia de acordo com o tamanho dos microrganismos, numa primeira fase, foi avaliada a morfologia de todos os isolados em estudo.

3.1 Avaliação da morfologia

A avaliação da morfologia dos isolados foi realizada pela observação ao microscópio ótico de esfregaços corado pelo método de Gram. Os esfregaços foram efetuados a partir de culturas com 48 h de incubação no meio BCYE- α a 37 °C.

As culturas dos 42 isolados analisados apresentavam bacilos com três formas diferentes (tabela 2). A forma de bacilos curtos foi encontrada nas culturas de 20 dos isolados, correspondendo a 47,5% do total. Em 18 dos isolados (43%) as suas culturas eram constituídas por bacilos com forma filamentosa. Nos restantes quatro isolados (9,5%) a cultura apresentava ao mesmo tempo bacilos curtos e filamentosos. Nas culturas destes últimos isolados a maioria (70%) dos bacilos apresentava a forma curta (Figura 10).

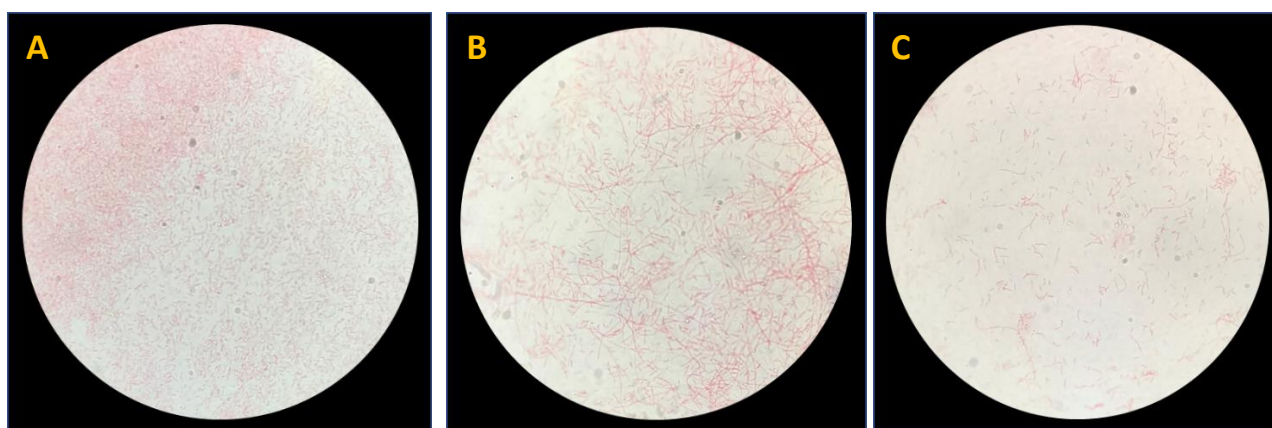


Figura 10 – Morfologia dos isolados de *L. pneumophila* em culturas com 48 h de incubação no meio BCYE- α a 37 °C, coloração pelo método de Gram. **A)** isolado E107 – bacilos curtos, **B)** isolado E129 – bacilos filamentosos e **C)** isolado HSC12 – morfologia mista de bacilos curtos e filamentosos, fotos recolhidas durante o presente trabalho (ampliação=1000x).

Tabela 2 – Resultados do estudo morfológico dos 42 isolados de *L. pneumophila* analisadas.

Identificação das isolados	Serogrupo	Morfologia
E22	1	bacilo curto
E30	1	bacilo curto
E33	1	bacilo curto
E36	1	bacilo curto
E48	1	bacilo curto
E53	1	bacilo curto
E54	1	bacilo curto
E55	1	bacilo curto
E95	1	bacilo curto
E99	1	bacilo curto
E102	1	bacilo curto
E107	1	bacilo curto
E110	1	bacilo curto
E115	1	bacilo curto
E119	1	bacilo curto
E120	1	bacilo curto
E123	1	bacilo curto
E126	1	bacilo curto
E127	1	bacilo curto
ME136676	14	bacilo curto
HSC2	1	bacilo filamentoso
A6*	1	bacilo filamentoso
E12	1	bacilo filamentoso
A460*	1	bacilo filamentoso
E3	1	bacilo filamentoso
E7	1	bacilo filamentoso
E16	1	bacilo filamentoso
E31	1	bacilo filamentoso
E32	1	bacilo filamentoso
E98	1	bacilo filamentoso
E105	1	bacilo filamentoso
E111	1	bacilo filamentoso
E129	1	bacilo filamentoso
E130	1	bacilo filamentoso
HSC30	1	bacilo filamentoso
HVNG	1	bacilo filamentoso
HSM6	8	bacilo filamentoso
HSC23	12	bacilo filamentoso
E100	1	bacilos curtos e filamentosos
E128	1	bacilos curtos e filamentosos
HSM7	10	bacilos curtos e filamentosos
HSC12	14	bacilos curtos e filamentosos

*isolados ambientais provenientes de Lisboa

3.2 Preparação das suspensões

Depois de identificadas as morfologias de todas os isolados em análise, foi necessário preparar as suspensões para realizar os E-test. Para tal foi necessário padronizar a sua preparação para que todas as suspensões tivessem a mesma concentração de bactérias. Para realizar esta padronização da forma mais fidedigna possível recorreu-se à medição da DO no espectrofotómetro a 595 nm.

Este aparelho é capaz de medir e comparar a quantidade de luz absorvida ou transmitida por uma determinada amostra. A espectrofotometria fundamenta-se na Lei de Lambert-Beer a qual, de modo geral, afirma que a quantidade de luz absorvida ou transmitida por uma determinada solução depende da concentração do soluto e da espessura da solução. Então, através deste instrumento, é possível avaliar a DO de uma suspensão correspondendo, por exemplo, à turbidez de uma cultura microbiana (23).

Inicialmente efetuaram-se suspensões com diferentes DO que foram quantificadas pelo método de Miles e Misra para definir qual a DO que correspondia à concentração necessária para a realização dos E-tests.

Os resultados da quantificação mostraram que para os isolados que apresentavam a morfologia de bacilos filamentosos era necessário preparar suspensões com DO=0.1, isolados de morfologia mista era preciso preparar suspensões com DO=0.1 e posteriormente efetuar uma diluição a ½, enquanto que os isolados cuja morfologia era bacilos curtos, a DO necessitava ser igual a 0.1 e posteriormente diluir a 1/5.

Na tabela 3 são apresentados os isolados que foram quantificados e os valores de UFC/mL obtidos. Na cultura de *L. pneumophila* ATCC 29213 observamos bacilos filamentosos, pelo que foram preparadas suspensões com DO=0,1.

Tabela 3 – Quantificação do nº de unidades formadoras de colónias em isolados de *L. pneumophila* representativos das diferentes morfologias encontradas na amostra em estudo.

Amostra	Morfologia	DO	Quantificação (UFC/mL)
E12	Bacilos filamentosos	0.1	$0,75 \times 10^8$
HSC2	Bacilos filamentosos	0.1	$0,90 \times 10^8$
E100	Morfologia mista	0.1 + Dil ½	$0,33 \times 10^8$
HSM7	Morfologia mista	0.1 + Dil ½	$0,71 \times 10^8$
E95	Bacilos curtos	0.1 + Dil 1/5	$0,53 \times 10^8$
E102	Bacilos curtos	0.1 + Dil 1/5	$0,55 \times 10^8$

Na quantificação do *S. aureus* ATCC 29213 foi usado o meio de gelose de sangue e incubávamos as culturas durante 24 h a 36°C. Para esta estirpe verificou-se que era necessário preparar uma suspensão com DO = 0.2 para obter a concentração exigida pelo protocolo do EUCAST.

3.3 Testes de suscetibilidade antimicrobiana

3.3.1 Seleção do meio de cultura

Conforme preconizado no protocolo do EUCAST 2017, todos os testes de suscetibilidade foram realizados em meio BCYE- α . Em todos os ensaios foram utilizadas placas preparadas no laboratório nas 48 h anteriores e todas culturas foram incubadas por 48 h a 37 °C.

Inicialmente, como há relatos de alterações no MIC devido à presença de carvão no meio (14, 34, 66, 82, 83, 90, 106, 114, 116, 120, 124) testou-se a possibilidade de utilizar o meio BYE. Assim, efetuaram-se culturas em ambos os meios, fazendo subculturas de culturas puras e plaqueamento de suspensões na concentração necessária para a realização dos E-tests.

Com os resultados obtidos (Figura 11) percebemos que o crescimento no meio BYE é reduzido ao fim de 48h a 37 °C quando o inóculo é proveniente de uma cultura pura e nulo na suspensão, comparativamente ao que se verifica na placa de BCYE, não havendo alteração do resultado após mais 24h de incubação. Este ensaio foi repetido utilizando os 42 isolados, verificando-se que nenhum cresceu no meio BYE na concentração acima referida, mesmo após incubação de 24 h adicionais. Estes resultados estão de acordo com estudos que relatam que nem toda estirpe de *Legionella* cresce em meio sem carvão e que pode ser preciso um inóculo de maior concentração para serem capazes de crescer (66, 116).



Figura 11 – Culturas de *L. pneumophila* ATCC 33152 após incubação de 48 h a 37 °C. À esquerda, placas com meio BCYE e à direita placas com o meio BYE: **A e C)** inóculo proveniente de culturas puras; **B e D)** inóculo proveniente de suspensões a 0.5 da escala de McFarland, fotos recolhidas durante o presente trabalho.

Assim, podemos perceber que esta bactéria cresce bem no meio com o carvão, mas em meio sem o carvão o seu crescimento é prejudicado, não se visualizando nenhum crescimento na concentração recomendada para os testes de suscetibilidade (ensaio realizado em duplicado). Logo, a presença do carvão no meio mostrou ser fundamental para o desenvolvimento normal desta bactéria, provavelmente pelo seu poder de absorção do peróxido de hidrogênio e de radicais superóxidos produzidos pelas bactérias durante seu crescimento (102, 103, 128). Devido ao caráter fastidioso da *Legionella*, estes produtos vão-se acumulando no meio, tornando-o tóxico o que fez com que em concentrações bacterianas mais baixas (suspensões a 0.5 da escala de McFarland) o crescimento tenha sido impedido, confirmando a necessidade da avaliação da sensibilidade a antibióticos para *Legionella* ser realizada em meio BCYE- α .

3.3.2 Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana dos isolados em estudo

Para este estudo todos materiais foram devidamente armazenados, estavam dentro do prazo de validade e as suspensões do inóculo foram padronizadas. Durante a incubação a temperatura foi controlada e a técnica de inoculação das suspensões foi repetida várias vezes para verificar se era reprodutível.

O E-test é o método preconizado pelo EUCAST para o estudo da suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias do género *Legionella* por representar uma técnica simples, reprodutível e facilmente disponível para os laboratórios de rotina, as tiras apresentam um elevado custo, pelo que tivemos de restringir o nosso estudo a 3 antibióticos.

O tratamento da DL pode ser realizado com fluorquinolonas, macrolídeos, tetraciclina e rifampicina (36, 37, 68, 90, 129, 131), mas atualmente, os mais administrados são a azitromicina ou a levofloxacina (17, 61, 64, 101, 112, 116, 125). Estes antibióticos apresentam maiores penetrações pulmonares, atividades mais potentes nos pulmões, melhores farmacocinéticas com posologias apenas de 1 a 2 vezes ao dia, bom perfil de segurança devido menores interferências com outros medicamentos (125). No entanto, tem sido relatado na literatura falhas com o seu uso (90, 129) e também, já foram identificados mecanismos de resistência contra azitromicina e ciprofloxacina (14, 35, 72, 90, 112, 124, 129). Por estas razões, foram escolhidos para este trabalho a azitromicina, a levofloxacina e a ciprofloxacina.

Este estudo é importante porque permite conhecer o padrão de sensibilidade das estirpes clínicas que foram identificadas em Portugal durante o período de 1987 a 2016.

