

# Legiolert – Número Mais Provável

## Pesquisa e Quantificação de *Legionella pneumophila*

Nuno Rafael Borges Ferreira

Microbiologia de Águas

Laboratório Regional de Saúde Pública em Braga

nuno.ferreiro@arsnorte.min-saude.pt

## Introdução

Em 1976, durante uma convenção da *American Legion*, num hotel em Filadélfia, a infeção por uma bactéria provocou 34 mortes e pneumonias graves em 221 participantes. Assim, esta bactéria foi denominada *Legionella pneumophila* e a doença ficou conhecida por "Doença dos Legionários". A bactéria *Legionella* é um microrganismo omnipresente no meio aquático e, de acordo com a Direção-Geral da Saúde (DGS), pode existir em reservatórios naturais, rios e lagos e, também, em reservatórios artificiais como sistemas de água doméstica (quente e fria), humidificadores, torres de arrefecimento de sistemas de condicionamento de ar, jacuzzis, piscinas, instalações termais, águas sujas paradas e fontes decorativas (repuxos, por exemplo) - locais onde se produzem aerossóis com facilidade. Quando a temperatura (entre 20 e 45°C) e a presença de depósitos (ferrugem, lodo, matéria orgânica) nos ambientes atrás referidos podem suportar o crescimento bacteriano vão favorecer a multiplicação rápida da bactéria *Legionella*.

A *Legionella* pode causar doença quando uma pessoa inala ou aspira gotículas de água suspensas no ar que contenham *Legionella* em quantidade suficiente e com características de virulência (existem várias espécies de *Legionella*). A maioria dos casos de doença é provocado pela *Legionella pneumophila*, enquanto os restantes são causados por outras espécies de *Legionella*.

É de salientar que a infeção por *Legionella* não é transmitida de pessoa para pessoa nem através da ingestão de água contaminada.

## Objetivo

O principal objetivo da implementação desta metodologia a Pesquisa e Quantificação de *Legionella pneumophila* pelo método do Número Mais Provável em águas limpas com 7 dias de incubação.

## Metodologia

Este teste é baseado numa tecnologia de deteção enzimática bacteriana que sinaliza a presença de *Legionella pneumophila* através da utilização de um substrato presente no reagente Legiolert (ampolas). As células da *Legionella pneumophila* crescem rapidamente e reproduzem-se usando o rico suplemento de aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes presentes nas ampolas Legiolert. As estirpes de *Legionella pneumophila* que utilizam esse substrato adicionado produzem um indicador de cor castanho, revelando a sua presença. O teste Legiolert é capaz de detetar *Legionella pneumophila* na ordem de 1 organismo em 100 mL em 7 dias. Para avaliação da precisão e estimativas de incertezas, foram executados duplicados e paralelos, respetivamente, utilizando amostras naturais e amostras naturais artificialmente contaminadas. Para avaliação da exatidão, o laboratório participou em programas de avaliação externa da qualidade (LGC Standards).

## Resultados

No estudo de brancos de processo foi utilizada água estéril e os resultados foram conformes, não ocorrendo contaminações, o mesmo se verificou para os controlos positivos e negativos de processo que apresentaram resultados conformes. No caso dos controlos positivos de processo em cada sessão de trabalho, foram utilizadas estirpes de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 para contaminar amostras de água estéril e os resultados foram todos concordantes com o esperado, uma vez que ocorreu o aparecimento de turvação e pigmentação castanha nos poços grandes e pequenos (situação típica de uma amostra contendo *Legionella pneumophila* pela metodologia em questão). Relativamente aos controlos negativos de processo em paralelo com as sessões de trabalho, as amostras de água estéril foram contaminadas com estirpes de *Enterococcus faecalis* WDCM 00009 e os resultados obtidos, foram concordantes com o esperado, uma vez que não ocorreu o aparecimento de turvação nem de pigmentação castanha nos poços grandes e pequenos.

Foram realizados Testes de Seletividade (com estirpes de *Legionella anisa* WDCM 00106, *Legionella bozemanni* NCTC 11368 e *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025) para o método de análise Legiolert (Número Mais Provável) – Pesquisa e Quantificação de *Legionella pneumophila* e os resultados foram conforme o esperado, isto é, não foi detetada a presença de *Legionella pneumophila* (falsos positivos). Os resultados das participações em Avaliação Externa da Qualidade foram satisfatórios. Assim o ensaio está conforme o disposto na IT.BA.12- Metodologia de implementação de métodos bacteriológicos.



Figura 1 . Quanti-Tray (Lado Esq.) – Amostra Positiva (Contém *Legionella pneumophila*); Quanti-tray (Lado Dir.) – Amostra Negativa (Não contém *Legionella pneumophila*).

## Considerações Finais

Conclui-se que o método de análise –PO.BA.29 - Pesquisa e Quantificação de *Legionella pneumophila* – Número Mais Provável (Legiolert) – Águas limpas, se encontra implementado e validado para Águas limpas (Águas de consumo, Águas minerais naturais, de nascente e termais e Águas de Processo) consideradas Águas potáveis. Os testes de brancos de processo, controlos positivos e negativos de processo, executados paralelamente às sessões de trabalho pelos analistas qualificados, obtiveram resultados satisfatórios e de acordo com o esperado. Foi construída uma carta de produtividade (Gráfico abaixo) com 20 resultados, das ampolas de Legiolert em comparação com o meio de cultura BCYE e os resultados foram conformes, concluindo que está adequado ao uso em cumprimento com a legislação em vigor. Esta metodologia foi também validada pela AFNOR a 18-06-2019.

## Referências Bibliográficas

- Bula do Legiolert test Kit;
- Characterization of the Legiolert\* Test for the Enumeration of *Legionella pneumophila* from Potable Water Samples (ISO 13843:2017);
- Legionella validation report (ISO 13843);
- ISO 8199:2018 – Water Quality – General Guidance on the enumeration of microorganisms by culture;