



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA



Implementação de método de análise para deteção e enumeração de *Legionella*

MARIA DO CÉU PATRÍCIO ROMÃO

Licenciada em Engenharia Química e Biológica
Ramo de Engenharia Biológica

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica – Ramo de Bioprocessos

Orientadores:

Professora Doutora Sónia Martins
Mestre Ana Alegria Garcia de Aguiar

Júri:

Presidente: Professora Doutora Rita Pacheco
Arguente: Professora Doutora Celeste Serra
Vogal: Professora Doutora Sónia Martins

Fevereiro de 2019

Agradecimentos

No final desta tese, tenho o maior prazer em expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos os que de uma maneira ou de outra, me apoiaram na sua realização e que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, nomeadamente:

À minha orientadora, Prof^a Doutora Sónia Martins, por ter aceitado ser minha orientadora, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo dos anos enquanto minha professora e pelo apoio, conhecimento, disponibilidades, compreensão e paciência sempre demonstradas durante a elaboração e revisão deste trabalho.

À Eng^a Ana Alegria, agradeço a sugestão do tema e todo o apoio, conhecimento, disponibilidade e paciência sempre demonstradas durante a elaboração deste trabalho, bem como ao longo do meu percurso académico.

A presente tese foi desenvolvida no Laboratório do SMAS de Sintra, pelo que agradeço à instituição, nomeadamente aos membros do seu Conselho de Administração, a autorização concedida e todos os meios colocados à minha disposição para a sua realização.

Agradeço às minhas colegas do laboratório Rute Paulo e Célia Luz, não só pelo apoio e pela disponibilidade, mas também pela amizade e companheirismo que sempre demonstraram.

Agradeço a todos os meus professores do ISEL pela transmissão de conhecimentos.

Agradeço aos meus amigos o apoio e encorajamento não só na elaboração deste trabalho, mas ao longo de todo o meu percurso.

Por último e não menos importante, agradeço à minha família:

Agradeço aos meus pais, pelo suporte, pelo encorajamento e por acreditarem sempre, um muito obrigada não será certamente suficiente para agradecer o apoio incondicional que demonstraram sempre e que tanto me motivou para a realização deste trabalho e para toda a minha vida.

Agradeço às minhas irmãs e irmão, aos cunhados e cunhada e aos sobrinhos pelo apoio e encorajamento na elaboração desta tese, mas também ao longo de todo o meu percurso, por me ajudarem a ser a pessoa que sou hoje.

Agradeço ao meu marido, meu companheiro ao longo de todos estes anos, por todo o amor e apoio incondicional, pela compreensão e encorajamento.

E aos pequenos, que um dia vão compreender, agradeço por quando estiveram comigo e por quando não podiam estar porque eu tinha que trabalhar.

Obrigada!

Resumo

Este trabalho teve como objectivo a implementação e validação do método de análise de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* em amostras de água, de acordo com a Norma ISO 11731:2017 – *Water Quality – Enumeration of Legionella*, no laboratório dos SMAS de Sintra.

A elaboração deste trabalho iniciou-se por um lado pela pesquisa bibliográfica sobre a *Legionella*, os riscos que representa para a saúde pública e para os sistemas de abastecimento de águas e por outro lado pela pesquisa dos métodos de análise existentes.

O laboratório dos SMAS de Sintra é Acreditado desde 2008, pelo que dispõe de um sistema de gestão da qualidade definido de acordo com a Norma ISO 17025:2005 - Requisitos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração. A implementação do método de análise foi enquadrada no sistema de gestão da qualidade do laboratório e todo o processo de validação cumpriu os requisitos da ISO 17025.

Os primeiros ensaios para implementação do método foram realizados de acordo com a Norma ISO 11731:1998, no entanto com a publicação da nova Norma ISO 11731 em Maio de 2017, foi elaborado novo procedimento técnico para cumprimento das alterações impostas, nomeadamente a divisão do procedimento em quatro métodos distintos. Consoante o tipo de amostras, a concentração de microrganismos interferentes presentes e o limite de detecção pretendido, as amostras foram analisadas por método cultural directo por espalhamento, por filtração em membrana, por filtração em membrana com eluição ou as amostras foram diluídas.

Para validação do método procedeu-se à análise de vários tipos de amostras de água e de diferentes matrizes e pela análise de materiais de referência, amostras em duplicado e ensaios em paralelo, elaboraram-se cartas de controlo e definiram-se critérios de precisão e de estimativa de incerteza para os vários métodos do procedimento.

Com base nos resultados obtidos e no cumprimento dos requisitos definidos para implementação e validação de métodos microbiológicos foi possível implementar e validar o método de análise de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* no laboratório de microbiologia dos SMAS de Sintra.

Palavras chave: *Legionella* spp., *Legionella pneumophila*, Norma ISO 11731, amostras de água, SMAS de Sintra

Abstract

This work is aimed at the implementation and validation of the method of analysis of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples, according to ISO Standard 11731: 2017 - Water Quality - Enumeration of *Legionella*, in the laboratory of SMAS Sintra.

This work began on the one hand by the bibliographic research on *Legionella*, the risks that it represents for public health and for the water supply systems, and on the other hand by the evaluation of the existing methods of analysis.

The laboratory of SMAS Sintra has been accredited since 2008 and therefore has a quality management system defined in accordance with ISO 17025: 2005 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. The implementation of the method of analysis was framed in the laboratory's quality management system and the entire validation process was complied with the ISO 17025 requirements.

The first tests to implement the method were performed according to ISO Standard 11731: 1998, however with the publication of the new ISO Standard 11731 in May 2017, a new technical procedure was developed to fulfill imposed changes, namely the procedure division into four different methods. Depending on the type of samples, the concentration of interfering microorganisms present and the desired limit of detection, the samples were analyzed by culture method directly by spread plate technique, by membrane filtration, by membrane filtration and elution or samples were diluted before inoculation.

For the validation of the method, several types of water samples and different matrices were evaluated and the analysis of reference materials, duplicate samples and parallel tests were carried out. Control charts were drawn up, precision and uncertainty estimation criteria were defined for the various methods of the procedure.

Based on the results obtained and in compliance with the requirements defined for the implementation and validation of microbiological methods, it was possible to implement and validate the method of analysis of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in the microbiology laboratory of SMAS Sintra.

Keywords: *Legionella* spp., *Legionella pneumophila*, ISO Standard 11731, water samples, SMAS Sintra