3.3.2.1 Controle dos testes de suscetibilidade

É recomendado pelo protocolo do EUCAST 2017 que para aferir a realização dos testes de suscetibilidade antimicrobiana devem ser utilizados controles da mesma espécie. Assim, como controle dos ensaios realizados utilizamos *L. pneumophila* ATCC 33152 (*L. pneumophila* ATCC) e ainda, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S. aureus* ATCC). A seleção destas bactérias segue a metodologia realizada por outros trabalhos que estudam sensibilidade da *Legionella* aos antimicrobianos (34, 66, 82, 87, 90, 106, 114, 116, 124, 120). Os valores do MIC de referência foram retirados do documento do EUCAST com os valores recomendados para os MICs, Versão 10.0, 2020 (52). Desta forma com os ensaios com a *L. pneumophila* ATCC asseguramos que as condições de crescimento bacteriano são adequadas dado que o seu MIC (tabela 4) está dentro da gama de valores descritos pelo EUCAST para a estirpe selvagem em meio BCYE- α (ver figura 4, na página 26 do capítulo Introdução). Como referido anteriormente neste trabalho, pretendíamos avaliar a interferência do carvão ao serem realizados testes de suscetibilidade dessa estirpe de referência ao comparar o MIC obtido em meios com e sem este composto. Porém, devido a bactéria não ter crescido em BYE na concentração necessária, não foi possível realizar esta comparação.

Tabela 4 – Resultado dos MICs (mg/L) da estirpe de referência *Legionella*.

Meio	<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	
	BCYE- α ^a	BYE ^b
Antibiótico		
Azitromicina	0.19	N.D.
Ciprofloxacina	0.38	N.D.
Levofloxacina	0.19	N.D.

^a BCYE- α : ágar de extrato de levedura de carvão tamponado suplementado com ácido α -cetoglutarato

^b BYE: ágar de extrato de levedura tamponado

N.D.: não determinado

A utilização do *S. aureus* ATCC permite controlar a qualidade de todos os procedimentos que foram efetuados porque existem valores de MIC estabelecidos (52).

Tabela 5 – Resultado dos MICs (mg/L) da estirpe de referência *Stafilococos*.

Meio	<i>S. aureus</i> ATCC 29213			
	Valor referência (EUCAST)	MH ^a	BCYE- α ^b	BYE ^c
Antibiótico				
Azitromicina	1	1	4	6*
Ciprofloxacina	0.25	0.25	2	0.25
Levofloxacina	0.125 – 0.25	0.19	1.5	0.25

^a MH: ágar Mueller-Hinton

^b BCYE- α : ágar de extrato de levedura de carvão tamponado suplementado com ácido α -cetoglutarato

^c BYE: ágar de extrato de levedura tamponado

* A repetição do ensaio nas mesmas condições manteve o valor de 6

Este ensaio foi realizado no meio BCYE- α e agar Mueller Hinton (MH) comercialmente adquirido (BioMérieux). O meio MH é o preconizado pelo EUCAST para a realização dos testes de suscetibilidade para esta bactéria. Os resultados obtidos mostram que o MIC sofreu alterações, nos três antimicrobianos testados, quando foi realizado no meio BCYE- α , já quando foi utilizado o BYE não houve alteração para a ciprofloxacina e levofloxacina (tabela 5).

Para o antibiograma realizado com azitromicina, em meio MH foi obtido um MIC de [1 mg/L], já em meio BCYE- α houve um aumento de 4 vezes, isto é, passou para um MIC de [4 mg/L]. Este resultado está de acordo com outros estudos já realizados como o da equipa De Giglio, no qual houve um aumento de 2,6 vezes do MIC, no estudo de March e colaboradores foi relatado um aumento de 8 vezes e o trabalho da equipa de Graells apresentou um aumento de 3 vezes.

Para a ciprofloxacina, quando foi utilizado o meio MH apresentou um MIC de [0.25 mg/L], no entanto, em meio com BCYE encontramos um MIC de [2 mg/L], representando um aumento de 8 vezes. Em outros trabalhos foram relatadas elevações de 2 vezes (De Giglio, 2015), de 8 vezes (March, 2018) e de 6 vezes (Graells, 2018).

Para a levofloxacina, o MIC subiu de [0.19 mg/L] no meio MH para [1.5 mg/L] no meio BCYE, ou seja, um aumento de 8 vezes. Os outros estudos apresentaram aumentos de 2 vezes (De Giglio, 2015), de 8 vezes (March, 2018) e de 2 vezes (Graells, 2018).

Estes dados mostram que existe elevação do MIC nos testes de sensibilidade ao compararmos o meio MH com o meio BCYE e para sabermos se realmente essa interferência foi devido ao carvão ou outro componente do meio que necessitamos usar para fazer crescer a *Legionella*, realizamos novos teste utilizando o meio BYE. Neste ensaio obtivemos a redução dos MICs tanto da ciprofloxacina como da levofloxacina para [0.25 mg/L], indicando que a interferência se deveu ao carvão. Entretanto, para a azitromicina houve um aumento do MIC para [6 mg/L] em meio BYE, este teste foi repetido nas mesmas condições e o valor manteve-se. Isto indica que existe algum componente no meio BYE, para além do carvão, que provoca a elevação do MIC para este antibiótico. Estes dados vêm na linha do que tinha sido verificado pela equipa de Marques, que o carvão interferia nos valores do MIC (83).

Neste estudo, verificamos que a realização dos E-test no meio com carvão (BCYE- α) implicou um aumento maior dos MICs da ciprofloxacina e da levofloxacina comparativamente ao que aconteceu com a azitromicina, resultado coincidente com o relatado em estudo anterior (82). A estirpe de *S. aureus* utilizada apresentou o MIC dentro do esperado para a estirpe selvagem em meio MH. No entanto, considerando os valores obtidos nos E-tests realizados no meio BCYE, para os três antibióticos e no meio BYE para a azitromicina, a conclusão seria diferentes. Estes valores sugeriam que a estirpe seria resistente. Assim este

aumento deverá ser levado em consideração na análise dos resultados dos testes de suscetibilidade para *Legionella*.

Para atenuar a interferência do carvão no resultado dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos houve autores que estudaram o efeito da diminuição da concentração do carvão no meio BCYE- α , concluindo que reduzindo até 75% a sua concentração no meio não havia efeito nos valores do MIC dos macrolídeos usados (eritromicina e claritromicina) e da levofloxacina, porém para a ciprofloxacina ocorreu uma redução de oito vezes no valor do MIC (60).

3.3.2.2 E-test das estirpes de *Legionella*

No presente estudo pretende-se conhecer o padrão de suscetibilidade das estirpes clínicas de *L. pneumophila* isoladas de casos de DL notificados em Portugal, entre 1987 e 2016. Durante este período, foram enviados ao laboratório de microbiologia da FCM|NMS 178 isolados clínicos (Anexo I), todos pertencentes à espécie *L. pneumophila*, dos quais 97% pertence ao sg1. Segundo a tipificação que foi realizada no laboratório sequenciando fragmentos internos de sete genes, técnica do SBT, os isolados foram agrupados em 39 perfis alélicos distintos. Pode afirma-se que a população de *L. pneumophila* que se tem vindo a provocar doença em Portugal é heterogénea, sendo composta por estirpes apenas portuguesas (15 perfis) e por outras que estão disseminadas pelo mundo (20).

Para os testes da suscetibilidade para *L. pneumophila*, o EUCAST publicou, em 2017, um protocolo no qual estabelece que a realização dos E-tests deve efetuar-se em meio BCYE- α . Neste sentido, apesar dos resultados anteriores que mostram a interferência do carvão, como não houve crescimento bacteriano no meio BYE na concentração preconizada para a realização dos E-test ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), no estudo os mesmos foram realizados no meio BCYE- α . Uma limitação do estudo foi a impossibilidade de realizar avaliações em duplicado, devido ao elevado custo das tiras dos E-tests, esta situação já tinha sido relatada em outros estudos (34, 66, 120). Este facto foi também impeditivo para a inclusão de todos os isolados clínicos no estudo. Por esta razão selecionou-se um representante de cada um dos genótipos detetados em Portugal (Anexo II).

Do perfil ST100, responsável por vários casos de doença num hospital da área de Lisboa foram selecionados dois isolados clínicos, o HSC2, isolado em 1988, e o E12, recuperado em 2006 durante o último surto que ocorreu no referido hospital. Foram ainda, selecionados dois isolados ambientais recuperadas do sistema de distribuição de água, A6, isolado em 1989 e A460, isolado em 2006, durante o referido surto. Estes isolados da estirpe ST100 foram incluídos no presente estudo para avaliarmos se existia variação na suscetibilidade ao longo dos anos, por isso selecionaram-se isolados clínicos e ambientais do primeiro e do último surto, dos

vários que ocorreram no referido hospital antes de terem sido efetuadas obras profundas no sistema de distribuição de água.

No total, foram analisadas 42 isolados de 39 estirpes diferentes. Os resultados dos E-test dos 42 isolados aos três antimicrobianos selecionados são apresentados na tabela 6 e 7.

Tabela 6 – Distribuição dos resultados dos MICs dos 42 isolados de *L. pneumophila*.

	Número de isolados inibidos nas concentrações indicadas (mg/L)										
	0.064	0.094	0.125	0.19	0.25	0.38	0.5	0.75	1	1.5	2
Antibiótico											
Azitromicina	2	2	7	8	12	2	2	5	1	1	
Ciprofloxacina						6	23	12		1	
Levofloxacina				2	8	25	6	1			

■ valores de MIC para a estirpe WT definidos pelo EUCAST 2017

Todos isolados exibiram MICs idênticos aos da estirpe WT, exceto três, os isolados HSC30, E126 e o HSC2, destes dois para a azitromicina e um para ciprofloxacina. Estes E-tests foram repetidos e em dois o valor do MIC não foi reprodutível, isto é, ocorreu a sua normalização, foi o caso da azitromicina no isolado E126 e da ciprofloxacina no isolado HSC2. Porém um isolado, o HSC30, repetiu o mesmo valor do MIC para a azitromicina, ou seja, [1.5 µg/mL]. Foram ainda repetidos os E-tests de outros dois isolados que tinham apresentado um MIC no limite superior para azitromicina, a repetição normalizou os valores do MIC.

Em relação aos isolados da estirpe ST100 não foi identificada variação no padrão de suscetibilidade ao longo dos anos em nenhum dos isolados clínicos e ambientais, todos apresentaram MICs semelhantes à estirpe WT.

Tabela 7 – Resultados individualizados dos testes de sensibilidade dos 42 isolados de *L. pneumophila* à azitromicina, levofloxacina e ciprofloxacina.

