



# LEGIONNAIRES' DISEASE

Maria Margarida Rodrigues Teixeira Rosa Pais

## *Legionella pneumophila* e Doença dos Legionários

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# *Legionella pneumophila e Doença dos Legionários*

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pela Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade  
de Coimbra

Maria Margarida Rodrigues Teixeira Rosa Pais

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Maria Margarida Rodrigues Teixeira Rosa Pais, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010134168, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

---

(Maria Margarida Rodrigues Teixeira Rosa Pais)

**A Tutora da Monografia,**

---

(Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues)

**A Orientanda,**

---

(Maria Margarida Rodrigues Teixeira Rosa Pais)

Os meus agradecimentos.

À Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues, pela constante disponibilidade e ajuda prestadas aquando do estudo efetuado, que facilitaram grandemente o meu trabalho.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por me ter permitido um ótimo percurso académico, dispondo sempre do melhor conhecimento e dos melhores docentes e funcionários.

Aos meus pais, por me terem dado a oportunidade de prosseguir uma carreira e estarem incondicionalmente do meu lado.

À minha irmã, por ser o meu exemplo e acompanhar afincadamente os meus passos.

Aos meus amigos, que me acompanharam e foram capazes de me dar força de vontade quando mais precisei.

Um grande obrigada.

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	2
<b>Resumo</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introdução</b> .....	4
<b>2. Patogénese</b> .....	6
<b>2.1. Associação de <i>L. pneumophila</i> com amebas</b> .....	6
<b>2.2. Associação de <i>L. pneumophila</i> com biofilmes</b> .....	7
<b>I. Adesão de <i>L. pneumophila</i> a um substrato</b> .....	8
<b>II. Maturação do biofilme</b> .....	9
<b>III. Separação de <i>L. pneumophila</i> do biofilme e dispersão subsequente no ambiente</b> .....	9
<b>2.3. Ciclo intracelular</b> .....	10
<b>3. Doença dos Legionários</b> .....	13
<b>3.1. Epidemiologia</b> .....	13
<b>3.2. Transmissão</b> .....	16
<b>3.3. Sinais e Sintomas</b> .....	17
<b>3.4. Diagnóstico</b> .....	17
<b>I. Cultura microbiológica</b> .....	17
<b>II. Teste do Antígeno Urinário</b> .....	18
<b>III. Ensaios serológicos e baseados em anticorpos</b> .....	18
<b>IV. Diagnóstico molecular com base em ácidos nucleicos</b> .....	18
<b>3.5. Tratamento</b> .....	19
<b>3.6. Prevenção</b> .....	20
<b>4. Conclusões e Expetativas Futuras</b> .....	22
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	23

## **Abreviaturas**

<b>BYE</b>	Meio tamponado de extrato de levedura ( <i>Buffered yeast extract</i> )
<b>EPS</b>	Substâncias poliméricas extracelulares ( <i>Extracellular polymeric substances</i> )
<b>LCV</b>	Vacúolo contendo <i>Legionella pneumophila</i> ( <i>Legionella Containing Vacuole</i> )
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>UAT</b>	Teste do Antígeno Urinário ( <i>Urinary Antigen Test</i> )

## Resumo

*Legionella pneumophila* é um bacilo Gram negativo e um parasita intracelular, que se multiplica no interior de amebas e pode associar-se a biofilmes. A infeção por *L. pneumophila* é originada quando este microrganismo se replica e sobrevive no interior de células fagocíticas humanas e pode traduzir-se, clinicamente, de três formas diferentes: Doença dos Legionários ou legionelose; Febre de Pontiac; ou sendo completamente assintomática. A Doença dos Legionários, que envolve uma forma severa de pneumonia, transmitida por *L. pneumophila* através de aerossóis originados, principalmente, por ambientes aquáticos antropogénicos, foi responsável, ao longo de décadas, por diversos surtos mundiais. Os meios de diagnóstico da legionelose são diversos, podendo ser utilizada a cultura de *L. pneumophila*, o teste do antígeno urinário, métodos serológicos ou moleculares. O tratamento da legionelose é, ainda nos dias de hoje, baseado essencialmente na experiência clínica, utilizando, em monoterapia ou em combinação, fluoroquinolonas e macrólidos.

**Palavras-chave:** *Legionella pneumophila* / infeção / Doença dos Legionários / legionelose / patogénese / surtos / diagnóstico / tratamento

## Abstract

*Legionella pneumophila* is a Gram-negative bacillus and an intracellular parasite that multiplies inside amoebas and associates to biofilm ecosystems. *L. pneumophila* infection starts when this bacteria reproduce and survive inside phagocytic human cells and it can, clinically, be translated into three different ways: Legionnaire's Disease or legionellosis; Pontiac fever; or be completely asymptomatic. Legionnaire's disease, which involves a severe form of pneumonia and is transmitted through aerosols mainly generated by human-made freshwater environments, has been responsible, for decades, for numerous worldwide outbreaks. There are numerous diagnosis techniques for Legionnaire's Disease, such as the culture of *L. pneumophila*, the urinary antigen test and serologic and molecular methods. Legionellosis treatment is still based on clinical experience, using, through monotherapy or in combination, fluoroquinolones and macrolides.

**Keywords:** *Legionella pneumophila* / infection / Legionnaire's disease / legionellosis / pathogenesis / outbreaks / diagnosis / treatment



## I. Introdução

*Legionella pneumophila* é uma bactéria pertencente ao género *Legionella*, que se insere no Filo *Proteobacteria*. [1] Esta espécie é constituída por bacilos Gram negativo, sendo frequentemente encontrada como parasita de protozoários em ambientes de água doce, tanto naturais (superfície de lagos, rios...) como artificiais (torres de refrigeração, ar condicionado...), não sobrevivendo em ambientes secos. A relação de simbiose que se estabelece entre a bactéria e os protozoários confere não apenas um local de proteção e multiplicação da mesma, como também um aumento da sua resistência a biocidas, antibióticos, ácido e stress osmótico ou térmico, por exemplo. A sua reprodução efetua-se intracelularmente, no interior de protozoários, entre os 25°C e os 42°C, sendo que a temperatura ótima se estabelece, aproximadamente, a 35°C. *L. pneumophila* encontra-se, frequentemente, em biofilmes, complexos conjuntos naturais de microorganismos que envolvem diversas interações tróficas. [1]