Índice

| | |
|--|-----|
| RESUMO | II |
| ABSTRACT | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VI |
| ÍNDICE DE TABELAS | VII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | IX |
| 1. OS SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA | 1 |
| 1.1 O laboratório | 2 |
| 1.2 Enquadramento Legal do tema | 3 |
| 2. A <i>LEGIONELLA</i> | 6 |
| 3. DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS | 9 |
| 3.1 O Panorama Nacional e Europeu | 11 |
| 3.2 A doença do viajante e a influência meteorológica | 15 |
| 4. OCORRÊNCIA DE <i>LEGIONELLA</i> E RISCOS PARA OS SISTEMAS DE ABASTECIMENTO DE ÁGUAS | 17 |
| 5. DESINFECÇÃO DE SISTEMAS DE ABASTECIMENTO | 21 |
| 5.1 Métodos físicos | 21 |
| 5.2 Métodos químicos | 24 |
| 5.3 Métodos alternativos | 28 |
| 6. MÉTODOS DE ANÁLISE DE <i>LEGIONELLA</i> | 32 |
| 6.1 Métodos Normalizados | 32 |
| 6.2 Outros métodos de análise | 33 |
| 7. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE | 36 |
| 7.1 Elaboração do Procedimento Técnico | 36 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 7.2 | Caracterização das amostras | 52 |
| 7.3 | Validação do método | 57 |
| 7.3.1 | Ensaio em duplicado - Determinação do Critério de Precisão | 58 |
| 7.3.2 | Ensaio em paralelo - Cálculo da Estimativa de Incerteza | 65 |
| 7.3.3 | Ensaio com Material de Referência - Produtividade | 76 |
| 7.3.4 | Avaliação Externa | 82 |
| 8. | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS | 87 |
| 9. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |
| ANEXOS | | 97 |
| A. | Norma ISO 11731:2017 <i>Water Quality – Enumeration of Legionella</i> | 97 |
| B. | Procedimento Técnico de Microbiologia: PT mic – Detecção e enumeração de <i>Legionella</i> | 142 |
| C. | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | 154 |
| C.1 | PAm 19 - Colheita para <i>Legionella</i> | 154 |
| C.2 | IM 032 – Legionella – Registo de Resultados | 165 |
| C.3 | PAm 11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia | 167 |
| C.4 | PAm 09 – Controlo de qualidade de meios de Cultura | 175 |
| C.5 | PAm 15 - Implementação/validação de métodos | 189 |
| D. | 9020 SMEWW 22 nd Ed | 193 |
| E. | Anexo E e F da Norma ISO 29201:2012 | 196 |
| F. | Documento digital – Folha de cálculo de Legionella | 205 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - SMAS de Sintra, Complexo Oficinal e Laboratorial da Portela | 1 |
| Figura 2 - <i>Legionella pneumophila</i> (CDCb) | 7 |
| Figura 3 - Número de casos de Doença dos Legionários notificados em Portugal nos anos 1999 a 2015. (Adaptado de PINTO <i>et al.</i> , 2016) | 12 |
| Figura 4 - Esquema simplificado da análise por Legipid® (adaptado de LEGIPID) | 34 |
| Figura 5 - Identificação de <i>Legionella pneumophila</i> pelo método Legiolert™ (fonte: IDEXX) | 35 |
| Figura 6 - Diferentes membranas utilizadas na técnica de filtração, à esquerda membrana de MCE ao centro membrana PES | 39 |
| Figura 7 - Método de filtração por membrana | 40 |
| Figura 8 - Concentração da amostra pelo método FM | 40 |
| Figura 9 - Concentração da amostra pelo método FME | 41 |
| Figura 10 - Tratamento térmico da amostra | 42 |
| Figura 11 - Tratamento ácido da amostra | 42 |
| Figura 12 - Inoculação de uma amostra concentrada (FME) por espalhamento | 43 |
| Figura 13 - Leitura de placa de GVPC à lupa | 44 |
| Figura 14 - Leitura das placas. À direita observação da fluorescência da <i>Legionella anisa</i> . | 45 |
| Figura 15 - Confirmação de colónias suspeitas em meios BCYE (à esquerda) e BCYE-Cys (à direita) | 46 |
| Figura 16 - Teste de aglutinação para confirmação de serogrupo das colónias identificadas como <i>Legionella</i> spp. (Marca Oxoid, referência DR0800). Na imagem identificação de <i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 2 a 14. | 46 |
| Figura 17 - Cálculo dos limites e respectivo gráfico da Carta Guia de Produtividade do meio de cultura BCYE | 78 |
| Figura 18 - Cálculo dos limites e respectivo gráfico da Carta Guia de Produtividade do meio de cultura GVPC para <i>Legionella anisa</i> | 80 |
| Figura 19 - Cálculo dos limites e respectivo gráfico da Carta Guia de Produtividade do meio de cultura GVPC para <i>Legionella pneumophila</i> | 82 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Espécies de <i>Legionella</i> identificadas nos casos de Doença dos Legionários e espécies identificadas no ambiente sem associação a casos de doença (HALLSTRÖM, 2017) | 10 |
| Tabela 2 - Número de casos e taxa (casos/100000 habitantes) de Doença dos Legionários em Portugal e na EU/EEA nos anos 2006 a 2017 (ATLAS ECDC) | 13 |
| Tabela 3 - Critérios quantitativos de risco de <i>Legionella</i> (Adaptado de MANSILHA <i>et al.</i> , 2007) | 20 |
| Tabela 4 - Critérios quantitativos de risco de <i>Legionella</i> com maior distinção para os vários tipos de sistemas de água (Adaptado de KERBEL <i>et al.</i> , 2015) | 20 |
| Tabela 5 - Tabela de resumo dos meios de cultura e reagentes, condições de conservação e modo de acção, quando aplicável | 38 |
| Tabela 6 - Tabela resumo dos métodos de cultura, com respectiva fórmula de cálculo, limite de detecção, vantagens (↗) e desvantagens (↘) | 48 |
| Tabela 7 - Diferentes produtos e matrizes relacionadas de amostras | 52 |
| Tabela 8 - Amostras analisadas pelo método Directo em 2018 | 53 |
| Tabela 9 - Amostras analisadas pelo método FM em 2018 | 54 |
| Tabela 10 - Amostras analisadas pelo método FME em 2018 | 55 |
| Tabela 11 - Amostras analisadas pelo método Diluído em 2018 | 57 |
| Tabela 12 - Determinação do CP para <i>Legionella</i> spp. método Directo | 60 |
| Tabela 13 - Determinação do CP para <i>Legionella</i> spp. método FM | 61 |
| Tabela 14 - Determinação do CP para <i>Legionella</i> spp. método FME | 62 |
| Tabela 15 - Determinação do CP para <i>Legionella pneumophila</i> método Directo | 63 |
| Tabela 16 - Determinação do CP para <i>Legionella pneumophila</i> método FM | 63 |
| Tabela 17 - Determinação do CP para <i>Legionella pneumophila</i> método FME | 64 |
| Tabela 18 - Resumo do Critério de Precisão estabelecido por método para cada parâmetro | 64 |
| Tabela 19 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para <i>Legionella</i> spp. pelo método Directo. | 67 |
| Tabela 20 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para <i>Legionella</i> spp. pelo método Filtração por Membrana | 69 |
| Tabela 21 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para <i>Legionella</i> spp. pelo método Filtração por Membrana com Eluição | 70 |

| | |
|---|----|
| Tabela 22 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para <i>Legionella pneumophila</i> pelo método Directo | 71 |
| Tabela 23 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para <i>Legionella pneumophila</i> pelo método Filtração por Membrana | 72 |
| Tabela 24 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para <i>Legionella pneumophila</i> pelo método Filtração por Membrana com Eluição | 74 |
| Tabela 25 - Resumo dos resultados obtidos para a Estimativa de Incertza por parâmetro para cada método | 75 |
| Tabela 26 - Determinação da Produtividade do meio de cultura BCYE | 77 |
| Tabela 27 - Determinação da Produtividade do meio de cultura GVPC para <i>Legionella</i> spp. com <i>Legionella anisa</i> | 79 |
| Tabela 28 - Determinação da Produtividade do meio de cultura GVPC para <i>Legionella pneumophila</i> | 81 |
| Tabela 29 - Resultados obtidos na participação em EIL | 83 |

Lista de abreviaturas

| | |
|-----------|--|
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BCYE | Meio de Cultura <i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i> |
| BCYE+AB | Meio de cultura BCYE com suplemento selectivo |
| BCYE-Cys | Meio de cultura BCYE sem cisteína |
| CDC | <i>Center for Disease Control and Prevention</i> |
| CP | Critério de Precisão |
| DGS | Direcção Geral de Saúde |
| DL | Decreto-Lei |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| ECDC | <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> |
| EI | Estimativa de Incerteza |
| EIL | Ensaio Inter Laboratorial |
| ELDSNet | <i>European Legionnaires' Disease Surveillance Network</i> |
| EPA | <i>United States Environmental Protection Agency</i> |
| ERSAR | Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos |
| ETAR | Estação de Tratamento de Águas Residuais |
| EU/EEA | <i>European Union/European Economic Area</i> |
| EWGLI | <i>European Working Group for <u>Legionella</u> Infections</i> |
| FM | Filtração por Membrana |
| FME | Filtração por Membrana com Eluição |
| GVPC | Meio de cultura BCYE suplementado com Glicina, Vancomicina, Polimixina B e Cicloheximida |
| HPA | <i>Health Protection Agency</i> |
| INSA | Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge |
| IPAC | Instituto Português de Acreditação |
| ISO | <i>International Standard Organization</i> |
| Lcl | <i>Legionella collagen-like protein</i> |
| LD | Limite de Detecção |
| MALDI-TOF | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight</i> |
| MCE | <i>Mixed Cellulose Esters</i> |
| MR | Materiais de Referência |
| N | Não conformidade |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NMP | Número Mais Provável |
| OM | Oportunidade de Melhoria |
| PAM | Procedimento Auxiliar de Microbiologia |

| | |
|-------|---|
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PES | <i>Polyethersulfone</i> |
| PTmic | Procedimento Técnico de Microbiologia |
| RSECE | Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios |
| SGQ | Sistema de Gestão da Qualidade |
| SMAS | Serviços Municipalizados de Água e Saneamento |
| TALD | <i>Travel-Associated Legionnaires' Disease</i> |
| THM | Trihalometanos |
| ufc | unidades formadoras de colónias |
| UV | Ultravioleta |
| VBNC | <i>Viable But Not Culturable</i> |
| WDCM | <i>World Data Centre for Microorganisms</i> |

1. Os Serviços Municipalizados de Água e Saneamento de Sintra

Os Serviços Municipalizados de Água e Saneamento (SMAS) de Sintra (figura 1) são um serviço público de interesse local com autonomia administrativa, financeira e técnica, no município de Sintra.