Identificação dos isolados	Região	Ano de isolamento	ST	Azitromicina MIC (µg/mL)	Levofloxacina MIC (µg/mL)	Ciprofloxacina MIC (µg/mL)
HSC12	Lx	1991	1383	0.75	0.38	0.75
HSC23	Lx	1996	728	0.094	0.5	0.38
HSC30	Lx	1997	172	1.5 (1.5)*	0.5	0.38
HSM6	Lx	2000	1324	0.19	0.5	0.38
HSM7	Lx	2000	1343	0.125	0.25	0.5
HVNG	Norte	2000	102	0.25	0.5	0.38
E3	Lx	2005	44	0.19	0.19	0.38
E7	Faro	2005	99	0.25	0.19	0.5
E16	Norte	2007	174	0.19	0.25	0.5
E22	Norte	2008	146	0.19	0.38	0.5
E30	Lx	2010	75	0.25	0.25	0.5
E31	Norte	2010	22	0.25	0.5	0.38
E32	Norte	2010	1009	0.25	0.38	0.5
E33	Norte	2010	1010	0.25	0.38	0.5
E36	Norte	2010	173	0.125	0.38	0.5
E48	Norte	2014	65	0.19	0.38	0.5
E53	Norte	2014	96	0.19	0.38	0.5
E54	Norte	2014	62	0.25	0.38	0.75
E55	Norte	2014	1910	0.38	0.38	0.5
E95	Lx	2014	1905	0.19	0.38	0.75
E98	Norte	2014	436	0.125	0.38	0.75
E99	Norte	2014	20	0.125	0.25	0.5
E100	Lx	2015	2184	1.0 (1.0)*	0.38	0.5
E102	Lx	2015	101	0.125	0.25	0.5
E105	Centro	2015	2152	0.5	0.38	0.5
E107	Lx	2015	744	0.5	0.38	0.75
E110	Lx	2015	16	0.25	0.38	0.75
E111	Norte	2015	42	0.125	0.38	0.5
E115	Norte	2015	785	0.064	0.38	0.5
E119	Lx	2016	103	1.0 (0.75)*	0.38	0.75
E120	Lx	2016	98	0.094	0.38	0.75
E123	Norte	2016	435	0.064	0.38	0.75
E126	Alentejo	2016	1	1.5 (0.75)*	0.38	0.5
E127	Norte	2016	23	0.19	0.38	0.75
E128	Lx	2016	94	0.75	0.38	0.75
E129	Centro	2016	48	0.25	0.38	0.5
E130	Norte	2016	37	0.125	0.38	0.5
ME136676	Lx	2016	1384	0.75	0.25	0.5
HSC2	Lx	1988	100	0.25	0.75	3 (1.5)*
A6**	Lx	1989		0.38	0.25	0.5
E12	Lx	2006		0.25	0.5	0.5
A460**	Lx	2006		0.25	0.25	0.75

*repetição

**isolados ambientais

Na tabela 8, estão distribuídas as percentagens cumulativas de MIC (mg/L) para os 42 isolados. Percebemos que a azitromicina possui a mais ampla gama de concentração de MIC abrangendo dez diferentes gradientes (tabela 8). Isso indica que existe uma maior variação de perfis de suscetibilidade dos isolados à azitromicina das quais são necessárias apenas [0.064 mg/L] para inibir 4,7% dos isolados, mas só com [1.5 mg/L] se consegue inibir todos. Este perfil de suscetibilidade é idêntico ao da estirpe WT, exceto um isolado que apresentou MIC acima da concentração de [1mg/L].

Quanto à ciprofloxacina os resultados revelaram que era preciso uma estreita gama de concentrações para haver inibição do crescimento bacteriano manifestando praticamente só em três faixas de concentração que se situaram entre 0.38 a 0.75 mg/L, apenas uma estirpe esteve fora desta gama necessitando de uma concentração maior, isto é, de [1.5 mg/L]. A concentração de [0.38 mg/L] inibe o crescimento de 14% das bactérias e [0.75 mg/L] inibe quase 98% dos isolados em estudo.

Os resultados dos E-test com a levofloxacina mostraram que a concentração de [0.19 mg/L] inibiu 4,7% dos isolados e com [0.75 mg/L] eliminou o crescimento da totalidade, todos valores de MIC estão abaixo dos apresentados pelo EUCAST para a estirpe WT.

Na presença do macrolídeo testado, a azitromicina, os isolados exibiram uma maior variedade de resposta. Este comportamento está de acordo com relatos de outros estudos (34, 66, 82, 90).

Tabela 8– Distribuição da percentagem cumulativa de MIC (mg/L) para os 42 isolados de *L. pneumophila*.

	Percentagem cumulativa (%) de isolados inibidos nas concentrações indicadas (mg/L)									
	0.064	0.094	0.125	0.19	0.25	0.38	0.5	0.75	1	1.5
Antibiótico										
Azitromicina	4.7	9.5	26	45	73.8	78.5	83.3	95,2	97,6	100
Ciprofloxacina						14	69	97.6	97.6	100
Levofloxacina				4.7	23.8	83.3	97.6	100		

Comparativamente aos resultados apresentados pelo EUCAST, tabela 9, a dispersão encontrada é menor para a azitromicina, pois foram observados sete gradientes diferentes de MIC dos isolados pertencentes ao perfil 2, o qual é maioritariamente constituído por *L. pneumophila* sg1, mas incluí outros sg, tal como no nosso trabalho. A dispersão para ciprofloxacina no EUCAST foi maior e na levofloxacina foi igual. Para os três antibióticos, as isolados testadas pelo EUCAST apresentaram início de suscetibilidade com

concentrações menores, como se verifica que para azitromicina, na [0.016mg/L] já se havia 8% de isolados inibidos enquanto no nosso estudo a inibição só se iniciou na [0.064 mg/L] e para ciprofloxacina e levofloxacina, a inibição no EUCAST iniciou-se na [0.064 mg/L], no entanto para nosso estudo foi na [0.38 mg/L] e [0.19 mg/L], respetivamente.

Tabela 9 – Distribuição da percentagem cumulativa de MIC (mg/L) para *Legionella* publicada pelo EUCAST 2017 (50).

Antimicrobiano	n	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	Referência*
Azitromicina	100	8	39	82	83	91	97	97	97	100		[2]
Ciprofloxacina	100			3	38	95	97	98	100			[2]
Levofloxacina	100			24	87	97	97	98	100			[2]

* [2] inclui os serogrupos 1, 6, 8 e 10.

■ valores de MIC para a estirpe WT definidos pelo EUCAST 2017

Na tabela 10, são apresentados, a variação de suscetibilidade, o MIC₅₀ (mg/L) e o MIC₉₀ (mg/L) que correspondem à menor concentração do agente antimicrobiano na qual 50% e 90% dos isolados têm seu crescimento inibido, respetivamente.

Tabela 10 – Amplitude de suscetibilidade, MIC₅₀ e MIC₉₀ dos três antibióticos testados para todos isolados de *Legionella pneumophila* (n= 42).

	Range (mg/L) de suscetibilidade	MIC ₅₀ (mg/L)*	MIC ₉₀ (mg/L)*
Antibiótico			
Azitromicina	0.064 – 1.5	0.25	0.75
Ciprofloxacina	0.38 – 1.5	0.5	0.75
Levofloxacina	0.19 – 0.75	0.38	0.5

*MIC₅₀, MIC₉₀: Menor concentração de agentes antimicrobianos em que 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respetivamente.

Quanto a variação da suscetibilidade, a azitromicina apresentou a maior amplitude, pois os valores variaram de 0.064 a 1.5 mg/L. Com os valores do MIC₅₀ e MIC₉₀ podemos confrontar a potência dos antimicrobianos dado que quanto menor for a concentração necessária para inibir a bactéria, mais potente será o antimicrobiano (108). Portanto, para o MIC₅₀, a azitromicina foi o antimicrobiano mais potente, o MIC

foi o menor [0.25 mg/L], seguido pela levofloxacina [0.38 mg/L], ficando por último a ciprofloxacina [0.5 mg/L]. Na inibição de crescimento de 90% dos isolados, percebe-se que a levofloxacina se apresenta mais potente com um MIC de [0.5 mg/L] em comparação aos outros dois antimicrobianos cujos MICs foram igualmente [0.75 mg/L]. Assim a levofloxacina permaneceu como o mais potente quando observamos a inibição de crescimento da totalidade da amostra, ou seja, o MIC₁₀₀ que foi de [0.75 mg/L], já para a azitromicina e ciprofloxacina foi de [1.5 mg/L]. Assim, comparando a atividade destes três antimicrobianos na amostra testada, a levofloxacina foi o que precisou de menor concentração para inibir todos isolados. Este resultado está de acordo com o relatado em estudos anteriores nos quais, destes três antimicrobianos, a levofloxacina também demonstrou ser o mais potente (34, 87, 120).

O EUCAST estabeleceu valores para o MIC da estirpe selvagem (tabela 9) permitindo utilizá-los para a detecção de mecanismos de resistência se o MIC do isolado em estudo estiver acima da estirpe WT. Não foram definidos *breakpoint* para interpretar a suscetibilidade aos antimicrobianos para a *L. pneumophila* (66). Segundo estas orientações, o MIC da estirpe WT para azitromicina e levofloxacina é [1 mg/L], já para ciprofloxacina é [2 mg/L]. Neste estudo, todas as bactérias foram inibidas com concentrações abaixo da estirpe WT, exceto três isolados (tabela 7). De modo geral, os antimicrobianos testados expressaram boa atividade impedindo o crescimento dos isolados a baixas concentrações. Os dados obtidos indicam que as estirpes em circulação em Portugal são suscetíveis permitindo a utilização para o tratamento da DL, qualquer um dos antimicrobianos testados.

Existiram dois isolados, o E100 e o E119, cujos valores foram iguais ao limite superior da estirpe selvagem para a azitromicina, isto é, [1 mg/L]. Estes testes foram repetidos, e verificou-se que o E100 manteve o MIC [1 mg/L] e o E119 baixou para [0.75 mg/L]. Isso exclui qualquer suspeita de poder haver algum tipo de resistência nestes isolados.

Houve três isolados (HSC2, HSC30, E126) que apresentaram um MIC superior ao da estirpe selvagem, o isolado HSC2 teve um MIC [3 mg/L] para ciprofloxacina, os isolados HSC30 e E126 um MIC [1.5 mg/L] para azitromicina. Todos estes MICs foram repetidos nas mesmas condições. Na repetição os resultados variaram, ficando semelhantes ao da estirpe WT, assim o isolado HSC2 baixou o MIC para [1.5 mg/L] e o isolado E126 para [0.75 mg/L]. Estas alterações apontam para que estas bactérias não possuam mecanismos de resistência visto que normalizaram os seus MICs demonstrando a importância das repetições sempre que seja detetado um valor de MIC alterado. Ao invés dos anteriores, o HSC30 manteve o MIC inicial (tabela 6 e 7).

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos das isolados HSC2 e E126 são apresentados na figura 12 e as repetições na figura 13.

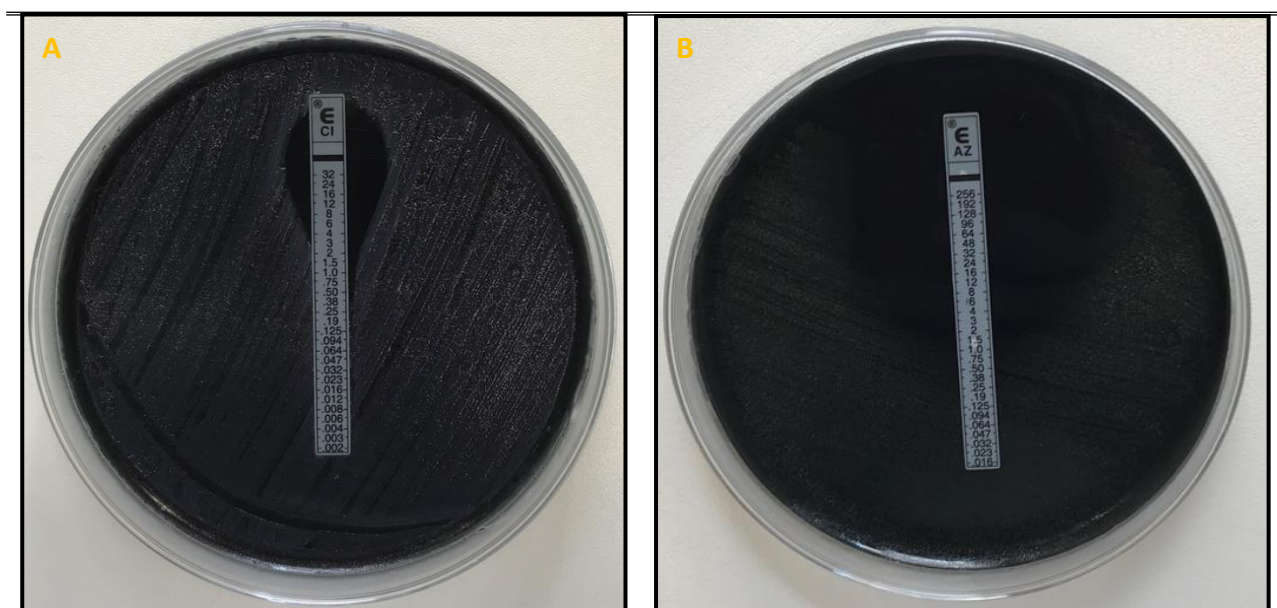


Figura 12 – Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos da *L. pneumophila*, em meio BCYE-α utilizando a metodologia do E-test, 48 h de incubação a 37 °C conforme o protocolo EUCAST 2017. **A)** Estirpe HSC2, tira de ciprofloxacina [0.002-32 µg/mL] MIC = 3 µg/mL. **B)** Estirpe E126, tira de azitromicina [0.016-256 µg/mL] MIC = 1.5 µg/mL, fotos recolhidas durante o presente trabalho.