*L. pneumophila* é a bactéria do género *Legionella* que se encontra mais frequentemente associada a doença humana. Este microrganismo distribui-se por 70 serogrupos, sendo que o serogrupo I é o mais comum no que diz respeito ao desenvolvimento de patologia [2], sendo o responsável por, aproximadamente, 84% dos casos de legionelose. [3] Esta bactéria traduz-se, clinicamente, de formas distintas: Doença dos Legionários ou legionelose, doença multissistémica grave que envolve pneumonia severa (que pode ser fatal, caso não seja diagnosticada atempadamente), febre, tosse seca, cefaleias, mialgias, calafrios, dispneia, diarreia e delírio; e Febre de Pontiac, doença auto-limitada que se assemelha a uma constipação. [1]

Os ambientes antropogénicos, em que a temperatura se encontra mais elevada que a temperatura ambiente, são mais frequentemente os causadores de doença humana, dado que as alterações a nível térmico produzidas no ambiente aquático alteram o equilíbrio estabelecido entre a bactéria e os protozoários que parasita, resultando na multiplicação extensa da bactéria. [1]

A confirmação de possível Doença dos Legionários só pode ser efetuada com recurso a testes microbiológicos, dada a dificuldade na distinção entre esta patologia e pneumonias comuns. [4]

Existem “pré-requisitos” associados ao desenvolvimento de doença relacionado com *L. pneumophila*: a bactéria deve estar presente em ambiente aquático em dose infecciosa (que não se encontra, ainda, claramente definida) e transmissão da bactéria ao hospedeiro suscetível por via inalatória através de gotículas de água aerossolizadas contaminadas. Desta forma, a bactéria não se transmite pessoa-a-pessoa nem através da ingestão de água contaminada.[1]

A Doença dos Legionários, ou legionelose, é uma patologia que pode considerar-se evitável uma vez que foram já desenvolvidas orientações e estratégias de controlo a nível internacional para o controlo/eliminação da bactéria dos respetivos reservatórios.[1]

## 2. Patogénese

### 2.1. Associação de *L. pneumophila* com amebas

As bactérias do género *Legionella* não sobrevivem de forma independente em ambientes aquáticos. De facto, são bactérias fastidiosas, o que significa que necessitam de um conjunto de nutrientes exigente e específico para que consigam vingar no meio ambiente. Estes nutrientes não são usualmente encontrados em ambientes de água doce, mas sim em ambientes intracelulares e, mesmo que existissem, permitiriam o crescimento de outras espécies que, competindo com *L. pneumophila*, sobreviveriam em detrimento da mesma.[1]

De facto, as bactérias do género *Legionella* e, nomeadamente, *L. pneumophila*, têm uma fisiologia única que está adaptada à sobrevivência e replicação em numerosos géneros de protozoários, como *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* e *Tetrahymena*, formando relações comensais com amebas e protozoários flagelados em ambientes terrestres ou de água doce, pelo que são consideradas parasitas intracelulares. Bactérias deste género demonstraram capacidade para se replicarem em 14 espécies de amebas, 2 espécies de protozoários ciliados e uma espécie de bolor limoso, [1] pelo que pode considerar-se que as amebas constituem o seu hospedeiro primário prioritário. Os protozoários são considerados os hospedeiros primários desta bactéria, enquanto a infeção de células fagocíticas humanas é considerada oportunista.[1] A capacidade que a bactéria apresenta de infetar/ parasitar macrófagos humanos e causar doença resulta da co-evolução com diversos protozoários e consequente adaptação ao crescimento intracelular em hospedeiros eucariotas.[5]

O equilíbrio entre a bactéria e as amebas é crucial para a ecologia e patogenicidade de *L. pneumophila*. Esta espécie replica-se no intervalo de temperaturas entre 25 e 42°C, tendo como temperatura ótima de crescimento 35°C. Quando é aumentada a temperatura do ambiente aquático em que *L. pneumophila* se insere, o equilíbrio entre os dois microrganismos pode alterar-se e refletir-se na rápida multiplicação da bactéria no interior das amebas, com consequências como o aumento da hipótese de transmissão e manifestação de doença em humanos. Desta forma, a associação da bactéria a amebas na forma vegetativa ou quística pode induzir fenótipos bacterianos virulentos.[5] A bactéria não se replica em amebas na forma de quisto, mas quando as condições se tornam desfavoráveis, ou seja, em ambientes de *stress* ambiental (como, por exemplo, quando ocorre diminuição de

temperatura), as amebas diferenciam-se de trofozoíto para quisto, contribuindo para a proteção e sobrevivência da bactéria.[5]

As amebas não só fornecem um ambiente seguro para a replicação de *L. pneumophila*, como têm também um papel importantíssimo na proteção da bactéria em ambientes severos, potenciando a sua resistência a biocidas, ambientes acídicos e stress térmico e osmótico, por exemplo. De facto, células de *L. pneumophila* libertadas de amebas existentes no ambiente demonstram maior resistência em relação às que são cultivadas *in vitro*, exibindo alterações bioquímicas, fisiológicas e de virulência como as que se exemplificam seguidamente: resistência aumentada a químicos e antibióticos, perfil alterado de ácidos gordos e proteínas, menor tamanho, capacidade infecciosa de amebas aumentada e maior resistência ambiental, entre outras. As bactérias contidas em vesículas libertadas pelas amebas demonstram elevada resistência a biocidas, enquanto a vesícula, por si só, é resistente ao congelamento e aos ultra-sons.[5]

Diversos métodos direccionados para a erradicação de *L. pneumophila*, como a aplicação de biocidas químicos, aumento da temperatura ou a irradiação UV, foram testados sem sucesso. A solução passará, provavelmente, pela realização de tratamentos contínuos e eficazes tendo como alvo tanto a bactéria, como os protozoários que são seus hospedeiros.[5]

Em ambientes aquáticos antropogénicos, *L. pneumophila* é encontrada quase exclusivamente em biofilmes complexos. No entanto, estudos com modelos de biofilmes demonstraram que a replicação da bactéria nesse *habitat* depende da presença de um hospedeiro protozoário.[1] De facto, na ausência de amebas, o número de bactérias *L. pneumophila* associadas a biofilmes não aumenta e, nalguns casos, a bactéria entra na fase viável mas não cultivável de forma a salvaguardar a sua sobrevivência. Foi sugerido por Declerck [6] que a bactéria sobrevive no interior de amebas apenas por um curto espaço de tempo durante o qual investe na sua replicação.