Figura 1 - SMAS de Sintra, Complexo Oficial e Laboratorial da Portela

Criados em 1946, os SMAS de Sintra são a maior entidade autárquica distribuidora de água em Portugal, com cerca de 184000 clientes activos e um volume médio de água movimentada de 87000 m³/dia. Os SMAS de Sintra gerem os sistemas públicos municipais de distribuição de água, de drenagem e tratamento das águas residuais urbanas e de recolha de resíduos sólidos urbanos (SMAS^a).

Os SMAS de Sintra servem a 100% a população residente, mais de 384 mil habitantes distribuídos por uma área de 320 km², com uma rede de abastecimento de 1784 km de condutas, 52 reservatórios e 31 estações elevatórias. Cerca de 99,4% da água fornecida é adquirida à Empresa Portuguesa das Águas Livres, provindo a restante de captação própria (SMAS^b).

O tratamento das águas residuais serve 95% da população, com 1000 km de rede e emissários, 16 estações de tratamento de águas residuais (ETAR) e 21 estações elevatórias (SMAS^c).

Em Dezembro de 2017, os SMAS de Sintra assumiram a totalidade do serviço de recolha e transporte dos resíduos urbanos no município de Sintra. A rede de recolha de resíduos urbanos é constituída por 5099 contentores de indiferenciados, 1588 ecopontos e 83 oleões (SMAS^d).

Os SMAS de Sintra têm como finalidade a satisfação das necessidades colectivas da população do concelho, no âmbito das suas atribuições. Para além de outras legalmente estabelecidas, as suas atribuições desenvolvem-se fundamentalmente nos seguintes domínios:

a) Captação, adução, tratamento e distribuição de água para consumo público;

b) Construção, ampliação, manutenção e gestão do sistema de abastecimento de água para consumo público;

- c) Recolha, drenagem, tratamento e destino final das águas residuais urbanas;
- d) Construção, ampliação, manutenção e gestão do sistema de drenagem de águas residuais urbanas;
- e) Recolha e transporte de Resíduos Sólidos Urbanos para destino adequado.

Os SMAS de Sintra têm apostado na melhoria contínua dos seus serviços ao longo dos anos, começando pela Acreditação do laboratório. Actualmente estão certificados segundo os referenciais normativos do Sistema de Gestão Integrado da Qualidade (ISO 9001), Ambiente (ISO 14001) e Segurança e Saúde do Trabalho (OHSAS 18001) para a actividade de abastecimento de água e do saneamento das águas residuais urbanas e recolha e transporte de resíduos urbanos.

Como reconhecimento do trabalho desenvolvido, os SMAS de Sintra têm sido distinguidos nos últimos anos, com o selo de “Qualidade exemplar de água para consumo humano”. Este prémio, atribuído pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR) e outros parceiros, é uma forma de destacar as entidades distribuidoras, que cumprem com os parâmetros essenciais de qualidade, previstos pelo regulamento durante o último ano de avaliação.

1.1 O laboratório

Em 1985 os SMAS de Sintra criaram o seu laboratório para controlo da qualidade microbiológica da água de consumo humano apesar de nessa altura esse controlo ainda não ser prioritário a nível nacional. O laboratório foi-se desenvolvendo ao longo dos anos e passou a efectuar também a análise de parâmetros físico-químicos, com um aumento contínuo de amostras e de análises realizadas.

Em 2007, foi publicado o Decreto-Lei nº 306/2007 de Águas de Consumo Humano e para cumprimento do mesmo, o laboratório deu início ao seu processo de acreditação. Assim, em Setembro de 2008 foi obtida a acreditação do laboratório pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) e pela norma EN ISO/IEC 17025:2005 e em Janeiro de 2010, obteve-se a Acreditação da Colheita de Amostras para análise de parâmetros microbiológicos e físico-químicos para águas de consumo e naturais. Neste momento, o laboratório dos SMAS de Sintra já se encontra acreditado para 60 métodos analíticos.

No que respeita ao controlo de águas de consumo humano incluem-se as análises efectuadas na torneira do consumidor (no âmbito do Plano de Controlo de Qualidade da Água - PCQA), e as análises de controlo operacional em pontos específicos da rede de abastecimento.

No laboratório dos SMAS de Sintra são também analisadas as águas residuais, para controlo do funcionamento das Estações de Tratamento de Águas Residuais e das descargas industriais em colectador. O laboratório também presta serviços a clientes externos, nomeadamente munícipes.

Assim, no laboratório dos SMAS de SINTRA são efectuadas análises microbiológicas e físico-químicas a águas de abastecimento, águas residuais, águas balneares, piscinas, captações, ribeiras, furos e poços de munícipes. Também são realizadas análises microbiológicas às lamas provenientes das ETAR.

A legislação actual torna obrigatório que os laboratórios que fazem análises para controlo da qualidade da água de consumo (DL n.º 306/2007 alterado pelo DL n.º 152/2017) e também de água natural (DL n.º 83/2011) sejam acreditados. Também as licenças de descarga das ETAR do concelho exigem que as análises sejam efectuadas por laboratórios com sistema de gestão da qualidade implementado. A Lei n.º 52/2018, que estabelece o Regime de Prevenção e Controlo da Doença do Legionário também obriga a que a análise de *Legionella* em amostras ambientais seja realizada por laboratórios acreditados. A legislação referente à análise de *Legionella* é descrita em pormenor no próximo capítulo desta tese.

Neste trabalho, pretende-se descrever a implementação e validação da análise de pesquisa e quantificação de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* de acordo com a Norma ISO 11731:2017 (Anexo A). No decorrer do ano 2018, o laboratório solicitou ao IPAC o pedido de extensão de acreditação para este parâmetro, tendo sido auditado em Setembro de 2018. A Acreditação desta análise representa para o laboratório o reconhecimento do trabalho desenvolvido na sua implementação e validação, respondendo às necessidades dos SMAS de Sintra e também dos seus munícipes.

1.2 Enquadramento Legal do tema

A análise de *Legionella* é referenciada na legislação portuguesa no âmbito da qualidade da água, para águas minerais naturais utilizadas nos estabelecimentos termais, na Portaria n.º1220 de 2000. Esta portaria estabelece o limite de unidades formadoras de colónias (ufc) de 100 ufc/L para *Legionella* spp. e ausência para *Legionella pneumophila*. O próprio Decreto-Lei n.º 142 de 2004, que regula o licenciamento, a organização, o funcionamento e a fiscalização dos estabelecimentos termais reporta para a Direcção Geral de Saúde (DGS) e para a Portaria n.º 1220/2000 o controlo bacteriológico.

Em 2006 foi implementada a política da qualidade do ar interior, na sequência da transposição para o direito interno da directiva n.º 2002/91/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2002, relativa ao desempenho energético dos edifícios. Foram publicados o Decreto-Lei n.º 78/2006, de 4 de Abril, que aprovou o Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios, o Decreto-Lei n.º 79/2006, de 4 de Abril, que aprovou o Regulamento dos Sistemas Energéticos

de Climatização em Edifícios (RSECE) e o Decreto-Lei n.º 80/2006, de 4 de Abril, que aprovou o Regulamento das Características de Comportamento Térmico dos Edifícios.

De acordo com o ponto 9 do RSECE - DL n.º 79/2006, em edifícios com sistemas de climatização em que haja produção de aerossóis, nomeadamente onde haja torres de arrefecimento ou humidificadores por água líquida, ou com sistemas de água quente para chuveiros, onde a temperatura de armazenamento seja inferior a 60°C, as auditorias da qualidade do ar interior incluem também a pesquisa da presença de *Legionella* em amostras de água recolhidas nos locais de maior risco, nomeadamente tanques das torres de arrefecimento, depósitos de água quente e tabuleiros de condensação, não devendo ser excedido um número superior a 100 ufc.