Sobre o isolado HSC30, sabe-se que foi obtido a partir de uma amostra clínica, no ano de 1997, sendo proveniente de um hospital pertencente ao distrito de Lisboa. Pertence à espécie *L. pneumophila* sg 1 e ao genótipo ST 172, perfil que está disseminado pelo mundo (Anexo I). Este isolado apresentou um MIC para azitromicina consistentemente mais elevado que o verificado para a estirpe selvagem. Isto quer dizer que provavelmente este isolado deve possuir algum mecanismo de resistência à azitromicina. De acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira identificação de um isolado de *L. pneumophila* resistente a antibiótico em Portugal. Em 2012, Bruin e colaboradores já haviam encontrado um isolado de *Legionella* com um MIC elevado para azitromicina. O isolado foi recuperado na Holanda e pertencia ao sg 1 da *L. pneumophila* (127). Em 2014, no Canadá estudos demonstrando a diminuição da suscetibilidade de alguns isolados clínicos à azitromicina (80). Em 2019, Jia e colaboradores relatou ter encontrado, na China, isolados com MICs elevados, comparativamente à estirpe selvagem, referiu que 25 isolados *L. pneumophila* sg1 eram resistentes à azitromicina com MICs que variavam de 1.5 a 2 mg/L. Estas bactérias foram analisadas e conseguiram identificar a expressão do gene da bomba de efluxo LpeAB como responsável pela resistência (72).

Até o momento, a resistência aos macrolídeos foi atribuída à presença da bomba de efluxo LpeAB (72, 90, 124, 129) ou devido a mutações em genes que codificam o gene 23S RNAr e as proteínas ribossomais L4 e L22 (35, 72).

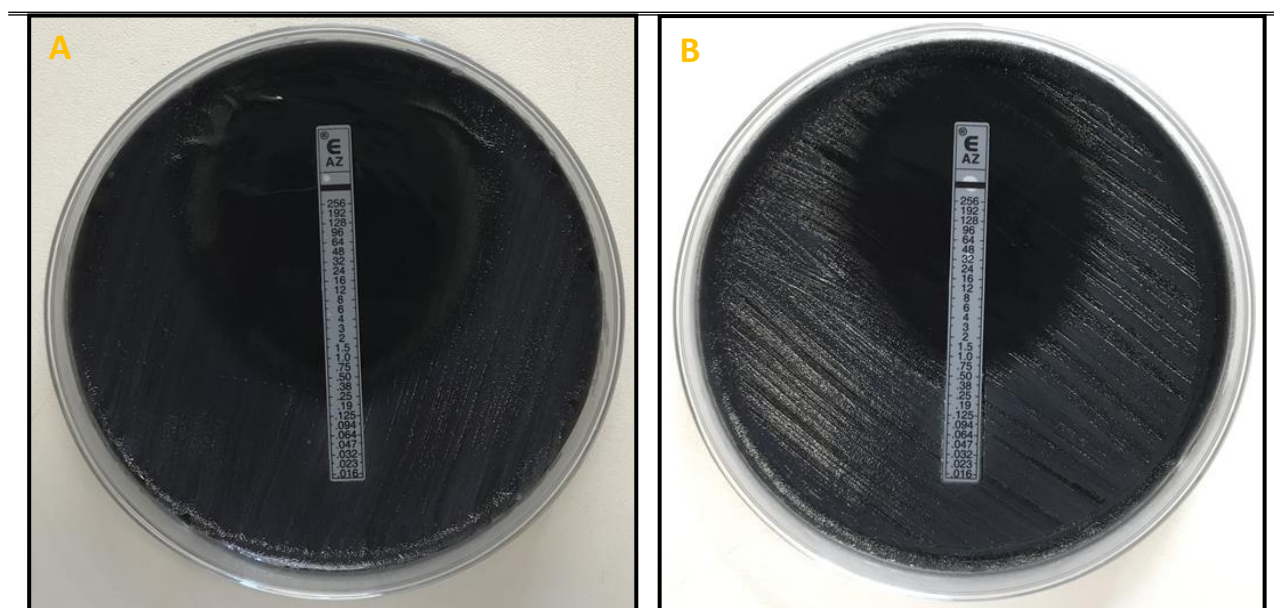


Figura 13 – Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos do isolado de *L. pneumophila* HSC30 (A) e repetição do teste (B). Ambos os testes foram realizados em meio BCYE- α utilizando a metodologia do E-test. As leituras foram realizadas após 48 h de incubação a 37 °C conforme o protocolo EUCAST 2017. As tiras de azitromicina [0.016-256 µg/mL], apresentando o mesmo MIC = 1.5 µg/mL, fotos recolhidas durante o presente trabalho.

Há várias teorias sobre como as bactérias do género *Legionella* se tornam resistentes aos antibióticos. Serem descendentes de isolados que estiveram expostos a estes medicamentos no meio ambiente aquático onde vivem. Serem descendentes de isolados que sofreram seleção *in vivo* de mutantes resistentes em pacientes com DL (5, 33). Um estudo já sugeriu que estes microrganismos apresentam um forte potencial para desenvolverem resistências à fluorquinolonas. O estudo demonstrou o aparecimento deste acontecimento realizando passagens sucessivas em meio de cultura com este fármaco (6). Apesar da liberação ambiental de antibióticos promover o surgimento de linhagens bacterianas resistentes (32), isso ainda não foi demonstrado para espécies de *Legionella* (112).

Algumas limitações deste estudo são intrínsecas ao microrganismo trabalhado, a *Legionella* requer meios nutritivos específicos não crescendo em meios bacteriológicos comuns. Por apresentarem caráter fastidioso, necessitam da incorporação de carvão ativado para que ocorra a adsorção do peróxido de hidrogênio e de radicais superóxidos produzidos na fase de multiplicação da bactéria e que se vão acumulando e originando um ambiente nocivo para o seu desenvolvimento. A presença deste composto consiste num outro fator limitante, pois ele provoca a alteração do MIC, como demonstramos nos ensaios com o *S. aureus* nos três meios. Outra questão é o carácter intracelular deste microrganismo sendo responsável pela dicotomia *in vitro* versus *in vivo*, pois o macrófago alveolar humano representa o local de infeção desta. E por fim, o número de amostras trabalhadas e a diversidade de fármacos testados, isso deveu-se a limitações do orçamento disponível para a realização do presente estudo.

Capítulo 4 – Conclusão

A DL, uma pneumonia potencialmente fatal, apresenta uma taxa de letalidade que tem variado de 5% a 30% nos diferentes surtos ocorridos em diversos países (109). Na Europa a taxa de mortalidade tem-se situado nos 8% (47). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a *Legionella* pode ser encontrada praticamente em todo o planeta visto que tem a água como reservatório, disseminando-se tanto em ambientes naturais como artificiais. Os locais de risco são os sistemas de distribuição de água com depósitos e de climatização em hotéis, centros comerciais, indústrias, grandes empresas, hospitais, assim percebemos que os surtos podem ocorrer em vários locais. Portanto, a mitigação dos riscos da DL e suas consequências para a sociedade consistem na prevenção da proliferação destas bactérias através da adequada manutenção dos sistemas hidráulicos para garantir sua salubridade e higienização. Apesar de existirem medidas preventivas, surtos e casos esporádicos ocorrem.

O tratamento preconizado para a DL é eficaz, porém tem sido relatado cada vez mais casos de falhas devido a aquisição de mecanismos de resistência por estes microrganismos. Pelo que é importante que se realizem pesquisas para avaliar o padrão de suscetibilidade da *L. pneumophila* aos antimicrobianos e o desenvolvimento de resistências. O presente trabalho pretendeu conhecer o padrão de suscetibilidade das estirpes clínicas que foram identificadas em Portugal durante o período de 1987 a 2016.

4.1 Meio de cultura

Com os testes de sensibilidade aos antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29213 em diferentes meios, concluímos que o carvão interfere no MIC provocando um aumento de 4 vezes o valor do MIC para azitromicina, de 8 vezes para o MIC do ciprofloxacina e quase 8 vezes para levofloxacina. Ao serem reproduzidos os testes nas mesmas condições em meio sem o carvão, obtivemos valores de MIC normais para o ciprofloxacina e para a levofloxacina, mas para a azitromicina ocorreu uma elevação de 6 vezes comparativamente ao teste no meio MH. Em relação ao macrolídeo, poderá existir algum constituinte no meio específico para *Legionella* que interfira e cause a elevação do MIC para o antimicrobiano testado, já em relação às fluorquinolonas, concluímos que o meio com o carvão interfere nos valores do MIC ocasionando o seu aumento.

Nos testes com a *L. pneumophila* ATCC 33152, verificou-se que para a concentração necessária para a realização dos E-tests a bactéria cresceu bem no meio com o carvão, mas em meio sem carvão, teve o seu crescimento prejudicado, não existindo qualquer crescimento. Conclui-se que para realizar o presente estudo a presença do carvão é essencial.

4.2 Suscetibilidade aos antimicrobianos da *L. pneumophila*

Neste trabalho, a avaliação da suscetibilidade nos 42 isolados testados identificou um isolado com resistência a um dos três antibióticos testados o que reflete uma taxa de resistência de 2,4%. Devido ao baixo número de isolados analisados e ao número reduzido de antimicrobianos utilizados, novas investigações serão indispensáveis para se conhecer e monitorar o perfil de suscetibilidade das estirpes de *Legionella* disseminadas em Portugal. Quanto ao isolado HSC30, consideramos importante prosseguir o estudo realizando a deteção da presença do gene da bomba de efluxo LpeAB, conforme já foi descrito na literatura como o responsável pela baixa sensibilidade à azitromicina.

A vigilância da suscetibilidade aos antimicrobianos da *Legionella* presente em amostras clínicas e ambientais é relevante. Proporciona o conhecimento do panorama de resistência desses microrganismos permitindo um melhor direcionamento do tratamento, evitando falhas terapêuticas e custos relacionados com a hospitalização prolongada de doentes. Permite igualmente a monitorização do aparecimento de resistências em isolados ambientais, conhecer a epidemiologia local de resistência antimicrobiana nestes isolados e ainda, permite implementar medidas de controle eficazes para combater a propagação destes microrganismos resistentes. Oferece a possibilidade de mensurar a progressão do surgimento dessas resistências através da comparação entre estudos, passados e futuros. Portanto, novas pesquisas devem ser realizadas, aumentando o número de amostras a analisar e com maior diversidade de antibióticos investigados.

Já foi preconizado que a vigilância da suscetibilidade de *Legionella* aos antimicrobianos devem ser repetidos a cada 3 a 5 anos (34, 66, 120).

4.3 Conclusão final

De modo geral, nosso estudo mostrou que azitromicina, ciprofloxacina e levofloxacina possuem uma potente atividade antimicrobiana contra os isolados clínicos de *L. pneumophila* analisados. Os presentes dados sugerem provável eficácia destas medicações no tratamento das infeções por esta bactéria.

O método utilizado na determinação do padrão de suscetibilidade mostrou-se uma técnica simples, reprodutível e está disponível para os laboratórios de rotina, sendo recomendado pelo EUCAST a sua implementação.

No presente estudo conseguimos identificar um isolado com um MIC acima da estirpe WT para azitromicina. Provavelmente este isolado possui algum tipo de mecanismo de resistência que deverá ser estudado. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro relato de um isolado clínico de *Legionella* resistente em Portugal. Em conclusão, podemos perceber que é de grande importância a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana em isolados clínicos para ajustar a terapia antibacteriana permitindo, assim, a prescrição de tratamentos direcionados e seguramente mais eficazes.