## **2.2. Associação de *L. pneumophila* com biofilmes**

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas caracterizadas por células que se encontram ligadas entre si e a um(a) substrato/interfase através de uma matriz extracelular de substâncias poliméricas. Nestes ecossistemas, as micro-colónias de células bacterianas envoltas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) encontram-

se separadas através de canais de água intersticiais que procedem ao transporte de nutrientes, oxigénio, genes e até agentes antimicrobianos.[6]

*L. pneumophila* sobrevive no interior de biofilmes complexos em sistemas de água antropogénicos, ou seja, criados através da mão humana. Esta espécie é detetada mais frequentemente em amostras de biofilmes do que em amostras de água corrente, o que sugere que a bactéria se localiza, maioritariamente, no interior destes ecossistemas complexos.[1]

Existem três fases diferentes na interação entre *L. pneumophila* e o biofilme:

#### I. Adesão de *L. pneumophila* a um substrato

Uma monocultura de *L. pneumophila* forma biofilmes apenas sob condições experimentais bem definidas com a utilização do meio de cultura tamponado, específico e altamente nutritivo de extrato de levedura (BYE). Em condições ambientais, a bactéria incorpora-se em biofilmes multiespécies pré-formados como colonizador secundário, o que significa que forma uma associação transitória com outros microrganismos que se encontravam previamente associados a uma superfície e teriam iniciado a formação de um biofilme. No entanto, *L. pneumophila* não se associa a qualquer microrganismo que tenha a capacidade de formar biofilmes: a bactéria adere a biofilmes monoespécies formados por *Empedobacter breve*, *Microbacterium* sp. e *Acinetobacter baumannii* no meio BYE; por outro lado, *L. pneumophila* não aderiu a biofilmes formados por *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium glutamicum* e *Klebsiella pneumoniae*, que se supõe que inibam a adesão da bactéria.[6]

Os mecanismos de interação entre a bactéria e o biofilme a que adere ainda não se encontram perfeitamente clarificados, podendo envolver interações físicas ou sinalização celular, como *quorum sensing*, que é a capacidade da bactéria de monitorizar e responder à densidade celular.[7]

Spirig e a sua equipa de investigação foram capazes de chegar à conclusão de que *L. pneumophila* dispõe de um sistema de sinalização denominado autoindutor-I de *Legionella* que, uma vez associado ao auto-indutor-I da espécie *Vibrio cholerae* forma uma família de moléculas indutoras denominadas  $\alpha$ -hidroxicetonas. Na ausência de um hospedeiro protozoário, a bactéria consegue utilizar os *pili* ou outras adesinas para colonizar biofilmes.[6]

O sucesso da adesão da bactéria a uma superfície depende de diversas variáveis, tanto ambientais, de que são exemplo o fluxo aquático e a hidrodinâmica, como

propriedades da superfície celular. De facto, a formação de componentes estruturais como os *pili*, as fímbrias, os flagelos e os polissacarídeos de superfície facilitam a interação da bactéria com as superfícies, assim como o sistema de secreção tipo II, que transloca fatores de virulência importantes para a posterior maturação do biofilme.[6]

## **II. Maturação do biofilme**

Uma vez concluída a adesão da bactéria ao biofilme, *L. pneumophila* diferencia-se em células associadas a estes ecossistemas complexos através da regulação de um determinado número de genes. Seguidamente, os colonizadores secundários, como é o caso de *L. pneumophila*, crescem e formam as suas próprias microcolónias, que constituem a unidade estrutural dos biofilmes. Após o crescimento e aumento de volume, as microcolónias ficam envolvidas e ligadas à matriz EPS, o que reforça a estrutura do biofilme.

*L. pneumophila* utiliza como fonte de nutrientes a quantidade excessiva dos mesmos que é produzida por outros microrganismos integrados no biofilme e matéria orgânica degradada, resultante de bactérias Gram negativas mortas. Pode, ainda recorrer às proteínas do hospedeiro protozoário que são degradadas e utilizadas como fonte de nutrientes.[6]

## **III. Separação de *L. pneumophila* do biofilme e dispersão subsequente no ambiente**

A separação da bactéria do biofilme, seguida de dispersão no ambiente em que se insere é parte da estrutura dinâmica das comunidades microbianas que são os biofilmes. Este fenómeno pode ocorrer através da libertação de células-filha ou devido à separação de agregados de biofilmes devido ao fluxo agitado do ambiente aquático.[6] A separação da bactéria pode ocorrer por erosão, ou seja, o contínuo destacamento de células unitárias e pequenas porções; ou quando ocorrem eventos inesperados, caracterizado pela perda enorme e rápida de grandes porções de biofilme.[6] Uma vez que *L. pneumophila* é um parasita intracelular, pode destacar-se do biofilme através do afastamento do protozoário em que se encontra no biofilme; ou através da libertação de vesículas contendo *L. pneumophila* que podem ser transportadas a grandes distâncias e inspiradas pelo homem quando incorporadas em aerossóis. A separação da bactéria do biofilme pode resultar em diversos problemas, incluindo o aumento da quantidade de células bacterianas para uma dose infecciosa para o ser humano.

Os nutrientes complexos encontrados nos biofilmes levam alguns investigadores a acreditar que os biofilmes conseguem suportar a sobrevivência e multiplicação de *L. pneumophila* no exterior de uma célula hospedeira.

Um estudo avaliou o crescimento extracelular de *L. pneumophila* na comunidade do biofilme na presença e na ausência de amebas, tendo como base um reator de biofilme e um biofilme desenvolvido em água potável não-suplementada, constituído pelos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Flavobacterium-like*, isolados de amostras de água contendo *L. pneumophila*. Foi, ainda, adicionada a ameba *Hartmannella vermiformis*. [1] Assim, o biofilme reproduzido foi constituído por 5 microrganismos pré-selecionados, pelo que não representa a totalidade dos biofilmes ambientais em que a bactéria se move. *L. pneumophila* associou-se e persistiu nos biofilmes formados tanto na presença como na ausência da ameba. No entanto, foram observadas algumas diferenças: na ausência da ameba, a bactéria não desenvolve microcolónias e, segundo estudos de medição realizados, a multiplicação da bactéria não ocorreu; na presença da ameba, a bactéria reproduziu-se. O estudo sugere e conclui, desta forma, que *L. pneumophila* consegue sobreviver no interior de biofilmes sem a presença de um hospedeiro protozoário, nomeadamente, uma ameba; porém, é necessária a presença da ameba para que a bactéria se multiplique.