Em 2013, na sequência do Decreto-Lei n.º 118/2013, de 20 de agosto, foram publicadas duas portarias com referência ao parâmetro de *Legionella*. A Portaria n.º 349-D, que indica no ponto 8.3.2 que o sistema de acumulação de água quente sanitária deverá dispor de mecanismos ou estratégias destinadas a prevenir o desenvolvimento de *Legionella* spp., e a Portaria n.º 353-A que estabelece na Tabela I.09 condições de referência para os poluentes microbiológicos. Na matriz água, essas condições são: concentração inferior a 100 ufc/L, excepto no caso da pesquisa em tanques de torres de arrefecimento em que deve verificar-se uma concentração inferior a 1000 ufc/L, para *Legionella* spp., e ausência de *Legionella pneumophila*.

O Decreto-Lei n.º 118/2013, revogou os Decretos-Lei n.º 78/2006, n.º 79/2006 e n.º 80/2006. O Decreto-Lei n.º 79/2006, conforme referido anteriormente, continha as disposições legais dos requisitos para a manutenção da qualidade do ar interior, nomeadamente a obrigatoriedade de auditorias nos edifícios de serviços existentes dotados de sistemas de climatização. A metodologia e periodicidade eram estabelecidas por portaria conjunta dos ministros responsáveis pelas áreas da economia, das obras públicas, do ambiente e do ordenamento do território e habitação.

O Decreto-Lei n.º 79/2006 era ainda explícito quanto ao risco e às medidas direccionadas à Doença dos Legionários: “em edifícios com sistemas de climatização em que haja produção de aerossóis, nomeadamente onde haja torres de arrefecimento ou humidificadores por água líquida, ou com sistemas de água quente para chuveiros, onde a temperatura de armazenamento seja inferior a 60°C as auditorias da Qualidade do Ar Interior incluem também a pesquisa da presença de colónias de *Legionella* (...)”. Pelo que, até Dezembro de 2013, a qualidade do ar interior e a certificação energética dos edifícios no caso de escolas, centros desportivos, infantários, centros de idosos, hospitais e clínicas, viam as auditorias serem feitas de 2 em 2 anos. No caso de estabelecimentos comerciais, de turismo, de transportes, culturais, escritórios e outros a periodicidade das mesmas era de 3 em 3 anos. Com efeito, 2014 foi o primeiro ano sem a obrigatoriedade de auditorias, foi também o ano em que ocorreu em Vila Franca de Xira o primeiro

surto de *Legionella* em Portugal, a que se seguiu em Novembro de 2017, o surto no Hospital de S. Francisco Xavier e em Janeiro de 2018 o surto no Hospital CUF Descobertas.

Em Março de 2016, foi aprovado o Projecto de Resolução n.º 134/XIII, do Bloco de Esquerda, que “Recomenda a reintrodução da fiscalização da qualidade do ar interior, com a correspondente pesquisa da presença de colónias de *Legionella* tal como previsto no Decreto-Lei n.º 79/2006, de 4 de Abril”.

Em Dezembro de 2017 foi aprovada e publicada a 22 Janeiro de 2018 a resolução nº 15/2018, que recomenda ao Governo medidas que promovam a prevenção da Doença dos Legionários, a qualidade do ar de edifícios climatizados e a isenção do pagamento de taxas moderadoras, em casos de surtos de infecção por *Legionella*. O Governo, pela voz do ministro do Ambiente, João Pedro Matos Fernandes, anunciou no dia 11 de Janeiro de 2018 um diploma para evitar surtos como os de Vila Franca de Xira e Lisboa.

Em Agosto de 2018 foi publicada a Lei nº 52/2018, que “Estabelece o regime de prevenção e controlo da Doença dos Legionários e procede à quinta alteração ao Decreto-Lei n.º 118/2013”. Essa lei aplica-se a todos os sectores de actividade, que tenham equipamentos de transferência de calor associados a sistemas de aquecimento, ventilação e ar condicionado ou a unidades de tratamento do ar, desde que possam gerar aerossóis de água. Esta lei prevê o registo de todos os equipamentos numa plataforma electrónica e nesse registo devem constar os dados de identificação e localização dos equipamentos, bem como o regime de funcionamento, a proveniência e o tipo de tratamento da água de arrefecimento. Esta lei prevê ainda a elaboração de um plano de prevenção e controlo de *Legionella*. Este plano deve ser elaborado com base numa análise de risco, em que são identificados os pontos críticos de proliferação de *Legionella*, deve estabelecer programas de manutenção, limpeza, desinfecção, monitorização, tratamento e deve conter os registos dos mesmos. Os ensaios laboratoriais incluídos no programa devem ser realizados em laboratórios Acreditados pelo IPAC ou por uma entidade homóloga. O programa de monitorização e tratamento será definido de acordo com um despacho dos membros do Governo responsáveis pelas áreas de saúde e ambiente.

2. A *Legionella*

A bactéria *Legionella* foi identificada pela primeira vez após um surto epidémico de pneumonia grave, que ocorreu entre os participantes da 58ª Convenção da Legião Americana, em 1976 em Filadélfia, Estados Unidos da América.

Em 1977, Brenner e colaboradores analisaram e relacionaram o ácido desoxirribonucleico (DNA) das bactérias isoladas desses doentes e de outras recolhidas pelo *Center for Disease Control* (CDC^a) e concluíram tratar-se de uma nova espécie de bactérias. Uma vez que o padrão de crescimento, bem como as suas características bioquímicas e até o seu conteúdo Guanina+Citosina, não estavam relacionados com mais nenhuma bactéria de forma significativa, foi considerada como pertencente a um novo género, e uma vez que não se assemelhava a quaisquer outros organismos foi criada também uma nova família. Esta nova espécie foi denominada por *Legionella pneumophila*, *legio* de legião ou exercito e *pneumophila* de pulmão, pertencente ao novo género *Legionella* e à família *Legionellaceae* (BRENNER *et al.*, 1979).

De acordo com *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), actualmente à família *Legionellaceae* pertencem além das bactérias do género *Legionella* outros dois géneros, *Tatlockia* e *Fluoribacter*, no entanto a designação *Legionella* é amplamente utilizada para descrever os três géneros (ISO 11731:2017).

Taxonomicamente, a família *Legionellaceae* juntamente com a família *Coxiellaceae* pertencem à ordem *Legionellales*, classe Gamma-Proteobacteria, filo Proteobacteria, Reino Bacteria (NCBI).

As bactérias do género *Legionella* (figura 2) apresentam-se na forma de bacilo ou filamentosa após serem cultivadas em meio de cultura, com 0,3-0,9 x 2-20 µm de comprimento, com um, dois ou até mais flagelos, que têm localização polar ou lateral (BRENNER *et al.*, 2005). Crescem numa gama de temperatura entre 20 e 42° C (ISO 11731:2018) e são aeróbias obrigatórias (MADIGAN *et al.*, 2009). O seu crescimento é fastidioso e necessitam de L-cisteína e de sais de ferro, em cultura em meio de carvão e extrato de levedura apresentam-se geralmente de cor branca acinzentada, com aspecto de vidro moído e algumas espécies têm autofluorescência (ISO 11731:2018). Estas bactérias são Gram negativas, oxidase negativas ou apresentam uma reacção de oxidase positiva muito fraca. As espécies deste género são quase todas catalase positivas, têm mobilidade, não reduzem nitratos, são urease negativas e liquefazem a gelatina. São quimio-organotróficos, usam aminoácidos como fonte de carbono e energia e não fermentam nem oxidam hidratos de carbono. (BRENNER *et al.*, 2005).



Figura 2 - *Legionella pneumophila* (CDCb)

A *Legionella* é uma bactéria que pode ser encontrada em vários habitats, principalmente em ambientes aquáticos e húmidos, como por exemplo na natureza em lagos, rios, águas subterrâneas e solo (CORDERO *et al.*, 2016), mas também em sistemas artificiais como os sistemas de distribuição, torres de arrefecimento, condensadores evaporativos e em sistemas de ar condicionado (MADIGAN *et al.*, 2009).

Estas bactérias ubíquas são parasitas intracelulares, por isso podem ser encontradas dentro de protozoários aquáticos, como amebas (SAKAMOTO, 2015) ou dentro de monócitos e macrófagos em humanos (PRESCOTT *et al.*, 2002). Os biofilmes aquáticos, que se encontram difundidos não apenas na natureza, mas também noutros sistemas de água, são outros nichos ecológicos, nos quais a *Legionella* sobrevive e consegue proliferar (ATLAS, 1999).