Bibliografia

Bibliografia

- 1) **Abdel-Nour M., Duncan C., Low D. E., Guyard C.** (2013) Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. Int J Mol Sci 14, 21660–21675.
- 2) **Abu Khweek A., Amer A. O.** (2018). Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8: 38. doi: 10.3389 / fcimb.2018.00038
- 3) **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil (ANVISA).** (2020). Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. Acessível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm, em junho 2020.
- 4) **Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C.** (2007). *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. Cell Mol Life Sci. 64(4):432-48.
- 5) **Alexandropoulou I. G., Parasidis T. A., Konstantinidis T. G., Constantinidis T. C., Panopoulou M.** (2013). Antibiotic Susceptibility Surveillance of Environmental *Legionella* Strains: Application of the E-Test to Bacteria Isolated From Hospitals in Greece. J Infect Dis Ther 1: e103. doi:10.4172/2332-0877.1000e103.
- 6) **Almahmoud I., Kay E., Schneider D., Maurin M.** (2009). Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother 64: 284-293. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkp173>, em junho de 2019.
- 7) **American Society for Microbiology** (2004). Clinical Microbiology Procedures. 2ª Ed ASM. Clin Inf Dis 2000; 31:347-82
- 8) **Arashiro T., Nakamura S., Asami T., Mikuni H., Fujiwara E., Sakamoto S., Miura R., Shionoya Y., Honda R., Furukawa K., Nakamura A., Saito H.** (2020). SARS-CoV-2 and *Legionella* co-infection in a person returning from a Nile cruise. J Travel Med;27(3):taaa053. doi:10.1093/jtm/taaa053
- 9) **Arnold F. W., Summersgill J. T., Lajoie A. S., Peyrani P., Marrie T. J., Rossi P., Blasi F., Fernandez P., File TM Jr, Rello J., Menendez R., Marzoratti L., Luna C. M., Ramirez J. A.** (2007). Community-Acquired Pneumonia Organization Investigators. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 175:1086–1093. doi:10.1164/rccm.200603-350OC.
- 10) **Arslan-Aydoğdu E. Ö., Kimiran, A.** (2018). An investigation of virulence factors of *Legionella pneumophila* environmental isolates. Rev Bras Microb: [publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia], 49 (1), 189–199. doi: 10.1016 / j.bjm.2017.03.012.00000000p88

-
- 11) **Benoliel M. J., Cruz Fernando A. L. A., Diegues P.** (2018). Prevenção e Controlo de *Legionella* nos Sistemas de Água. Instituto Português da Qualidade em parceria com a EPAL, Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A, 3ª Edição, Lisboa, PT.
 - 12) **Bozzaro S.** (2015). Emergence of Microbial Resistance During Hospitalization. *EBioMedicine*, 2(9), 1022. doi:10.1016/j.ebiom.2015.08.008. Acessível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588410>
 - 13) **Brady M. F., Sundareshan V.** (2019). Legionnaires' Disease (*Legionella* Infection). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Acessível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430807/>
 - 14) **Bruin J. P., Koshkolda T., IJzerman E. P., Lück C., Diederer B. M., Den Boer J. W., Mouton J. W.** (2014). Isolation of ciprofloxacin resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (10): 2869–71. doi: 10.1093/jac/dku196. Acessível em: <https://academic.oup.com/jac/article/69/10/2869/2911136>.
 - 15) **Brum G., Froes F.** (2001). Pneumonias, 25 Perguntas Frequentes em Pneumologia. Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Acessível em: <https://www.sppneumologia.pt/publicacoes/outras-publicacoes/25-perguntas-em-pneumologia>
 - 16) **Brunton L.L., Hilal-Dandan R., Knollmann, B.C.** (2018). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13th ed., New York, USA: McGraw-Hill. ISBN: ISBN: 978-1-25-958474-9.
 - 17) **Burdet C., Lepeule R., Duval X., Caseris M., Rioux C., Lucet J.C., Yazdanpanah Y.** (2014). Quinolones versus macrolides in the treatment of legionellosis: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69 (9), 2354-60. doi: 10.1093 / jac / dku159.
 - 18) **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2018). *Legionella* (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever). Disponível em: <https://www.cdc.gov/legionella/index.html>
 - 19) **Chasqueira M. J., Rodrigues L., Nascimento H., Ramos H., Marques T.** (2014) Genetic diversity and evolutionary relationships among *Legionella pneumophila* clinical isolates, Portugal, 1987 to 2012. *Euro Surveill.* 19(46). pii: 20965. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.46.20965. Acessível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.46.20965>

-
- 20) **Chasqueira M. J. F.** (2017). Doença dos legionários: estudo da diversidade de isolados de *Legionella* obtidos em Portugal, 1987-2016. Tese de Doutoramento em Ciências da Vida, Medicina Celular e Molecular (Microbiologia). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.
- 21) **Cilloniz C., Torres A.** (2017). Typical Presentation of *Legionella pneumophila* Community-Acquired Pneumonia. Rev Port Pneumol, 23 (3): 115-116. doi: 10.1016 / j.rppnen.2017.04.001.
- 22) **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** (2018) CLSI M23-Ed5: Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters, 5th Edition. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>
- 23) **Compri-Nardy M., Stella M.B., Oliveira C.** (2009). Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica. 1ª Ed. Guanabara Koogan, ISBN: 9788527715386.
- 24) **Corrêa R. A., Costa A. N., Lundgren F., Michelim L., Figueiredo M. R., Holanda M., Gomes M., Teixeira P. J. Z., Martins R., Silva R., Athanazio R. A., Silva R. M., Pereira M. C.** (2018). Recomendações para o manejo da pneumonia adquirida na comunidade. J Bras Pneumol; 44(5):405-423
- 25) **Corrêa R. A., Lundgren F. L. C., Pereira-Silva J. L., Silva R. L. F.** (2009). Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, J Bras Pneumol; 35(6):574-601. Acessível em: http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe_artigo.asp?id=1143
- 26) **Correia A. M., Ferreira J. S., Borges V., Nunes A., Gomes B., Capucho R., Gonçalves J., Antunes D. M. , Sónia Almeida, Mendes A., Guerreiro M., Sampaio D. A., Vieira L., Machado J., Simões M. J., Gonçalves P., Gomes J. P.** (2016). Probable person-to-person transmission of Legionnaires' disease. N. Engl. J. Med. 374, 497–498.
- 27) **Cortés-Sánchez A. De J., Espinosa-Chaurand, L. D., Díaz-Ramírez M.** (2018). *Legionella spp.*, a hazard to human health. AGROProductividad, vol. 11, no. 11, 2018, p. 53+. Disponível em: <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1283>
- 28) **Costa A. N., a, Costa F. M., Campos S. V., Salles R. K., Athanazio R. A.** (2018). Microbioma pulmonar: desafios de um novo paradigma. J. bras. pneumol. vol.44, n.5, pp.424-432. ISSN 1806-3713. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562017000000209>.
-

-
- 29) **Cunha B. A., Burillo A., Bouza E.** (2016). Legionnaires' disease. *Lancet*. 387(10016):376-85. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60078-2. Disponível em [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(15\)60078-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)60078-2/fulltext).
- 30) **Cunha B. A., Wu G., Raza M.** (2015). Clinical Diagnosis of Legionnaire's Disease: Six Characteristic Clinical Predictors. *The American Journal of Medicine*, 128 (7): e21-2. doi: 10.1016 / j.amjmed.2015.01.030.
- 31) **Darby J., Buising K.**, (2008). Could it be *Legionella*? Reprinted from Australian Family Physician, 37(10):812-5. Acessível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002299>
- 32) **Davies J, Davies D.** (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. Sep;74(3):417-33. doi: 10.1128/MMBR.00016-10. PMID: 20805405; PMCID: PMC2937522.
- 33) **D'Costa V. M., McGrann K. M., Hugues D. W., Wright G. D.** (2006). Sampling the antibiotic resistome, *Science*, vol. 311 (pg. 374-7). Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/311/5759/374.abstract>
- 34) **De Giglio O., Napoli C., Lovero G., Diella G., Rutigliano S., Caggiano G., Montagna M. T.** (2015). Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environ Res*. 142:586–90. doi: 10.1016 / j.envres.2015.08.013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26298602>
- 35) **Descours G., Ginevra C., Jacotin N., Forey F., Chastang J., Kay E., Etienne J., Lina G., Doublet P., Jarraud S.** (2017). Ribosomal Mutations Conferring Macrolide Resistance in *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(3), e02188-16. doi:10.1128/AAC.02188-16.
- 36) **Diaz-Fuentes G., Singhal R., Venkatram S.** (2019). Advances in Treatment and Outcomes of Patients with *Legionella* Infection. *IntechOpen*. Doi: 10.5772/intechopen.88481. Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/advances-in-treatment-and-outcomes-of-patients-with-legionella-infection>
- 37) **Diederen B. M.** (2008). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect*. 56(1):1-12. Disponível em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(07\)00765-7/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(07)00765-7/fulltext)
- 38) **Direcção Geral da Saúde (DGS).** (2012). Antibioterapia na Pneumonia Adquirida na Comunidade em Adultos Imunocompetentes. Norma nº 045/2011 de 26/12/2011. Acessível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0452011-de-26122011.aspx>
-

-
- 39) **Direcção Geral da Saúde (DGS).** (2014). Vigilância em saúde pública: doença dos legionários em Portugal 2004-2013. (disponível em: <https://www.dgs.pt/doenca-dos-legionarios/vigilancia-epidemiologica/vigilancia-epidemiologica.aspx>).
- 40) **Edelstein P. H.** (1982) Comparative Study of Selective Media for Isolation of *Legionella pneumophila* from Potable Water. J. Clin. Micro. 16(4): 697-699. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272448/>
- 41) **Eisenreich W., Heuner K.** (2016). The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. FEBS Lett., 590 (21): 3868-3886. doi: 10.1002 / 1873-3468.12326.
- 42) **Erdogan, Haluk.** (2018). Legionnaires' Disease. Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials. Doi: 10.4274/mjima.2018.2.
- 43) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2019). Legionnaires' disease. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC. Acessível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2017>
- 44) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2014) Legionnaires' disease in Europe, 2012. Stockholm. Acessível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-europe-2012>
- 45) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2016). Legionnaires' disease in Europe, 2014. Stockholm: ECDC. Acessível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-europe-2014.pdf>
- 46) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2017). European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) – Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/publications-data/europeanlegionnaires-disease-surveillance-network-eldsnet-operating-procedures>
- 47) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2020). Legionnaires' disease. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC. Acessado em: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_Legionnaires.pdf
- 48) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2020). Surveillance atlas of infectious diseases. Stockholm. Acessível em: <http://atlas.ecdc.europa.eu>, em junho 2020.
- 49) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2020). Annual report of the Director – 2019. Stockholm. Acessível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/annual-report-director-2019>
-

-
- 50) **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** (2017). Antimicrobial susceptibility testing of *Legionella pneumophila*. EUCAST. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Legionella_guidance_document_20171208.pdf
- 51) **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** (2019) EUCAST. Disponível em: <http://www.eucast.org>, em junho de 2019.
- 52) **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** (2020). Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0. Acessível em: <http://www.eucast.org>.
- 53) **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** (2020). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. Disponível em: <http://www.eucast.org>.
- 54) **File T. M.** (2003) Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 362:1991-2001. Doi: 10.1016/S0140-6736(03)15021-0. Acessado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14683661>
- 55) **Food and Drug Administration (FDA).** (2018). Facts about the Fluoroquinolone Class. Acessível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-warns-about-increased-risk-ruptures-or-tears-aorta-blood-vessel-fluoroquinolone-antibiotics>
- 56) **Food and Drug Administration (FDA).** (2020). Index to Drug-Specific Information. Acessível em: <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/index-drug-specific-information>, em junho 2020
- 57) **Fraser D. W.** (2005) The challenges were legion. *Lancet Infect Dis*. 5(4):237-41. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70054-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70054-2)
- 58) **Froes F., Paiva J. A., Amaro P., Baptista J. P., Brum G., Bento H., Duarte P., Dias C. S., Glória C., Estrada H., Telo L., Silva E., Pereira J. G., Carmo G.** (2007). Documento de Consenso sobre pneumonia nosocomial. *Soc Port Pneumol e Soc Port Cuid Intens, Rev port pneumol* 13(3):419-486. DOI: 10.1016/S0873-2159(15)30360-3
- 59) **Gaia V., Fry N. K., Afshar B., Lück P. C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T. G.** (2005) Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*. 43(5):2047-52. doi: 10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005. Acessível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1153775/>
-