No entanto, ainda não existe informação suficiente para que a teoria possa ser confirmada com toda a certeza. Futuramente, caso seja confirmada a multiplicação extracelular da bactéria em biofilmes, a caracterização do fenómeno resultará em grande impacto no que diz respeito a estratégias de controlo e prevenção de doença.

### **2.3. Ciclo intracelular**

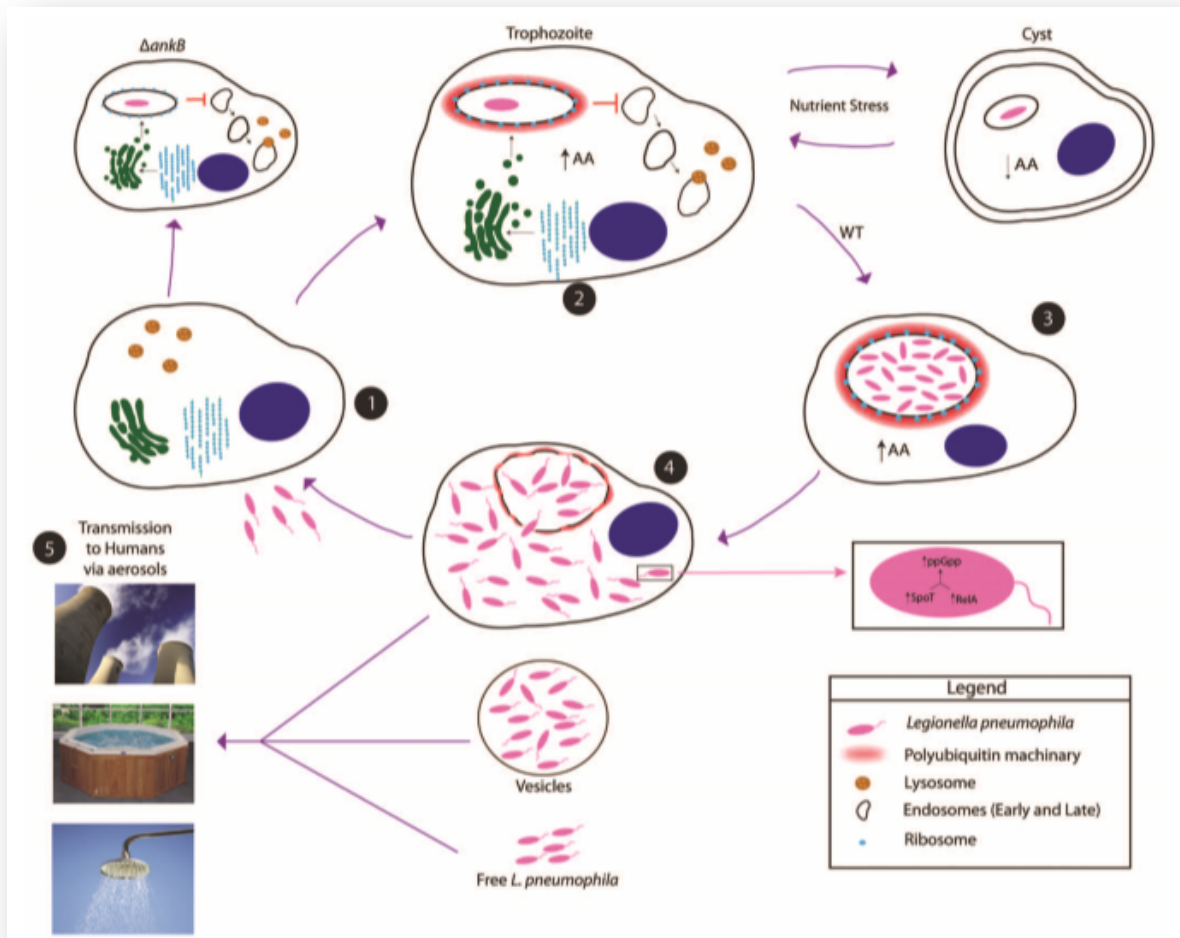
*L. pneumophila* encontra-se, em ambiente aquático, no interior de protozoários ou biofilmes, como foi referido anteriormente. A infeção de células humanas, especificamente, macrófagos alveolares, que protagoniza é acidental e considerada um desvio do ciclo intracelular habitual da bactéria. *L. pneumophila* é capaz de reproduzir-se intracelularmente, tanto em protozoários, como em células humanas de forma semelhante.

Após a interação inicial entre a bactéria e o protozoário, neste caso, a ameba, as células de *L. pneumophila* são internalizadas através de fagocitose ou outras formas (1), como o transporte mediado pelos recetores específicos lectina galactose/N-acetilgalactosamina. [1,

5] As formas de internalização da bactéria constituem uma das semelhanças do ciclo intracelular nos protozoários e nos macrófagos alveolares.[3]

Uma vez internalizada, a bactéria evade a via habitual endossoma - lisossoma e o vacúolo que contém *L. pneumophila* (LCV) recruta organelos celulares do hospedeiro, como ribossomas e até mesmo mitocôndrias. Seguidamente, o LCV interrompe o trânsito Retículo Endoplasmático – Aparelho de Golgi, sendo rapidamente revestido por proteínas poliubiquitinadas que são alvo de degradação proteossomal (2), processo que leva ao aumento de aminoácidos, que potenciam a proliferação bacteriana rápida (3). Em condições de *stress*, como privação de nutrientes, a ameba transita de trofozoíto para quisto, e a proliferação bacteriana não ocorre. Os processos até agora descritos constituem a fase replicativa da bactéria, em que ocorre crescimento exponencial. Nas últimas fases deste processo, o LCV rompe e a bactéria escapa para o citosol, concluindo nesse local os últimos ciclos de replicação. Aqui, havendo depleção dos nutrientes de que a bactéria precisa, são ativados os genes *relA* e *spoT* que aumentam os níveis de alarmona 3',5'-bipirofosfato e, conseqüentemente, potenciam a transição de *L. pneumophila* a um fenótipo flagelado, móvel e virulento. Decorre, no passo seguinte, a lise da ameba, fenómeno que promove a libertação de *L. pneumophila* livre e de vesículas contendo a bactéria (4) e, conseqüentemente, a transmissão do microrganismo para os macrófagos humanos através de aerossóis (5) **(Figura I)**.