As bactérias de *Legionella* spp. podem resistir a condições ambientais adversas devido à sua capacidade de persistir num estado viável, mas não cultivável, “*viable but not culturable*” (VBNC) (CASINI *et al.*, 2018). Actualmente o estado VBNC é considerado uma estratégia de sobrevivência das células Gram negativas, à semelhança da formação de endosporos em algumas bactérias Gram positivas (KIRSCHNER, 2016), que ocorre quando o microrganismo se encontra em *stress*, quer por escassez de nutrientes, água ou oxigénio, quer devido a aspectos ambientais, como extremos de temperatura ou pH, radiação ultravioleta ou presença de produtos químicos, como o cloro (TREVORS, 2011). Tipicamente, as células VBNC apresentam baixa actividade metabólica e não crescem em cultura (CASINI *et al.*, 2018), podem até ficar

mais pequenas ou comprimidas e por vezes sofrem uma transição morfológica, passando da forma de bastonete para uma forma mais esférica (TREVORS, 2011), no entanto mantêm algumas características das células viáveis, como a integridade celular e alguma actividade metabólica e virulência (CASINI *et al.*, 2018). Ainda não é claro, se e até que ponto, estas células VBNC de *Legionella* apresentam risco para a saúde humana (DIETERSDORFER *et al.*, 2018; KIRSCHNER, 2016). Nas últimas décadas, este tema tem sido discutido de forma controversa e recentemente Dietersdorfer e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, que *Legionella* VBNC pode infectar directamente diferentes tipos de amebas e macrófagos humanos, no entanto, consideraram que causaram infecção com eficácia reduzida e que mesmo após a multiplicação de *Legionella* dentro dos seus hospedeiros as bactérias permaneceram no estado VBNC (DIETERSDORFER *et al.*, 2018).

O crescimento intracelular em protozoários aumenta a capacidade de sobrevivência ambiental, a patogenicidade e virulência da *Legionella*. Os requisitos de crescimento destas bactérias, a capacidade de entrarem no estado VBNC, a associação com protozoários e a ocorrência dentro de biofilmes são factores que contribuem para o risco associado aos sistemas de abastecimento de águas e que dificultam a detecção de *Legionella* nas investigações epidemiológicas (ATLAS, 1999).

Essa capacidade da *Legionella* parasitar protozoários e os riscos associados aos sistemas de abastecimento serão aprofundadas no capítulo 4 desta tese.

3. Doença dos Legionários

A infecção causada por *Legionella* é conhecida como legionelose e ocorre principalmente de duas formas: Doença dos Legionários, que é uma forma severa da infecção provocada pela bactéria e que provoca uma pneumonia atípica e a Febre de Pontiac, que é uma doença mais ligeira que não resulta em pneumonia (CORDERO *et al.*, 2016).

A doença pode ser adquirida por inalação ou aspiração de água ou solo na forma de aerossóis contaminados com *Legionella*. Até à data, não foi descrito nenhum caso de infecção associada ao contacto entre ou com animais, consumo de alimentos contaminados ou ingestão de água contaminada. Está apenas relatado um caso provável de transmissão de pessoa a pessoa que ocorreu em Portugal (CORREIA *et al.*, 2016).

Na Doença dos Legionários a infecção por *L. pneumophila* ocorre, quando as bactérias inaladas se instalam e se multiplicam dentro dos fagossomas dos macrófagos alveolares. Os sintomas da Doença dos Legionários são febre alta, tosse não produtiva (não ocorrem secreções respiratórias durante a tosse), dor de cabeça, manifestações neurológicas e broncopneumonia grave (PRESCOTT, 2002).

Embora qualquer indivíduo possa contrair a Doença dos Legionários, alguns factores de risco comuns para o desenvolvimento de uma infecção incluem idade (> 50 anos), género (masculino), hábitos de tabagismo, doenças pulmonares já existentes (por exemplo, asma e doença pulmonar obstrutiva crónica), consumo prévio de antibióticos betalactâmicos, estado imunossuprimido ou imunocomprometido (por exemplo, pessoas que fizeram transplantes ou quimioterapia, portadores de doença renal, diabetes ou SIDA) e cirurgia ou intubação recentes. A percentagem de mortes de casos notificados de Doença dos Legionários aumenta com a idade (> 50 anos) e apresenta um padrão semelhante para homens e mulheres (CORDERO *et al.*, 2016).

Na Febre de Pontiac, os sintomas são semelhantes a um estado viral, como a gripe, ou a doença alérgica. Não é uma infecção e não ocorre pneumonia. Esta doença é caracterizada por um início de febre abrupto, dor de cabeça, tonturas e dores musculares que se resolvem espontaneamente ao fim de 2 a 5 dias. A Febre de Pontiac foi descrita pela primeira vez como um surto num departamento de saúde do condado em Pontiac, no Michigan, EUA, em que 95% dos funcionários ficaram doentes. Posteriormente, identificou-se como origem do surto o sistema de ar condicionado que não estava nas devidas condições (PRESCOTT, 2002).

Aproximadamente metade das espécies de *Legionella* descritas até o momento foram associadas a casos clínicos de legionelose, mas é provável que a maioria das bactérias do género *Legionella* possa causar doença nas condições apropriadas. A tabela seguinte apresenta à esquerda as espécies de *Legionella* identificadas nos casos de Doença dos Legionários e à direita espécies identificadas no ambiente, mas que até à data não estão associadas a doentes de Doença dos Legionários (CORDERO *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Espécies de *Legionella* identificadas nos casos de Doença dos Legionários e espécies identificadas no ambiente sem associação a casos de doença (HALLSTRÖM, 2017)

| Espécies de <i>Legionella</i> identificadas nos casos de Doença dos Legionários | Espécies de <i>Legionella</i> identificadas no Ambiente, sem associação a casos de Doença dos Legionários |
|--|--|
| <i>L. anisa</i> , <i>L. birminghamensis</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. cardiaca</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. clemsonensis</i> , <i>L. dumoffii</i> , <i>L. erythra</i> , <i>L. feeleii</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. hackeliae</i> , <i>L. jamestowniensis</i> , <i>L. jordansii</i> , <i>L. lansingensis</i> , <i>L. londiniensis</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. lytica</i> , <i>L. maceachernii</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. nagasakiensis</i> , <i>L. oakridgensis</i> , <i>L. parisiensis</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>L. sainthelensi</i> , <i>L. steelei</i> , <i>L. tucsonensis</i> , <i>L. wadsworthii</i> , <i>L. waltersii</i> | <i>L. adelaidensis</i> , <i>L. beliardensis</i> , <i>L. brunensis</i> , <i>L. busanensis</i> , <i>L. cherrii</i> , <i>L. drancourtii</i> , <i>L. dresdenensis</i> , <i>L. drozanskii</i> , <i>L. fairfieldensis</i> , <i>L. fallonii</i> , <i>L. geestiana</i> , <i>L. gratiana</i> , <i>L. gresilensis</i> , <i>L. impletisoli</i> , <i>L. israelensis</i> , <i>L. massiliensis</i> , <i>L. moravica</i> , <i>L. nautarum</i> , <i>L. norrlandica</i> , <i>L. quateirensis</i> , <i>L. quinlivanii</i> , <i>L. rowbothamii</i> , <i>L. rubrilucens</i> , <i>L. santicrucis</i> , <i>L. saoudiensis</i> , <i>L. shakespearei</i> , <i>L. spiritensis</i> , <i>L. steigerwaltii</i> , <i>L. taurinensis</i> , <i>L. thermalis</i> , <i>L. tunisiensis</i> , <i>L. worsleiensis</i> , <i>L. yabuuchiae</i> |

O género *Legionella* inclui mais de 60 espécies e aproximadamente 70 serogrupos distintos, muitos dos quais considerados patogénicos. As estirpes de *L. pneumophila* pertencentes ao serogrupo 1 são responsáveis pela maioria dos casos de Doença dos Legionários nos Estados Unidos e na Europa. O serogrupo 6 de *L. pneumophila* pode ser o segundo serogrupo mais comum, com base na frequência com a qual é isolado de amostras clínicas. Por outro lado, embora *L. pneumophila* cause a maioria dos casos de Doença dos Legionários, outras espécies também podem estar associadas à doença, particularmente em casos adquiridos em ambiente hospitalar. As espécies mais comuns identificadas em infecções por *Legionella* não *pneumophila* são *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* e *L. longbeachae* (CORDERO *et al.*, 2016).