-
- 60) **Garcia M. T., Pelaz C., Gimenez M. J., Aguilar L.** (2000). *In vitro* activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results Antimicrob. Agents Chemother., vol. 44(8), p. 2176-2178. Doi: 10.1128/AAC.44.8.2176-2178.2000. Acessível em: <https://aac.asm.org/content/aac/44/8/2176.full.pdf>
- 61) **Garcia-Vidal C., Sanchez-Rodriguez I., Simonetti A. F., Burgos J., Viasus D., Martin M. T., Falco V., Carratalà J.** (2017). Levofloxacin versus azithromycin for treating *Legionella* pneumonia: a propensity score analysis. Clin Microbiol Infect. 23 (9): 653-658. doi: 10.1016 / j.cmi.2017.02.030. Acessível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X17301271>
- 62) **Garrido R. M. B., Parra F. J. E., Francés L. A., Guevara R. M. R., Sánchez-Nieto J. M., Hernández M. S., Martínez J. A. S., Huerta F. H.** (2005). Antimicrobial Chemotherapy for Legionnaires Disease: Levofloxacin versus Macrolides, Clinical Infectious Diseases, 40(6):800-6. Acessível em: <https://doi.org/10.1086/428049>
- 63) **George F, Shivajia T., Pinto C. S., Serra L. A. O., Valente J., Albuquerque M. J., Vicêncio P. C. O., San-Bento A., Diegues P., Nogueira P. J., Marques T., Rebelo H., Costa F., Rodrigues R., Nunes A., Borges V., Gomes J. P., Sampaio D., Barreiro P., Duarte S., Carpinteiro D., Mendonça J., Silva C., Vieira L., Simões M. J., Gonçalves P., Nunes B., Dias C., Machado J., Almeida F., Goncalves E. A., Carvalho L., Viterbo P., Jardim D., Lacasta N., Boavida F., Perez A., Santana I., Matias P., Banza N., Rabacal C.** (2016) A large outbreak of Legionnaires' Disease in an industrial town in Portugal. Rev Port Saúde Pública. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2016.10.001>
- 64) **Gershengorn H. B., Keene A., Dzierba A. L., Wunsch H.** (2015). The Association of Antibiotic Treatment Regimen and Hospital Mortality in Patients Hospitalized With *Legionella* Pneumonia. Clinical Infectious Diseases, 60(11): e66–e79, doi: 10.1093 / cid / civ157.
- 65) **Gomez-Valero L., Buchrieser C.** (2019). Intracellular parasitism, the driving force of evolution of *Legionella pneumophila* and the genus *Legionella*. Genes & Immunity, 20(5): 1. doi: 10.1038/s41435-019-0074-z.
- 66) **Graells T., Hernández-García M., Pérez-Jové J., Guy L., Padilla E.** (2018). *Legionella pneumophila* recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance. Environ Res. 166:638-646. doi: 10.1016/j.envres.2018.06.045. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29982152>
- 67) **Henry, R.** (2017). Etymologia: *Legionella pneumophila*. Emerging Infectious Diseases, 23(11), 1851. doi:10.3201/eid2311.et2311.
-

-
- 68) **Ho J., Ip M.** (2019). Antibiotic-Resistant Community-Acquired Bacterial Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am*;33(4):1087-1103. doi: 10.1016/j.idc.2019.07.002. Acessível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891552019300583?via%3Dihub>
- 69) **Jamilloux Y., Jarraud S., Lina G., Etienne J., Ader F.** (2012). *Legionella*, Legionnaires' disease. *Med Sci (Paris)*; 28(6-7):639-45. doi: 10.1051/medsci/2012286018
- 70) **Jarraud S., Freney J.,** (2011). *Legionella* (2° Éd.) Coll. Monographies de microbiologie. Editions Technique & Documentation, Lavoisier, Paris.
- 71) **Jasper A. S., Musuuza J. S., Tischendorf J. S., Stevens V. W., Gamage S. D., Osman F., Safdar N.** (2020). Are Fluoroquinolones or Macrolides Better for Treating *Legionella* Pneumonia? A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*; ciaa441. doi:10.1093/cid/ciaa441
- 72) **Jia X., Ren H., Nie X., Li Y., Li J., Qin T.,** (2019). Antibiotic Resistance and Azithromycin Resistance Mechanism of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 23;63(10). doi: 10.1128/AAC.00768-19.
- 73) **Kahlmeter G.** (2014). Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Upsala journal of medical sciences*, 119(2), 78–86. doi:10.3109/03009734.2014.901446.
- 74) **Kahlmeter L., Brown D. F., Goldstein F. W., MacGowan A. P., Mouton J. W., Österlund A., Rodloff A., Steinbakk M., Urbaskova P., Vatopoulos A.** (2003). European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 52:145–8. doi: 10.1093 / jac / dkg312. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/52/2/145/719719>
- 75) **Katzung, B.G., & Trevor, A.J.** (2018). *Basic and Clinical Pharmacology*, 14th edition, New York, USA: Lange, McGraw-Hill., 2018. ISBN: ISBN: 978-1-259-64115-2
- 76) **Khodr A., Kay E., Gomez-Valero L., Ginevra C., Doublet P., Buchrieser C., Jarraud S.** (2016). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infection, Genetics and Evolution.* 43: 108-22. Doi: 10.1016/j.meegid.2016.04.033.
- 77) **Lee S.** (2018) An Overview of the European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation of Infections Caused by *Legionella* species. *Perspectives in Public Health.* Volume: 138 issue: 5, page(s): 241-247. Acessado em: <https://doi.org/10.1177/1757913918790922>
- 78) **Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date** (2019), Acessado em: <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date>, em maio de 2020.
-

-
- 79) **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN).** (2020). Genus *Legionella*. Acessível no: <http://www.bacterio.net/legionella.html>, em maio de 2020.
- 80) **Mallegol, J., P. Fernandes, R.G. Melano, and C. Guyard.** (2014). Antimicrobial activity of solithromycin against clinical isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 909-915.
- 81) **Mandell L. A., Wunderink R. G., Anzueto A., Bartlett J. G., Campbell G. D., Dean N. C., Dowell S. F., File T. M. Jr, Musher D. M., Niederman M. S., Torres A., Whitney C. G.** (2007). Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults, *Clin Infect Dis.* 44 (2): S27-72. DOI: 10.1086 / 511159.
- 82) **March G. A., Gutiérrez M. P., López I., Muñoz M. F., Ortiz de Lejarazu R., Simarro H., Orduña A., Bratos M. Á.** (2018). Epidemiological surveillance and wild-type MIC distribution of *Legionella pneumophila* in north-western Spain. 2003–2016. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* pii: S0213-005X (18) 30377-X. doi: 10.1016 / j.eimc.2018.11.006. Acesso em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30591389>
- 83) **Marques T. M., Piedade J.** (1997) Susceptibility testing by E-test and agar dilution of 30 strains of *Legionella* spp. isolated in Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 3(3):365-368
- 84) **McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, W. R.** (1977) Dowdee, and Laboratory Investigation Team. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 297:1197-1203.
- 85) **Mercante J. W., Winchell J. M.** (2015). Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev* 28:80–118. doi:10.1128/CMR.00029-14.
- 86) **Metlay J. P., Waterer G. W., Long A. C., Anzueto A., Brozek J., Crothers K., Cooley L. A., Dean N. C., Fine M. J., Flanders S. A., Griffin M. R., Metersky M. L., Musher D. M., Restrepo M. I., Whitney C. G.** (2019) Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med* 200: e45–e67. <https://doi.org/10.1164/rccm.201908-1581ST>
- 87) **Miyashita N., Kobayashi I., Higa F., Aoki Y., Kikuchi T., Seki M., Tateda K., Maki N., Uchino K., Ogasawara K., Kurachi S., Ishikawa T., Ishimura Y., Kanesaka I., Kiyota H., Watanabe A.** (2018). *In vitro* activity of various antibiotics against clinical strains of *Legionella* species isolated in Japan. *J Infect Chemoth*, 24(5): 325 – 329. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.01.018>.
-

-
- 88) **Moffie B. G., Mouton R. P.** (1988). Sensitivity and resistance of *Legionella pneumophila* to some antibiotics and combinations of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 22(4):457-62. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/22.4.457>
- 89) **Nascimento L. P., Souza K. C. O.** (2019) Presença de *Legionella* em sistemas hidráulicos: uma revisão bibliográfica. X Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Fortaleza/CE, Inst Bras de Est Ambient. Disponível em: <https://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2019/IX-047.pdf>
- 90) **Natås O. B., Brekken A. L., Bernhoff E., Hetland M. A. K., Löhr I. H., Lindemann P. C.** (2019). Susceptibility of *Legionella pneumophila* to antimicrobial agents and the presence of the efflux pump LpeAB. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 74 (6): 1545-1550. doi: 10.1093 / jac / dkz081. Acessível em: <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/74/6/1545/5366213?redirectedFrom=fulltext>
- 91) **National Center for Biotechnology Information (NCBI).** (2020) Taxonomy Browser. Acessível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>, em maio de 2020.
- 92) **Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL.** (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev*. 23(2):274-98. doi: 10.1128/CMR.00052-09
- 93) **O'Connor B. A., Carman J., Eckert K., Tucker G., Givney R., Cameron S.** (2007). Does using potting mix make you sick? Results from a *Legionella longbeachae* case-control study in South Australia. *Epidemiol Infect*;135(1):34-9
- 94) **Oliva G., Sahr T. and Buchrieser C.** (2018). The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 8:3. doi: 10.3389/fcimb.2018.00003.
- 95) **Oliveira A. G.** (2005). Práticas actuais na abordagem hospitalar da pneumonia adquirida na comunidade em Portugal. Consenso de um painel de peritus. *Rev Port Pneumol*, 11 (3): 243-282. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0873-2159\(15\)30502-X](https://doi.org/10.1016/S0873-2159(15)30502-X)
- 96) **Orkis L. T., Harrison L. H., Mertz K. J., Brooks M. M., Bibby K. J., Stout J. E.** (2018). Environmental sources of community-acquired legionnaires' disease: A review. *Int J Hyg Environ Health*, 221 (5): 764-774. doi: 10.1016 / j.ijheh.2018.04.013.
- 97) **Osterholm M. T., Chin T. D. Y., Osborne D. O., Dull H. B., Dean A. G., Fraser D. W., Hayes P. S., Hall W. N.** (1983). A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am J Epidemiol*. 117(1):60-7. Acessível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113516>
- 98) **Park J.M., Ghosh S., O'Connor T. J.** (2020). Combinatorial selection in amoebal hosts drives the evolution of the human pathogen *Legionella pneumophila*. *Nat Microbiol*;5(4):599-609. Doi:10.1038/s41564-019-0663-7
-