**Figura I** - Ciclo de vida intracelular de *Legionella pneumophila*. [5]

### 3. Doença dos Legionários

#### 3.1. Epidemiologia

Em termos globais, a distribuição por género e sexo da Doença dos Legionários é semelhante em todos os países. A legionelose é raramente observada em crianças e mais frequentemente reportada em pessoas idosas, sendo que o género mais prevalente é o masculino. A distribuição da Doença dos Legionários na Europa é de 9,2 pessoas num milhão.[8]

A Doença dos Legionários apresenta um padrão sazonal, verificando-se com maior frequência no verão e no outono, estações do ano em que a humidade relativa do ar é mais elevada, originando condições propícias de sobrevivência de *L. pneumophila* em aerossóis. O controlo de surtos de Doença dos Legionários depende da rápida obtenção de dados descritivos epidemiológicos em confronto com informação microbiológica, por forma a identificar a fonte e implementar medidas de controlo céleres.[8]

Os passos básicos de investigação epidemiológica associada a surtos são os seguintes:

- Avaliação ambiental e colheita de amostras;
- Cultura e teste de espécies clínicas e ambientais recolhidas nas amostras;
- Caracterização e relação entre as amostras ambientais e humanas recolhidas de *L. pneumophila*. [9]

Os surtos mais importantes a nível mundial de Doença dos Legionários, no período compreendido entre 1976 e 2012, encontram-se sumarizados na **Tabela I**, tendo em conta a variedade de fontes de *L. pneumophila* e o número de casos reportados.[8]

**Tabela 1 – Seleção de surtos mundiais de Doença dos Legionários de 1976 a 2012.[8]**

	<b>Número de Casos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>	<b>Fonte confirmada ou suspeita</b>	<b>Características-Chave</b>
<b>Filadélfia, EUA (1976)</b>	182	15,9	Fonte não confirmada; a visita à recepção do hotel é um fator de risco.	Um surto de, na altura, uma forma desconhecida de pneumonia numa convenção da Legião Americana. O surto resultou na identificação e caraterização de <i>Legionella</i> e da Doença dos Legionários.
<b>Los Angeles, EUA (1977-82)</b>	>200	-	Sistema de água potável	Surto contínuo num hospital de Los Angeles. Mais de 200 casos ocorreram num período de 5 anos, ocorrendo o pico em março de 1980, altura em que foram identificados 26 casos num mês. Em amostras de lavatórios e chuveiros dos quartos dos doentes foram encontrados isolados de <i>Legionella</i> dos mesmos serogrupos. O número de casos decresceu dramaticamente depois da hipercloração do sistema de água.
<b>Stafford, Reino Unido (1985)</b>	68	32,4	Ar condicionado	Grande surto nosocomial.
<b>Londres, Reino Unido</b>	70	4,3	Torres de refrigeração	Surto devido a infeção por espécies de <i>Legionella</i> em torres de refrigeração na <i>BBC Broadcasting House</i> , no centro de Londres.
<b>Cruzeiros (1994)</b>	50	-	Hidromassagem a bordo de navios	Diversos casos ocorreram em nove cruzeiros de abril a junho de 1994
<b>Bovenkaspel, Holanda (1999)</b>	188	11,0	Hidromassagem em exposição	Surto devido a hidromassagem exposta num espetáculo. Foram identificados períodos de incubação mais longos do que os normais; 16% dos casos tiveram períodos de incubação de mais de 10 dias.
<b>Melbourne, Austrália (2000)</b>	125	3,2	Torres de refrigeração	Surto em visitantes de um aquário. Foram identificados períodos de incubação longos, desde 1 até 16 dias.
<b>Murcia, Espanha (2001)</b>	449	1,1	Torres de refrigeração em hospital	Surto na comunidade com o maior número de casos confirmados pela microbiologia, até 800 casos possíveis.
<b>Barrow-in-Furness, Reino Unido (2002)</b>	179	3,9	Torres de refrigeração	Maior surto de <i>Legionella</i> no Reino Unido.
<b>Fredrikstad, Noruega (2005)</b>	56	17,8	Dispositivo de lavagem de ar	Provas de transmissão de <i>Legionella</i> a longa distância, com infeções identificadas a 10 km da fonte.
<b>Christchurch, Nova Zelândia (2005)</b>	19	15,8	Torres de refrigeração	Provas de transmissão de <i>Legionella</i> a longa distância, com infeções identificadas até 11,6 km da fonte suspeita.
<b>Rapid City, EUA (2005)</b>	18	5,6	Fonte decorativa	Uma pequena fonte decorativa foi identificada como fonte do surto.
<b>Pamplona, Espanha (2006)</b>	146	0,0	Torres de refrigeração	Surto com uma taxa de fatalidade incomumente baixa, devido a deteção precoce e ação médica e de saúde pública célere.
<b>Pas-de-Calais,</b>	86	21,0	Torres de refrigeração	O surto permitiu a obtenção de provas de transmissão a longa distância a partir da

<b>França (2006)</b>			industriais	fonte, torres de refrigeração industriais potentes, com elevada taxa de fatalidade.
<b>Miyazaki, Japão (2008)</b>	295	2,4	Casa de banho pública	Surto numa casa de banho pública com sistema de circulação (o total inclui os casos suspeitos).
<b>Las Vegas, EUA (2001-08)</b>	35	5,3	Sistema de água potável	Surto contínuo num hotel em Las Vegas; a transmissão foi associada com a duração do banho.
<b>Corfu, Grécia (2011)</b>	15	6,7	Diversas fontes	Aglomerado de casos e pequenos surtos aproximados em termos de espaço e tempo; inicialmente, pensava-se que a fonte do surto seria singular.
<b>Edimburgo, Reino Unido (2012)</b>	50	4,3	Fonte não confirmada, aglomerado de torres de refrigeração suspeitas	49 casos suspeitos adicionais foram detetados numa ampla distribuição geográfica. As investigações ambientais foram inconclusivas quanto à identificação da fonte.
<b>Stoke-on-trent, Reino Unido (2012)</b>	21	9,5	Hidromassagem em exposição	Surto recente devido a hidromassagem exposta numa loja.
<b>Quebec, Canadá (2012)</b>	181	7,7	Torres de refrigeração	Surto ligado a torres de refrigeração associadas a um restaurante de <i>fast-food</i> .