3.1 O Panorama Nacional e Europeu

No nosso país, a Doença dos Legionários está incluída na lista de doenças transmissíveis de declaração obrigatória, desde 1999 (Portaria nº 1071/98, de 31 de Dezembro), sendo também obrigatório notificar a rede comunitária, segundo a Decisão da Comissão Europeia nº 2119/98/CE de 24 de Setembro de 1998.

Em Abril de 2004 foi criado o Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários, com o objectivo de reforçar a vigilância epidemiológica da doença.

Os dados da Doença dos Legionários a nível Europeu eram inicialmente geridos pela *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLINet), tendo passado, a partir de Abril de 2010, a ser coordenados pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), com a designação de *European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet). Portugal está representado neste grupo, através de dois centros colaboradores, um para a área da Epidemiologia pela Direcção-Geral da Saúde e outro para a área da Microbiologia pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

A figura seguinte representa o número de casos de Doença dos Legionários notificados em Portugal, entre os anos 1999 e 2015.

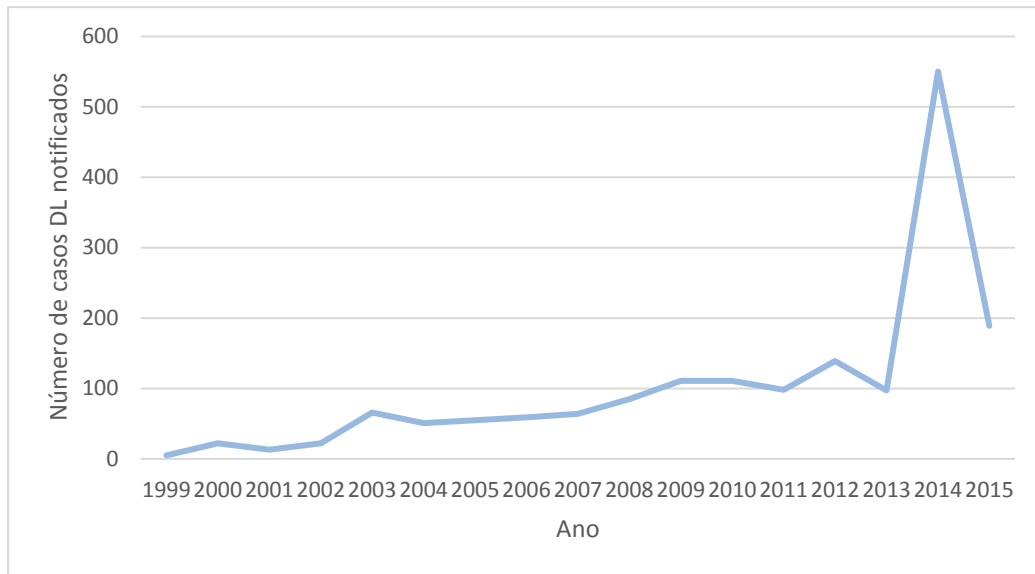


Figura 3 - Número de casos de Doença dos Legionários notificados em Portugal nos anos 1999 a 2015. (Adaptado de PINTO *et al.*, 2016)

O EWGLI foi constituído em 1986, por razões que se prenderam com a especial vulnerabilidade a que se provou estarem expostos os viajantes dentro do espaço europeu a esta bactéria. Este grupo de trabalho chegou a contar com a colaboração de representantes de 35 países.

Os seus membros eram especialistas, de formação diversificada, com o interesse comum de contribuir para o conhecimento e informação nos aspectos microbiológico e epidemiológico (clínico e ambiental) da Doença dos Legionários, sendo a coordenação feita por um grupo da *Health Protection Agency* (HPA) de Londres.

A rede de vigilância epidemiológica estabelecida entretanto, coordenada pelo centro de Londres e com especial incidência na Infecção associada ao viajante, EWGLINET, funcionou com ligação ao Programa de Vigilância de Doenças Transmissíveis da União Europeia.

Através deste sistema, qualquer caso de Doença dos Legionários que surgisse, eventualmente associado a uma instituição hoteleira, era notificado através da EWGLINET ao centro coordenador, sendo em seguida implementadas, pela autoridade de saúde local, as medidas preconizadas pelas “European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires’ Disease” (2005), nos países que assinaram este acordo (DGS).

Actualmente, sob a coordenação do ECDC, o ELDSNet conduz a vigilância da Doença dos Legionários na Europa, tendo indicado que entre os anos 2011 e 2015, 29 países notificaram o ECDC de 30532 casos de

Doença dos Legionários (28188 (92,3%) confirmados e 2344 (7,7%) prováveis) (BEAUTÉ, 2017). Já em 2016 foram notificados 7069 casos de Doença dos Legionários (6560 (92,8%) confirmados e 509 (7,2%) prováveis) em 30 países (ECDC, 2018).

Verifica-se que quatro países (França, Alemanha, Itália e Espanha) representaram cerca de 70% de todos os casos relatados, embora a soma das suas populações represente apenas cerca de 50% da população em estudo. A taxa de casos aumentou de 0,97 casos / 100000 habitantes em 2011 para 1,30 casos / 100000 habitantes em 2015 (BEAUTÉ, 2017) e 1,40 casos / 100000 habitantes em 2016 (ECDC, 2018).

Demograficamente, o índice de infecção permaneceu inalterado com cerca de 70% de casos adquiridos na comunidade e 80% ocorreram em pessoas com idade igual ou superior a 50 anos. O índice geral de letalidade diminuiu de forma constante de 10,5% para 8,1% entre 2011 e 2015 (BEAUTÉ, 2017), no entanto em 2016 subiu ligeiramente para 8,2% (ECDC, 2018). O aumento referido entre 2011 e 2015, provavelmente reflecte a melhoria no diagnóstico e tratamento (BEAUTÉ, 2017).

Verifica-se, na tabela seguinte, que em Portugal e na Europa, tem ocorrido um aumento gradual do número de casos notificados nos últimos anos. Verifica-se ainda que desde 2014 a taxa (número de casos/100000 habitantes) nacional de Doença dos Legionários tem sido superior, ou igual em 2015, à taxa na Europa.

Tabela 2 - Número de casos e taxa (casos/100000 habitantes) de Doença dos Legionários em Portugal e na EU/EEA nos anos 2006 a 2017 (ATLAS ECDC)

| | 2006 | | 2007 | | 2008 | | 2009 | |
|-------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | Casos | Taxa | Casos | Taxa | Casos | Taxa | Casos | Taxa |
| Portugal | 90 | 0,86 | 82 | 0,78 | - | - | 96 | 0,91 |
| EU/EEA | 6086 | 1,28 | 5653 | 1,13 | 5688 | 1,16 | 5562 | 1,11 |
| | 2010 | | 2011 | | 2012 | | 2013 | |
| | Casos | Taxa | Casos | Taxa | Casos | Taxa | Casos | Taxa |
| Portugal | 128 | 1,20 | 89 | 0,80 | 140 | 1,30 | 94 | 0,90 |
| EU/EEA | 6305 | 1,30 | 4923 | 1,00 | 5848 | 1,10 | 5849 | 1,10 |
| | 2014 | | 2015 | | 2016 | | 2017 | |
| | Casos | Taxa | Casos | Taxa | Casos | Taxa | Casos | Taxa |
| Portugal | 588 | 5,60 | 145 | 1,40 | 197 | 1,90 | 232 | 2,25 |
| EU/EEA | 6943 | 1,40 | 7034 | 1,40 | 7069 | 1,37 | 9238 | 1,79 |
| - : dados indisponíveis | | | | | | | | |

Os casos de Doença dos Legionários podem surgir isoladamente, em grupos ou *clusters* ou em surtos. Define-se *cluster* como dois ou mais casos de pessoas que estiveram no mesmo local e adoeceram com

um intervalo de tempo inferior a dois anos, *cluster* padrão. Já quando ocorrem vários *clusters* combinados que têm um ou mais casos em comum define-se como um *cluster* complexo (ECDC, 2018). Define-se surto como dois ou mais casos de pessoas que estiveram no mesmo local e adoeceram mais ou menos ao mesmo tempo (CDC^a).

De acordo com os comunicados efectuados pela DGS, foram identificados em Portugal quatro surtos de Doença dos Legionários nos últimos anos:

- Novembro de 2014 – Concelho de Vila Franca de Xira: este surto foi o maior a nível nacional e considerado o segundo maior na literatura (GEORGE *et al.*, 2016).

Neste surto foram identificados 403 casos de pneumonia, dos quais 377 foram confirmados e foram provocados pela bactéria *Legionella pneumophila*, tendo ocorrido 14 óbitos.