-
- 99) **Paschke A., Schaible U. E., Hein W.** (2019). *Legionella* transmission through cooling towers: towards better control and research of a neglected pathogen. *Lancet Respir Med.* 7 (5): 378-380. doi: 10.1016 / S2213-2600 (19) 30041-4.
- 100) **Pedro-Botet L., Yu V. L.** (2005). *Legionella*: macrolides or quinolones? *Clin Microbiol Infect*;12 Suppl 3:25-30. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61319-7/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61319-7/pdf)
- 101) **Phin N., Parry-Ford F., Harrison T., Stagg H. R., Zhang N., Kumar K., Lortholary O., Zumla A., Abubakar I.** (2014). Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 14(10):1011-21. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70713-3.
- 102) **Pinel L, Hoffman PS, Bell S.** (1983) Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl Environ Microbiol.* 45(3):784-91
- 103) **Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, Benson RF, Franzus MJ.** (1986) Role of keto acids and reduced-oxygen-scavenging enzymes in the growth of *Legionella* species. *J Clin Microbiol.* 23(1):33-42
- 104) **Prussin A. J., Schwake D. O., Marr L. C.** (2017). Ten Questions Concerning the Aerosolization and Transmission of *Legionella* in the Built Environment. *Building and Environment*, 123: 684-695. doi: 10.1016 / j.buildenv.2017.06.024.
- 105) **Qianqian Mou & Polly H. M. Leung,** (2018). Differential expression of virulence genes in *Legionella pneumophila* growing in *Acanthamoeba* and human monocytes, *Virulence*, 9:1, 185-196, DOI: 10.1080/21505594.2017.1373925.
- 106) **Rahimi B., Vesal A.** (2017). Antimicrobial Resistance Properties of *Legionella Pneumophila* Isolated from the Cases of Lower Respiratory tract Infections. *Biomed Pharmacol J*;10(1). Acessado no: <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/1081>, em junho de 2019.
- 107) **Regueiro-Mira M. V., Pita-Fernández S., Pérttega-Díaz S., López-Calviño B., Seoane-Pillado T., Fernández-Albalat-Ruiz M.** (2015). Prognostic factors in adult patients hospitalized for pneumonia caused by *Legionella pneumophila*. *Rev chil infect*, 32(4), 435-444. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000500010>
- 108) **Sader H. S., Gales A. C., Reis A. O., Zocchi C., Sampaio J., Jones R. N. (2001).** Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade: resultados brasileiros do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos dos anos de 1997 e 1998. *J. Pneumol.* 27(1). Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jpneu/v27n1/9251.pdf>
-

- 109) **Sandeep K.R., Sandhya Rani B.S.**, (2018) Legionnaires Disease. Nitte University Journal of Health Science. Vol. 8, No.2, June 2018, ISSN 2249-7110. Acessível em: <http://nitte.edu.in/journal/June2018/r1.pdf>
- 110) **Santonja F. J.** (2019). Incidencia del relato experiencial del paciente de legionelosis en un marco tecnológico Avanzado. Rev. salud ambient., 19 (Espec. Congr.): 8-63. Ponencias Presentadas en los Talleres Previos al XV Congreso de Salud Ambiental, Espanha.
- 111) **Serviço Nacional de Saúde (SNS)**. (2020) *Legionella*. Portal 40 anos SNS, Gov Repúb Port - MS. Acessível em: <https://www.sns.gov.pt/legionella>, em junho de 2019.
- 112) **Shadoud L., Almahmoud I., Jarraud S., Etienne J., Larrat S., Schwebel C., Timsit J. F., Schneider D., Maurin M.** (2015). Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones *in vivo*: the case of *Legionella pneumophila* and humans. EBioMedicine 2:1179–1185. doi:10.1016/j.ebiom.2015.07.018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588375>
- 113) **Shaheen M., Scott C., Ashbolt N.** (2019). Long-term persistence of infectious *Legionella* with free-living amoebae in drinking water biofilms. International Journal of Hygiene and Environmental Health. Doi: 10.1016/j.ijheh.2019.04.007.
- 114) **Sharaby Y., Nitzan O., Brettar I., Höfle M. G., Peretz A., Halpern M.** (2019). Antimicrobial agent susceptibilities of *Legionella pneumophila* MLVA-8 genotypes. Scientific Reports 9:6138. doi: 10.1038/s41598-019-42425-1. Acessível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42425-1>
- 115) **Shivaji T, Sousa Pinto C, San-Bento A, Oliveira Serra LA, Valente J, Machado J, Marques T, Carvalho L, Nogueira PJ, Nunes B, Vasconcelos P.** (2014) A large community outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal. Euro Surveill. 19(50): pii=20991. Article DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.50.20991>
- 116) **Sikora A., Gładysz I., Koziół-Montewka M., Wójtowicz-Bobin M., Stańczak T., Matuszewska R., Krogulska B.** (2017). Assessment of antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* isolated from water systems in Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 24(1), 66-69. <https://doi.org/10.5604/12321966.1234048>
- 117) **Smith SS, Ritger K, Samala U, Black SR, Okodua M, Miller L, Kozak-Muiznieks NA, Hicks LA, Steinheimer C, Ewaidah S, Presser L, Siston AM.** (2015) Legionellosis Outbreak Associated With a Hotel Fountain. Open Forum Infect Dis; 2(4): ofv164. doi: 10.1093/ofid/ofv164.
- 118) **Study Group for Legionella Infections (ESGLI)** (2020). Guidance for managing *Legionella* in building water systems during the COVID-19 pandemic. Acessível em: https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/3Research_Projects/ESGLI/ESGLI_GUIDANCE_FOR_MANAGING_LEGIONELLA_IN_BUILDING_WATER_SYSTEMS_DURING_THE_COVID19_PANDEMIC_2020_0418_v02.00.pdf

-
- 119) **Ta A. C., Stout J. E., Yu V. L., Wagener M. M.** (1995). Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *Journal of clinical microbiology*, 33(8), 2118–2123. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.8.2118-2123.1995>
- 120) **Torre I., Alfano R., Borriello T., De Giglio O., Iervolino C., Montagna M. T., Scamardo M. S., Pennino F.** (2018). Environmental surveillance and in vitro activity of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila* isolated from hospital water systems in Campania, South Italy: a 5-year study. *Environ Res.* 14:574–79. doi: 10.1016 / j.envres.2018.02.030.
- 121) **Travis T. C., Brown E. W., Peruski L. F., Siludjai D., Jorakate P., Salika P., Yang G., Kozak N. A., Kodani M., Warner A. K., Lucas C. E., Thurman K. A., Winchell J. M., Thamthitiwat S., Fields B. S.** (2012) Survey of *Legionella* species found in thai soil. *Int J Microbiol* 2012:218791. doi:10.1155/2012/218791.
- 122) **Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM)** (2007) Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 13 Suppl 3:1-46
- 123) **Van Heijnsbergen E., Schalk J. A., Euser S. M., Brandsema P. S., den Boer J. W., de Roda Husman A. M.** (2015). Confirmed and Potential Sources of *Legionella* Reviewed. *Environ Sci Technol*, 49 (8): 4797-815. doi: 10.1021 / acs.est.5b00142.
- 124) **Vandewalle-Capo M., Massip C., Descours G., Charavit J., Chastang J., Billy P. A., Boisset S., Lina G., Gilbert C., Maurin M., Jarraud S., Ginevra C.** (2017). Minimum inhibitory concentration (MIC) distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. *Int J Antimicrob Agents* 50 (5), 684–689. doi: 10.1016 / j.ijantimicag.2017.08.001. Acessível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28782709>
- 125) **Yu V. L., Pedro-Botet M. L.** (2016) Treatment and prevention of *Legionella* infection. UpToDate. Acessado em: <https://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prevention-of-legionella-infection/print>
- 126) **Whalen K., Finkel R., Panavelil T. A.** (2016). *Farmacologia ilustrada*. Tradução e revisão técnica: Langeloh A. 6. ed. Porto Alegre. Artmed. ISBN 978-85-8271-323-5, obra original: “Lippincott’s illustrated reviews: pharmacology, 6th Edition. ISBN 9781469887562. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. USA”
-

- 127) **Willem den Boer J., Bruin J. P., Ijzerman E. P., Mouton J. W., Diederren B. M.** (2012). Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Jan;72(1):103-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.016. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22100012.
- 128) **Willian H. K., Ristroph J. D., Allen R. G.** (1980) Liquid medium for growth of *Legionella pneumophila* J Clin Microbiol. 11(1):19-21.
- 129) **Wilson R. E., Hill R. L. R., Chalker V. J., Mentasti M., Pronto D.** (2018). Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* strains isolated in England and Wales 2007-17. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 73 (10): 2757-2761. doi: 10.1093 / jac / dky253. Acessível em: <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/73/10/2757/5057980?redirectedFrom=fulltext>
- 130) **Winn WC Jr.** (1988) Legionnaires disease: historical perspective. Clin Microbiol Rev. 1(1):60-81.
- 131) **World Health Organization (WHO).** (2007). *Legionella* and the prevention of legionellosis. Acessível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf

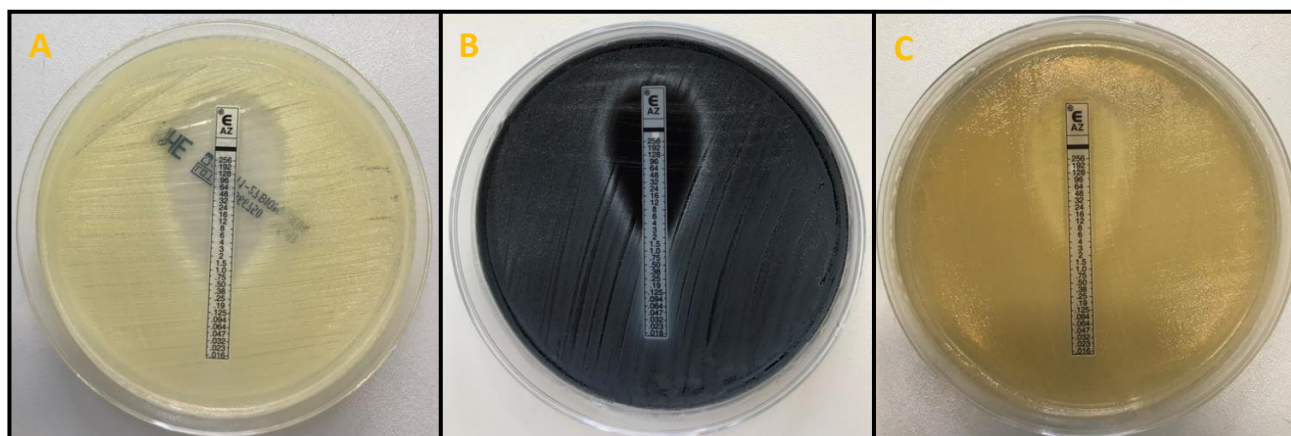
ANEXOS

Anexo I – Coleção de isolados clínicos de *Legionella* do laboratório de microbiologia recuperados em Portugal entre 1987 e 2016 (n=178).