O primeiro surto de Doença dos Legionários ocorreu em 1976, durante a realização da 56ª Convenção da Legião Americana em Filadélfia, em que uma forma severa de pneumonia, até então desconhecida, causou 180 manifestações da doença que resultaram na morte de 29 pessoas.[5] O género *Legionella* foi pela primeira vez estabelecido três anos depois, em 1979.[1] A bactéria *L. pneumophila* e a Doença dos Legionários foram assim designadas em homenagem aos legionários que foram vítimas deste primeiro surto.[3]

O maior surto mundial, até à data, de Doença dos Legionários ocorreu na cidade de Múrcia, em Espanha, em 2001, tendo como fonte aerossóis formados em torres de refrigeração de um hospital local. Foram, então, confirmados 449 casos, com um total possível de 800 casos. É de salientar uma taxa de mortalidade mínima, de cerca de 1%, que pode ser justificada pela rápida deteção do surto, diagnóstico exato e célere da patologia e tratamento adequado dos doentes. O facto de os doentes envolvidos apresentarem poucos fatores de risco para o desenvolvimento da patologia pode, também, ter contribuído para a baixa taxa de mortalidade resultante.[10]

Um dos mais recentes casos de surtos de Doença dos Legionários na Europa ocorreu na cidade de Stoke-on-Trent, no Reino Unido, em julho de 2012. Foram confirmados 21 casos da patologia desde 2 de julho a 2 de agosto de 2012, dos quais 2 foram fatais. Foi identificada como fonte de transmissão uma banheira de hidromassagem que se encontrava em exposição numa loja. A partir do momento em que a fonte de transmissão

foi eliminada, a 24 de julho de 2012, não se verificou o aparecimento de mais casos de legionelose; no entanto, não se podem excluir outras fontes prováveis da doença.[11]

Torna-se de elevada importância destacar e caracterizar o surto de Doença dos Legionários ocorrido em Vila Franca de Xira, Portugal, uma vez que foi o maior no país e se encontra entre os maiores da Europa. O surto foi primeiramente identificado a 7 de novembro de 2014 e considerado oficialmente controlado a 21 de novembro do mesmo ano. Foram confirmados 334 casos, sendo que a média de idade das vítimas do surto se estabeleceu nos 58 anos, e 67% dos doentes (n=221) eram do género masculino. Destes 334 casos, 12 foram confirmados como fatais. Foi possível concluir que a fonte da transmissão de *L. pneumophila* era originada em sistemas de refrigeração industriais de uma fábrica na localidade de Vila Franca de Xira, uma vez que 90% dos doentes (n=226) viviam a 3 km da mesma. Os resultados dos testes microbiológicos concluíram existir relação entre as amostras da torre de refrigeração e as amostras clínicas, encontrando-se a legionelose ligada à transmissão do serogrupo I de *L. pneumophila*. O surto foi considerado controlado, apesar de a sua avaliação prosseguir com o objetivo de estudar medidas de intervenção e deteção precoces e céleres que possam ser utilizadas futuramente.[12]

### **3.2. Transmissão**

A transmissão de *L. pneumophila* acontece através da inalação de aerossóis ou, com menor frequência, através da aspiração de água contaminada com a bactéria.[1, 8, 9] Até hoje, ainda não foram relatados casos de transmissão de pessoa para pessoa.

A transmissão da bactéria tem origem, na maior parte das vezes, em ambientes aquáticos antropogénicos, como por exemplo torres de refrigeração, sistemas de água quente-frio, *spas*, equipamento hospitalar, ar condicionado e fontes, entre outros, uma vez que estes são capazes de, mais facilmente, originar aerossóis.[8, 9] Apesar de poder ocorrer, a transmissão de *L. pneumophila* com origem em ambientes aquáticos naturais é rara, cingindo-se aos casos em que os mesmos são adaptados para utilização humana, como os banhos públicos.

Existem diversos grupos de risco mais suscetíveis à transmissão de *L. pneumophila*, nomeadamente, os fumadores, os idosos, doentes com patologia cardiovascular ou respiratória crónica, diabetes, abuso de álcool, cancro e imunodepressão.

A taxa de mortalidade mundial associada à Doença dos Legionários é de 8-12%, sendo que no continente europeu é de cerca de 10%. Para determinados grupos de doentes, a taxa de mortalidade pode ser mais elevada, como acontece no caso dos fumadores, doentes com idade mais avançada, doentes com infeção nosocomial ou com atraso no diagnóstico ou tratamento da patologia.[8]

### **3.3. Sinais e Sintomas**

Os doentes contaminados com *L. pneumophila* podem desenvolver Doença dos Legionários ou legionelose, uma doença multissistémica grave que envolve pneumonia; Febre de Pontiac, uma doença auto-limitada que se assemelha a uma constipação; ou ser totalmente assintomáticos.[1, 9]

A Doença dos Legionários não apresenta sinais ou sintomas específicos; inclusivamente, algumas pessoas contaminadas com *L. pneumophila* podem mesmo não apresentar sintomas.[13] No entanto, alguns sinais podem ser associados a esta doença em detrimento de outras formas de pneumonia, como: febre elevada, tosse seca, cefaleias, mialgias, calafrios, dispneia, diarreia, falha renal e manifestações do sistema nervoso central, como confusão e delírio.[1, 13] Caso a doença não seja rapidamente identificada e tratada, pode causar falha de múltiplos órgãos e ser fatal.[13]

### **3.4. Diagnóstico**

#### **I. Cultura microbiológica**

A cultura microbiológica e o isolamento de *L. pneumophila* são vitais para a deteção da bactéria, o diagnóstico de Doença dos Legionários [9] e o estudo epidemiológico da doença [4], fornecendo importantes dados para o controlo e prevenção de futuros casos.[8] As amostras mais frequentemente utilizadas são as do trato respiratório baixo, como expetoração, fluido pleural e aspirados.[9] Apesar de a expetoração ser a amostra ideal, muitos dos doentes que padecem de legionelose não produzem expetoração.[14] De facto, são obtidas maiores taxas de sucesso no diagnóstico quando são utilizadas amostras broncoscópicas.[4, 14] É fundamental que esta técnica seja exercida por pessoal especializado, nomeadamente no que respeita ao processamento das amostras e ao seu cultivo no meio de cultura BYE, [8, 9, 14] uma vez que o isolamento de *L. pneumophila* não é um processo simples. O processo de cultura da bactéria não é célere uma vez que são

necessários 3 a 5 dias para que o isolamento da bactéria se complete, o que se torna uma desvantagem desta técnica.[8]