Neste caso, ficou demonstrada a correspondência da estirpe das bactérias isoladas de uma das torres de arrefecimento, de uma unidade fabril da empresa Adubos De Portugal, com a estirpe identificada em secreções brônquicas dos doentes. A idade média foi de 58 anos, com uma amplitude de variação entre os 22 e os 92 anos. Dos casos confirmados, 67% eram do sexo masculino e 33% do sexo feminino. Do total dos casos notificados, 78% dos doentes residia em Vila Franca de Xira, 11% no concelho de Loures e 11% habitavam noutras freguesias. Todos os casos identificados tiveram ligação epidemiológica (residência, trabalho, permanência ou deslocação) ao concelho de Vila Franca de Xira ou freguesias limítrofes de outros municípios. A taxa de letalidade do surto foi de 3,7% (GEORGE *et al.*, 2014).

- Março 2017 – Concelho da Maia:

Foram identificados cinco casos de Doença dos Legionários no concelho da Maia, em Março de 2017. Os cinco doentes eram trabalhadores da empresa Sakthi Portugal SA. Admitiu-se a possibilidade de exposição ocupacional, uma vez que os doentes poderiam ter adquirido a infecção antes da conclusão dos trabalhos de descontaminação das torres de arrefecimento da empresa (Comunicados DGS nº C129_01_v3 e nº C129_01_v4).

- Novembro 2017 – Concelho de Lisboa, Hospital S. Francisco Xavier:

No âmbito deste surto, foram confirmados 56 casos de Doença dos Legionários com ligação ao Hospital de São Francisco Xavier, e mais 5 casos suspeitos. Dos 56 casos confirmados registaram-se 6 óbitos (11%) (Comunicado DGS nº C142_07_v1).

- Janeiro 2018 – Concelho de Lisboa, Hospital CUF Descobertas:

Foram confirmados 15 casos de Doença dos Legionários com ligação ao Hospital CUF Descobertas. Destes, um não necessitou de internamento, 12 tiveram alta clínica e 2 necessitaram de internamento em Unidades de Cuidados Intensivos (Comunicado DGS nº C144_07_v1).

3.2 A doença do viajante e a influência meteorológica

Na Europa, considera-se que a Doença dos Legionários é subestimada e as taxas de notificação diferem significativamente entre os países. Em 2016, e tal como nos anos anteriores, a maioria dos casos (71%) foi adquirida na comunidade, enquanto 20% estavam associados a viagens, 7% estavam associados a unidades de saúde e 2% estavam noutros contextos (ECDC, 2018). Também nos Estados Unidos cerca de 20% dos casos reportados estão associados a viagens (BEAUTÉ *et al.*, 2012, SPRINGSTON *et al.*, 2017).

Em 2016, foram notificados 1 082 casos de Doença dos Legionários associada a viagens, em inglês *Travel-Associated Legionnaires' Disease* (TALD), através da rede de vigilância e quase em tempo real: menos 5% do que em 2015, mas 14% e 37% a mais do que em 2014 e 2013, respectivamente. Foram identificados um total de 135 *clusters* associados a viagens, dos quais 122 *clusters* padrão, em 26 países e num navio, e 13 *clusters* complexos. Em 2016, 51% dos *clusters* detectados de TALD foram identificados inicialmente por diferentes países. Esses casos provavelmente não teriam sido detectados sem a rede de vigilância internacional da ELDSNet (ECDC, 2018).

Pela revisão dos eventos de doença associados a viagens, quer sejam casos isolados, *clusters* ou surtos, e pelos estudos ambientais de contaminação de *Legionella* nos locais de alojamento, identificaram-se como factores comuns a falta de desinfecção, manutenção e monitorização adequadas; a estagnação da água e o controle deficiente de temperatura. Da análise a 30 eventos nos EUA, verificou-se que as concentrações de *Legionella* em amostras de água suspeitas foram superiores a 10000 ufc/L em 11 situações, inferiores 10000 ufc/L para 3 casos e desconhecidas nas restantes. Em estudos ambientais, a *Legionella* foi detectada em 81,1% de ferries (23/28) e 48,9% de hotéis (587/1200), no entanto as amostras recolhidas de 12 navios-cruzeiro foram negativas (MOUCHTOURI *et al.*, 2015).

Da avaliação dos dados da *Nationwide Inpatient Sample*, a maior base de dados sobre cuidados de saúde de pacientes internados nos Estados Unidos da América e dos respectivos dados meteorológicos, estima-se que a probabilidade de uma pneumonia adquirida na comunidade, ser diagnosticada como Doença dos Legionários, aumenta quando o tempo está quente e húmido. Quando a temperatura média é de 15,56°C - 26,67° C (60 ° -80 ° F) com valores de humidade superiores a 80,0%, a probabilidade de uma pneumonia

ser diagnosticada como Doença dos Legionários é 3,1 vezes maior do que para humidades mais baixas, inferiores a 50,0%. Embora a *Legionella* spp. seja comum no meio ambiente, a sua prevalência não é favorecida por ambientes secos e é mais sensível do que outros agentes patogénicos a esse ambiente. Em contrapartida, o clima quente e húmido tende a favorecer a sobrevivência e o crescimento deste microrganismo, bem como a potenciar a vaporização e formação de aerossóis, o que por consequência pode aumentar o risco de doença (SIMMERING *et al.*, 2017).

Apesar do turismo ter grande impacto na Europa e o seu pico no Verão coincidir com o pico da Doença dos Legionários, por exemplo em 2016, 58% dos casos foram notificados entre Junho e Outubro (ECDC, 2018), os casos de doença em viajantes que contraem a doença no país que visitam são reportados, principalmente, pelo país de residência do doente, independentemente da qualidade do sistema de vigilância no país de destino de viagem. Assim, como as taxas de notificação tendem a reflectir a qualidade da vigilância nacional, em vez do risco local para a doença, é difícil estimar e comparar o risco em todos os países (BEAUTÉ *et al.*, 2012). No entanto, há evidências de que o risco de Doença dos Legionários pode ser maior quando se verificam determinadas condições ambientais, nomeadamente o clima quente e húmido tem sido associado a maiores taxas de incidência. Pelo que, é de esperar maior número de casos após chuvas fortes, durante a estação quente. Com base nos dados do Sistema Europeu de Vigilância e nos dados de turismo da Agência de Estatística da União Europeia, considerou-se que o risco global associado a viagens, em 2009, foi de 0,3 casos/milhão de dormidas e verificou-se uma tendência crescente de risco do noroeste para o sudeste da Europa. A Grécia apresentou o maior risco, 1,68, enquanto Portugal teve um risco de 1,06 (BEAUTÉ *et al.*, 2012).

4. Ocorrência de *Legionella* e riscos para os sistemas de abastecimento de águas

Estudos sobre a ocorrência de *Legionella* em sistemas de distribuição de água potável mostram que frequentemente esta bactéria está presente. Por exemplo, na Itália, 22,6% dos sistemas de distribuição de água analisados estavam contaminados, bem como 26% na Alemanha, 30% na Finlândia e 42% na Letónia (PULE, 2016).

Em Portugal, têm sido desenvolvidos alguns estudos sobre a prevalência de *Legionella*, nomeadamente pelo INSA, que recebe várias amostras para análise. Mansilha e colaboradores efectuaram um estudo às amostras analisadas para quantificação de *Legionella* entre os anos 2000 e 2006. Foram efectuadas 1674 análises de *Legionella*, decorrentes de inquéritos epidemiológicos, vigilância sanitária e particulares. A maior percentagem de amostras contendo *Legionella pneumophila* foi recolhida em termas e também em empresas e edifícios com 31% de amostras positivas cada. Em relação aos diferentes pontos de colheita, há a destacar que em média 19% das amostras de torres de refrigeração foram positivas para *L. pneumophila* (MANSILHA *et al.*, 2007). Já em 2013, Rodrigues do departamento de Saúde Ambiental do INSA indica que das 975 amostras recebidas entre Janeiro de 2010 e Junho de 2012, provenientes de controlo de rotina, Vigilância Sanitária e Inquéritos Epidemiológicos, 192 foram positivas para *Legionella*, ou seja aproximadamente 20% das amostras. Neste estudo o autor deu ênfase ao facto de embora ter um baixo número de amostras provenientes de *jacuzzis* este ponto de amostragem apresentou 37,5 % de resultados positivos (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Como já foi referido, a *Legionella* pode ser encontrada em diversos ambientes aquáticos, sendo os sistemas de água doce os principais reservatórios naturais da bactéria, no entanto, também se pode encontrar *Legionella* spp. em amostras de solo natural, em vasos ou em tanques de compostagem.