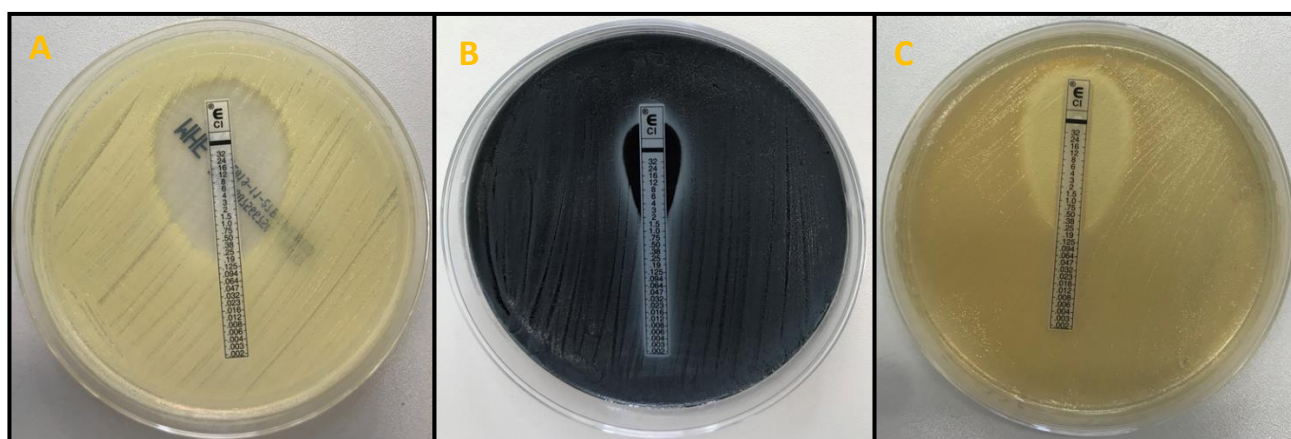
Perfis genótipos (ST)	Nº de isolados com o mesmo perfil	Identificação dos isolados	Isolados selecionada para o estudo
100	32	HSC 1-6, 8-9, 11, 14, 16-20, 22, 24, 26-27, 29, 31-32, 34-35, E5-6, E8-10, E12-13, E18 (HSC)	HSC2, E12 A6, A460
103	5	HSC13 (HSFX), HSM3, HSM4, E46 (Lx), E119 (Lx)	E119
23	11	HSC15 (HSFX), HSC33 (Hcap), HSM2, E49 (Norte), E51 (Lx), E101 (Lx), E 106 (Norte), E108(Norte), E117-118 (Norte), E127 (Norte)	E127
1	3	HSC21 (HCVP), HA, E126 (Alentejo)	126
62	7	HSC7, HSC28 (HPV), E2 (Évora), E37 (CH Nordeste-Bragança), E42 (Lisboa), E54 (Norte), E109 (Lisboa)	E54
44	12	E3 (HSM), E17 (H Alto Ave), E34 (HSM Feira), e35 (CHLN-HSM), E38 (CHAA-H Guimarães), E43 (Lisboa), E44 (Norte), E103 (Norte), E122 (Norte), E125 (Alentejo), MX173795	E3
98	5	E1 (V N Gaia), E25 (HPV-CHLN), E26 (CH V N Gaia), E116, E120 (Lx)	E120
101	3	HSC37-HPV, HSC38-HCap, E102 (Lx)	E102
102	1	HVNG	HVNG
20	6	HSM1, E4 (Matosinhos), E56 (Lx), E64-65 (Norte), E99 (Norte)	E99
99	5	HUC, E7 (Faro), E21 (CH V N Gaia), E24 (CH V N Gaia), E47 (Norte)	E7
1343	1	HSM7	HSM7
42	4	HSC25 (HPV), E19 (H S. Marcos-Braga), E23 (ULS Matosinhos), E111 (Norte)	E111
728	1	HSC23 (HCVP)	HSC23
22	2	E11 (Coimbra), E31 (H S Marcos-Braga)	E31
16	3	HSM5, E20 (CH Póvoa Varzim), E110 (Lx)	E110
173	2	E15 (HSC-H Cascais), E36 (H S Marcos-Braga)	E36
1384	2	HSC10, ME136676	ME136676
1383	1	HSC12	HSC12
94	4	HSC36 (Desterro), E57, E63 (Norte), E128(Lx)	E128
172	1	HSC30	HSC30
146	2	E14 (HSM Feira), E22 (HSM Feira)	E22
174	1	E16 (H St.º Ant.º)	E16
1324	1	HSM6	HSM6
785	4	E27 (ULS Matosinhos), E28 (CH Póvoa Varzim), E29 (CH Póvoa Varzim), E115 (Norte)	E115

75	1	E30 (HEM)	E30
1009	1	E32 (ULS Matosinhos)	E32
1010	1	E33 (CH V N Gaia)	E33
37	4	E40 (HEM), E104 (Norte), E124, E130 (Norte)	E130
436	4	E41 (H. Barcelos), E45 (Norte), E98 (Norte), E121 (Norte)	E98
1905	39	E58-62, E66-96, E112-114	E95
1910	1	E55 (norte)	E55
2184	1	E100 (Lx)	E100
2152	1	E105 (Centro)	E105
48	1	E129 (Centro)	E129
744	1	E107 (Lx)	E107
96	1	E53 (Norte)	E53
435	2	E50 (Norte), E123 (Norte)	E123
65	1	E48 (Norte)	E48

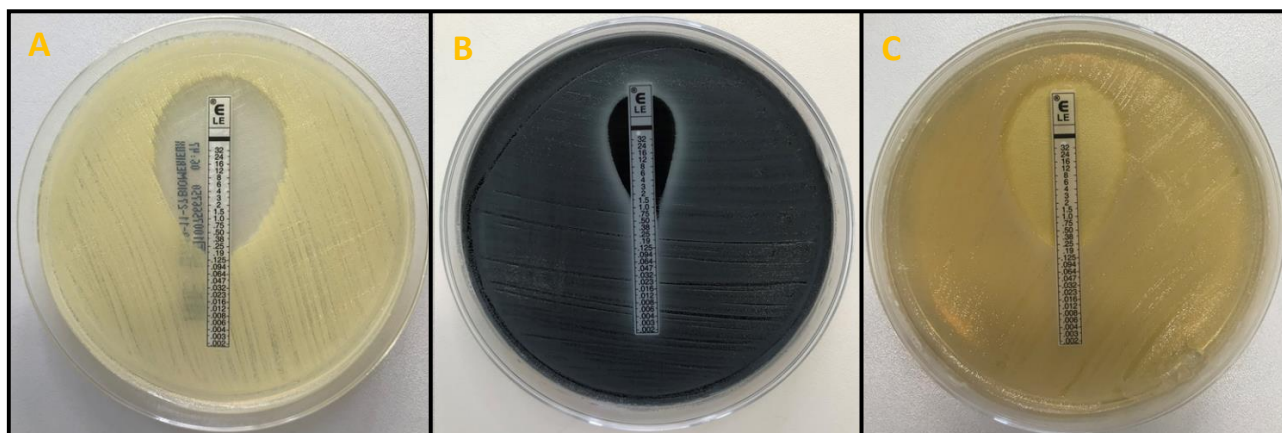
Anexo II – Testes de suscetibilidade antimicrobiana de *S. aureus* ATCC 29213 utilizando a metodologia do E-test conforme o protocolo EUCAST 2020 realizado em diferentes meios para avaliação da interferência dos seus compostos nas leituras da MIC, fotos recolhidas durante o presente trabalho.



E-test da azitromicina [0.016-256 µg/mL]: **A)** Meio MH, MIC = 1 µg/mL, **B)** Meio BCYE, MIC = 4 µg/mL e **C)** Meio BYE, MIC = 6 µg/mL.



E-test da ciprofloxacina [0.002-32 µg/mL] **A)** Meio MH, MIC = 0.25 µg/mL, **B)** Meio BCYE, MIC = 2 µg/mL e **C)** Meios BYE, MIC = 0.25 µg/mL.



E-test da levofloxacina [0.002-32 µg/mL]: **A)** Meio MH, MIC = 0.19 µg/mL, **B)** Meio BCYE, MIC = 1.5 µg/mL e **C)** Meios BYE, MIC = 0.25 µg/mL.

Anexo III – Meio BCYE- α

Meio BCYE agar base (SR0110, Oxoid)

constituintes	mg/L
Carvão ativado	2.0
Extrato de levedura	10.0
Agar	13.0

Suplemento do meio BCYE (SR0110A, Oxoid)

***LEGIONELLA* BCYE GROWTH SUPPLEMENT**

Componentes	100mL (um frasco suplemento)
Hidróxido de potássio	1.0g
Pirofosfato de ferro	0.025g
L-cisteína/ HCl	0.04g
α -Cetoglutarato	0.1g

Anexo IV – Escala de McFarland

REF 70 900

McFarland Standard

08053E - PT - 2003/01

IVD

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE

O McFarland Standard é composto por uma série de padrões, de diferente opacidade, que permitem calcular a densidade das suspensões microbianas. A sua utilização é indispensável para uma boa padronização dos métodos de microbiologia. Estes padrões designam-se pelo número dos tubos da escala inicialmente descrita por McFarland.

PRINCÍPIO

A densidade de uma suspensão microbiana determinada por comparação com uma suspensão de opacidade conhecida contida na ampola com o mesmo diâmetro.

APRESENTAÇÃO

- 6 padrões de McFarland (0.5, 1, 2, 3, 4, 5) com o diâmetro de 17,75 mm (ampola padrão bioMérieux)
- 1 folheto informativo

COMPOSIÇÃO DOS PADRÕES

	BaSO ₄		BaSO ₄
Padrão 0.5	2.40 10 ⁻⁵ mol/l	Padrão 3	1.44 10 ⁻⁴ mol/l
Padrão 1	4.80 10 ⁻⁵ mol/l	Padrão 4	1.92 10 ⁻⁴ mol/l
Padrão 2	9.60 10 ⁻⁵ mol/l	Padrão 5	2.40 10 ⁻⁴ mol/l

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Para diagnóstico *in vitro* e controlo microbiológico.
- Unicamente para uso profissional.
- Não utilizar os padrões após a data de validade.
- Antes da utilização, verificar se as ampolas não estão danificadas.
- As amostras, culturas bacterianas e produtos semeados devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados de maneira apropriada. As técnicas assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação; consultar o "NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - December 1997". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", ou a regulamentação em vigor no país de utilização.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- As ampolas conservam-se no escuro a 2° - 30° C até a data de validade indicada na embalagem.
- Não abrir as ampolas McFarland Standard: as suspensões padrão são utilizadas com as ampolas inicialmente fechadas.

PROCEDIMENTO

- Usar o padrão escolhido como referência
- Preparar uma suspensão bacteriana numa ampola com o mesmo diâmetro; homogeneizar correctamente.
- Agitar vigorosamente a ampola padrão.
- Comparar de imediato as duas opacidades colocando as duas ampolas diante de um fundo negro.
- Se for necessário ajustar a suspensão bacteriana, agitar novamente o padrão antes de proceder a uma nova comparação.

INTERPRETAÇÃO

Equivalências

Padrão	Concentração bacteriana (1) x 10 ⁶ /ml	Densidade óptica teórica (2) a 550 nm
0.5	150	0.125
1	300	0.25
2	600	0.50
3	900	0.75
4	1200	1.00
5	1500	1.25

1. A concentração bacteriana varia consoante o tamanho dos microrganismos. Os números indicados representam uma média válida para as bactérias. Para as leveduras, de maior tamanho, é necessário dividir estes números por aproximadamente 30.
2. Os valores correspondem às densidades ópticas de suspensões bacterianas. As soluções de BaSO₄ não possuem a mesma densidade óptica, visto que o tamanho e a forma das partículas diferem das bactérias e a luz é difractada de outra forma.

LIMITES DO TESTE

- Não utilizar estas ampolas para a verificação dos DENSIMAT.

ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

É da responsabilidade de cada laboratório gerir os resíduos e os efluentes que este produz consoante a sua natureza e o seu perigo, e assegurar (ou fazer assegurar) o tratamento e a eliminação em conformidade com as regulamentações aplicáveis.

BIBLIOGRAFIA p. I

QUADRO DOS SÍMBOLOS p. II

Brasil: Distribuído por biolab-Mérieux, S.A. - Estrada do Mapuá, 491 - Jacarepaguá - R.J. - CEP 22710-261

CNPJ: 33.040.635/0001-71

Atendimento ao Consumidor Tel.: 0800-264848

Prazo de Validade, N° de Lote, N° de Registro de Ministério da Saúde e Responsável Técnico:

VIDE EMBALAGEM



BIO M É R I E U X

bioMérieux® sa
 au capital de 11 879 045 €
 673 620 399 RCS LYON
 69280 Marcy-l'Etoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
 http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Impresso em França

O logotipo é uma marca registada e protegida, propriedade exclusiva da bioMérieux sa ou de uma das suas filiais.

Anexo V – Aprovação pelo Comité de Ética.

**Decisão final sobre o projeto "Legionella pneumophila: estudo de suscetibilidade das estirpes portuguesas"**

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, por unanimidade, aprovar o projeto de investigação intitulado "*Legionella pneumophila: estudo de suscetibilidade das estirpes portuguesas*" (nº108/2019/CEFCM), da Mestranda Ibéria Ramalho Dias de Araújo Maroja, submetido pela Profa. Doutora Maria de Jesus Chasqueira.

Lisboa, 8 de novembro de 2019

O Presidente da Comissão de Ética,

(Prof. Doutor Diogo Pais)

TO WHOM IT MAY CONCERN

The Ethics Research Committee NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously approved the Project entitled "*Legionella pneumophila: estudo de suscetibilidade das estirpes portuguesas*" (nr.108/2019/CEFCM), by Master's student Ibéria Ramalho Dias de Araújo Maroja, submitted by Maria de Jesus Chasqueira, MD, PhD.

Lisbon, November 8th, 2019

The Chairman of the Ethics Research Committee,

(Diogo Pais, MD, PhD)