## **II. Teste do Antígeno Urinário**

O teste do antígeno urinário (UAT) é, atualmente, a forma de diagnóstico mais frequentemente utilizada uma vez que o antígeno é produzido na fase aguda da doença.[4] Este método de diagnóstico representa 70-80% dos casos identificados [8] e é processado através das técnicas de imunoensaio enzimático ou teste imunocromatográfico, [9] utilizando a urina como amostra.[14] A popularidade do UAT justifica-se pela sua celeridade e consequente tratamento rápido, baixo custo, simplicidade, facilidade de recolha de amostras e disponibilidade no mercado.[9] Os antígenos específicos de *L. pneumophila* podem começar a ser detetados imediatamente após o aparecimento de sintomas clínicos e persistir durante dias a semanas. A sensibilidade deste teste é de 80-90% no que diz respeito à Doença dos Legionários causada pelo serogrupo I de *L. pneumophila*, [9] nomeadamente nas regiões em que este se trata do serogrupo mais prevalente.[14] O UAT é considerado específico para o serogrupo I de *L. pneumophila*; no entanto, quando a carga de antígenos é elevada, o resultado pode ser positivo quando estão presentes outros serogrupos da bactéria.[9] Assim, apesar do UAT ser bastante fiável, os diagnósticos não podem ser baseados apenas nesta técnica, que pode levar a diagnósticos erróneos devido a outros serogrupos e espécies da bactéria que se encontrem presentes, pelo que se torna prudente a confirmação através de outros métodos, como a cultura de *L. pneumophila*. [4]

## **III. Ensaio serológicos e baseados em anticorpos**

*L. pneumophila* foi identificada como agente causativo da Doença dos Legionários, em 1976, através de diagnósticos serológicos das imunoglobulinas G e M.[9] De facto, durante várias décadas, técnicas como o teste de anticorpos através de imunofluorescência indireta e o teste de microaglutinação rápida eram largamente utilizadas, uma vez que se acreditava que eram métodos suficientemente sensíveis e específicos.[8] Nos dias de hoje, são muito pouco aplicadas devido ao aparecimento de técnicas padronizadas mais rápidas.

## **IV. Diagnóstico molecular com base em ácidos nucleicos**

As técnicas moleculares de deteção de ácido desoxirribonucleico (ADN) promovem um rápido diagnóstico da Doença dos Legionários, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) considerada a técnica de eleição para o diagnóstico de doentes que produzam

expetoração. Este método de diagnóstico apresenta elevada sensibilidade quando se utilizam amostras do trato respiratório inferior.[14] O PCR convencional e o PCR em tempo real são comumente utilizados na detecção e caracterização de *L. pneumophila*. Utilizando *software* adequado e *primers* e sondas próprias, o PCR torna-se uma técnica altamente específica. O sucesso deste método encontra-se diretamente relacionado com a severidade da patologia.[9]

### 3.5. Tratamento

O tratamento atempado da Doença dos Legionários é vital para o controlo das taxas de mortalidade. Não existem muitos estudos realizados em humanos relacionados com a melhor terapêutica para a Doença dos Legionários, pelo que a maior parte das recomendações terapêuticas resultam de experiência clínica e estudos em células *in vitro* e modelos animais.[15]

Historicamente, o fármaco que é frequentemente associado à terapêutica desta patologia é a eritromicina. No entanto, a azitromicina, também um macrólido, e as fluoroquinolonas, como a levofloxacina, são, nos dias de hoje, consideradas como tendo maior atividade contra *L. pneumophila*, uma vez que combinam a sua potência com a capacidade de penetrar e concentrar-se no interior das células fagocíticas;[15] além disso, apresentam menos efeitos adversos do que a eritromicina.[1]

A primeira aproximação terapêutica à Doença dos Legionários prevê a utilização de um agente antimicrobiano eficaz contra *Legionella spp.* A terapêutica oral com macrólidos como a eritromicina, a azitromicina e a claritromicina comprovou ser eficaz no tratamento de patologia moderada, assim como a utilização de fluoroquinolonas. A rifampicina é eficaz contra *L. pneumophila*; no entanto, a respetiva monoterapia apresenta o risco de originar resistência, pelo que é raramente utilizada.[15]

A terapêutica ideal para doentes hospitalizados com Doença dos Legionários encontra-se sumariada na **Tabela 2**. Os antibióticos disponíveis para administração parenteral são os preferidos no tratamento da Doença dos Legionários. A recomendação clínica para doentes imunodeprimidos ou que padecem de doença severa é a de administrar os antibióticos indicados em dose dupla em relação àquela que é considerada a dose *standard*. [15]



**Tabela 2 –** Terapia ideal para doentes hospitalizados devido a Doença dos Legionários.[15]

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>Dosagem</b>
<b>Macrólidos</b>	
Azitromicina	500 mg de 24 em 24 horas
Claritromicina	500 mg de 12 em 12 horas
<b>Tetraciclinas</b>	
Doxiciclina	100 mg de 12 em 12 horas ou de 24 em 24 horas
<b>Fluoroquinolonas</b>	
Levofloxacina	500 mg de 24 em 24 horas
Moxifloxacina	400 mg de 24 em 24 horas
Ciprofloxacina	400-750 mg de 12 em 12 horas

A terapêutica combinada de antibióticos tem sido utilizada no tratamento de doentes que não respondem à monoterapia *standard*, apesar de não existirem dados experimentais no que respeita à sua eficácia. Além disso, há a probabilidade da terapêutica combinada originar toxicidade e interações farmacológicas. Alguns estudos *in vitro* apoiam a utilização da combinação macrólidos/fluoroquinolonas, que combina o efeito anti-inflamatório dos macrólidos e a atividade bactericida das novas fluoroquinolonas; porém, este esquema terapêutico pode resultar em interações com fármacos metabolizados pelas enzimas do citocromo P (CYP).

A duração do tratamento depende de diversos fatores, sendo um deles a gravidade da patologia. Assim, em doentes com patologia suave deve proceder-se a terapêutica antibiótica durante 5 dias; em casos de legionelose moderada, em doentes imunocompetentes, a duração deve ser de 10 dias; por fim, deve ser aplicada terapêutica com agentes antimicrobianos, como fluoroquinolonas ou macrólidos, em doentes com patologia severa durante 3 semanas para evitar recidivas.[15]

### **3.6. Prevenção**

É crucial que os ambientes aquáticos antropogénicos sejam devidamente desinfetados, nomeadamente, com cloro e temperaturas elevadas. No entanto, ainda assim podem desenvolver-se casos de Doença dos Legionários devido à associação da bactéria com amebas nas regiões proximais dos sistemas de água, locais onde as concentrações de cloro e a temperatura observada se tornam menores, favorecendo o desenvolvimento e proliferação de *L. pneumophila*. Assim, a sobrevivência de amebas e a sua associação com *L.*

*pneumophila* devem ser tidas em conta aquando da realização dos processos de desinfeção.[16]

A adoção de orientações para a manutenção de torres de refrigeração e outros dispositivos geradores de aerossóis é uma medida importante de prevenção de surtos de legionelose no Mundo. No entanto, a prevenção de casos esporádicos torna-se mais difícil. Um dos passos essenciais para a prevenção dos mesmos inclui a identificação de casos esporádicos através de meios de diagnóstico adequados. É essencial realizar a cultura da expetoração e o UAT em doentes hospitalizados com fatores de risco favoráveis à existência de Doença dos Legionários.[1]

#### **4. Conclusões e Expetativas Futuras**

A infecção por *L. pneumophila* e o desenvolvimento de surtos de Doença dos Legionários têm vindo a ser largamente estudados desde 1976, ano em que ocorreu o primeiro surto mundialmente reconhecido da patologia. Podem ser resumidos diversos parâmetros que foram sendo otimizados desde então, nomeadamente, no que diz respeito ao diagnóstico da doença que era antes realizado através de métodos serológicos e, fruto de novas descobertas, foi substituído, essencialmente, pela cultura de *L. pneumophila*, pelo UAT e pelo PCR; e no que se refere ao tratamento da mesma, que era realizado com eritromicina e tem vindo a ser cada vez mais efetuado com recurso a fluoroquinolonas e outros macrólidos.

Apesar de, hoje em dia, muito ser conhecido acerca da patogénese de *L. pneumophila* e de se terem feito diversos avanços no conhecimento científico acerca da Doença dos Legionários, ainda diversos estudos são requeridos para que se encontrem meios de controlo e prevenção de surtos mais eficazes. De facto, independentemente de serem quase inexistentes, ainda existem casos fatais resultantes da Doença dos Legionários, como aconteceu em 2014, em Vila Franca de Xira, Portugal.

Uma vez que o diagnóstico da Doença dos Legionários se encontra direcionado para o serogrupo I, aquele que é reconhecido como mais prevalente na infecção por *L. pneumophila*, encontram-se em falta meios de diagnóstico específicos para outros serogrupos que são, de igual forma, responsáveis pela manifestação de legionelose. Também relativamente ao tratamento da legionelose, escasseiam estudos de experiência clínica de antibióticos em seres humanos, que devem, futuramente, ser desenvolvidos para que seja estabelecida uma terapêutica ótima.

Felizmente, nos dias de hoje, não se pode afirmar que a infecção por *L. pneumophila* seja recorrente. O avanço do conhecimento científico e das novas tecnologias associadas devem ser um apoio para que, no futuro, se possa considerar a legionelose uma doença “inofensiva” e perfeitamente controlável, com baixa incidência.

## 5. Referências Bibliográficas

1. Fields, B.S., Benson, R.F., e Besser, R.E., *Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation*. Clinical Microbiology Reviews, 15 (2002) 506-26.
2. Lindsay, D.S.J., Abraham, W. H., Findlay, W., Christie, P., Johnston, F., Edwards, Giles F.S., *Laboratory diagnosis of legionnaire's disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods*. Journal of Medical Microbiology, (2004) 183-187.
3. Newton, H.J., Ang, D.K., van Driel, I.R., e Hartland, E.L., *Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila*. Clinical Microbiology Reviews, 23 (2010) 274-98.
4. Lindsay, D.S., Abraham, W.H., Findlay, W., Christie, P., Johnston, F., e Edwards, G.F., *Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods*. Journal of Medical Microbiology, 53 (2004) 183-7.
5. Richards, A.M., Von Dwingelo, J.E., Price, C.T., e Abu Kwaik, Y., *Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella-amoeba interaction*. Virulence, 4 (2013) 307-14.
6. Declerck, P., *Biofilms: the environmental playground of Legionella pneumophila*. Environmental Microbiology, 12 (2010) 557-66.
7. Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E., e Guyard, C., *Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences, 14 (2013) 21660-75.
8. Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., Zumla, A., Abubakar, I, *Epidemiology and clinical management of Legionnaire's disease*. THE LANCET Infectious Diseases, 14 (2014) 1011-21.
9. Mercante, J.W. e Winchell, J.M., *Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations*. Clinical Microbiology Reviews, 28 (2015) 95-133.
10. García-Fulgueiras, A., Navarro, C. Fenoll, D., García, J., González-Diego, P., Jiménez-Buñuales, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Baladrón, B., Pelaz, C., *Legionnaire's Disease Outbreak in Murcia, Spain*. Emerging Infectious Diseases, 9 (2003) 915-921.
11. Coetzee, N., Duggal, H., Hawker, J., Ibbotson, S., Harrison, T. G., Phin, N., Laza-Stanca, V., Johnston, R., Iqbal, Z., Rehman, Y., Knapper, E., Robinson, S., Aigbogun, N., *An outbreak of Legionnaire's disease associated with a display spa pool in retail*

- premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012. Eurosurveillance: European Communicable Disease Bulletin, (2012).*
12. Shivaji, T., Sousa Pinto, C., San-Bento, A., Oliveira Serra, L.A., Valente, J., Machado, J., Marques, T., Carvalho, L., Nogueira, P.J., Nunes, B., Vasconcelos, P., *A large community outbreak of Legionnaire's disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. Euro Surveillace, 19 (2014) 20991.*
  13. Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., Pond, K., Surman-Lee, S., *Legionella and the prevention of legionellosis, 2007, World Health Organization.*
  14. Murdoch, D.R., *Diagnosis of Legionella infection. Clinical Infectious Diseases, 36 (2003) 64-9.*
  15. Roig, J., Rello, J., *Legionnaire's disease: a rational approach to the therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51 (2003) 1119-1129.*
  16. Cervero-Arago, S., Rodriguez-Martinez, S., Puertas-Bennasar, A., e Araujo, R.M., *Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free Legionella and Amoebae-Associated Legionella. PLoS One, 10 (2015) e0134726.*