As bactérias do género *Legionella* podem persistir em condições ambientais mais adversas, como temperaturas baixas e altas, presença de desinfectantes, baixo pH, escassez de nutrientes e elevada salinidade. As condições de crescimento ideal são a presença de água entre 35 e 46 °C e por serem capazes de suportar, durante várias horas, temperaturas próximas de 50 °C, são classificadas como bactérias termotolerantes. Esta capacidade permite que as bactérias *Legionella* spp. possam ser encontradas frequentemente em sistemas de água aquecida, no entanto também podem sobreviver a temperaturas inferiores a 20 °C (CORDERO *et al.*, 2016).

Embora a própria *Legionella* spp. seja tolerante ao calor, as amebas termotolerantes que vivem nos biofilmes podem proporcionar protecção adicional contra o calor (LU *et al.* 2015). No entanto, temperaturas superiores a 55 °C tendem a diminuir a formação de biofilmes. As condições que permitem o crescimento de *Legionella* em biofilmes incluem elevado tempo de residência, a presença de ferro (embora muito ferro possa inibir a formação de biofilmes), a presença de cátions como cálcio, magnésio, zinco e manganês, e a temperatura. Os factores que aumentam a probabilidade de formação de biofilmes são a presença de nutrientes, o volume e a corrosão do material, temperaturas de água morna e elevados tempos de residência, como os que ocorrem nos pontos extremos dos sistemas de distribuição, nos pontos terminais que possam não ser utilizados e nos tanques de armazenamento. A presença de corrosão e o volume aumentam tanto a área de superfície disponível como a concentração de nutrientes e de factores que favorecem o crescimento, como o ferro no sistema de água (CORDERO *et al.*, 2016).

Os sistemas bacterianos de ancoragem, isto é, produção de proteínas e outras substâncias para formação de biofilme são também afectados pela temperatura. De oito espécies de *Legionella* testadas, somente *L. pneumophila* produz a proteína Lcl (*Legionella* collagen-like protein) que contribui para a produção de biofilme, e apenas *L. pneumophila* mostrou ser capaz de auto-agregar, o que evidencia o papel da auto-agregação na formação de biofilmes de *L. pneumophila*. A proteína Lcl também pode contribuir para a ligação de *L. pneumophila* às amebas, facilitando a infecção desses protozoários (VANDERSMISSEN *et al.*, 2010). Por outro lado, a *L. pneumophila* também excreta um surfactante que é tóxico para outras bactérias do género *Legionella*, o que pode prevenir ou reduzir a presença dessas espécies quando *L. pneumophila* está presente. De referir, que esse mesmo surfactante não afecta espécies pertencentes a outros géneros (ABDEL-NOUR *et al.*, 2013)

A associação de *L. pneumophila* com muitos microrganismos diferentes em ambientes aquosos tem sido amplamente demonstrada, por exemplo, *L. pneumophila* pode persistir em biofilmes dominados por outros agentes patogénicos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp e *Pseudomonas fluorescens*. Contudo, verificou-se num ensaio laboratorial, que a adição de *Pseudomonas aeruginosa* a um biofilme eliminou *L. pneumophila*, e que na ausência de *P. aeruginosa*, a concentração de *L. pneumophila* no biofilme aumentou (ABDEL-NOUR *et al.*, 2013, COTUK *et al.*, 2005, MORITZ *et al.*, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade da *Legionella* infectar e de se multiplicar em várias espécies de protozoários, incluindo amebas e protozoários ciliados, bem como de estabelecer interacções simbióticas com outras bactérias. A característica apresentada pela *Legionella* de parasitar alguns protozoários, que frequentemente são encontrados nos biofilmes dos sistemas de distribuição de água é considerada particularmente importante para a sua capacidade de sobreviver e crescer em condições ambientais adversas. Estas bactérias também podem parasitar os macrófagos alveolares nos pulmões humanos sendo possível a algumas estirpes resistir ao processo de fagocitose através do seu sistema de

secreção Icm/Dot, que lhes permite controlar as células dos macrófagos, tal como dos protozoários (DIETERSDORFER *et al.*, 2018).

Em certas circunstâncias, os protozoários hospedeiros de *Legionella* podem mesmo ser necessários para o seu crescimento em biofilme. Observou-se que *L. pneumophila* num biofilme com *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e uma espécie de *Flavobacterium* não se dividiu, excepto quando a ameba *Vermamoeba vermiformis* estava presente. Este estudo foi realizado utilizando um regime de fluxo contínuo, em que se verificou que a presença de *V. vermiformis* não foi necessária para a sobrevivência de *L. pneumophila*, mas foi essencial para o seu crescimento, tendo-se concluído que *V. vermiformis* é um protozoário importante que influencia o desenvolvimento de *Legionella*. (MURGA *et al.*, 2001, STEWART *et al.*, 2012)

Cordero cita diversos estudos, que sugerem que os protozoários desempenham um papel importante na transmissão de *L. pneumophila* e posteriormente, na aquisição de legionelose. Há também uma forte evidência de que *V. vermiformis* está associada a surtos de *Legionella*, favorece a sua transmissão e que o grau de infecção pode ser substancialmente aumentado, se estas amebas infectadas por *Legionella* forem inaladas. Ao contrário das células individuais de *Legionella* de vida livre, as amebas infectadas podem conter centenas de células de *Legionella*. Quando essas células são libertadas para o exterior das amebas, um grande número de bactérias pode infectar os pulmões (CORDERO *et al.*, 2016). Já Berk e colaboradores demonstraram que *Acanthamoeba* spp. podem libertar vesículas de tamanho inalável que contêm *L. pneumophila* viva, sendo essas vesículas resistentes ao congelamento e descongelamento e a ultra-sons. Verificou-se também que as bactérias no interior das vesículas são altamente resistentes aos biocidas (BERK *et al.*, 1998).

Tal como já foi referido, a *L. pneumophila* pode formar biofilmes de substâncias segregadas (isto é, substâncias poliméricas extracelulares) e pode multiplicar-se dentro desses biofilmes. Portanto, os biofilmes nos sistemas municipais de água de abastecimento podem ser uma potencial fonte de contaminação da água com *L. pneumophila*, por consequência fonte de contaminação da água de consumo dos sistemas municipais, e possivelmente dos sistemas de água dos hospitais e outros edifícios (LU *et al.* 2015).

No entanto, a presença de *Legionella* em sistemas de abastecimento de água não pode ser directamente relacionada com o risco de infecção ou ocorrência da doença. Assume-se que quanto maior a concentração de bactérias dentro de um dado sistema, maior a probabilidade de transmissão e exposição. Os surtos de Doença dos Legionários que têm sido associados a torres de arrefecimento e condensadores, têm sido geralmente associados a uma elevada concentração de *Legionella*, superior a 1000 ufc/mL de água. Nos sistemas de água potável associados a surtos, os valores registados de *Legionella* foram entre 1 e 1500 ufc/mL e em média de 160 ufc/mL, no entanto apenas 10 ufc/mL num depósito de nebulização podem estar na origem da doença. (SPRINGSTON *et al.*, 2017)

Em 2007 Mansilha apresentou uma análise dos critérios de valorização de risco de *Legionella*, de acordo com o Departamento de Saúde de New South Wales, (tabela 3), que distinguiu apenas torres de arrefecimento, redes de água quente e humidificadores e nebulizadores (MANSILHA *et al.* 2007).

Tabela 3 - Critérios quantitativos de risco de *Legionella* (Adaptado de MANSILHA *et al.*, 2007)

| Ponto de amostragem | Risco | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------|-------|
| | Baixo | Moderado | Alto |
| | Concentração de Legionella (ufc/mL) | | |
| Torres de arrefecimento | <100 | 100-999 | ≥1000 |
| Redes de água quente | <10 | 10-99 | ≥100 |
| Humidificadores/ nebulizadores | <1 | 1-9 | ≥10 |

Tendo em conta os dados disponíveis, a *American Industrial Hygiene Association* estabeleceu os critérios quantitativos semelhantes aos indicados na tabela anterior, mas com maior distinção para os vários tipos de sistemas de água (tabela 4)

Tabela 4 - Critérios quantitativos de risco de *Legionella* com maior distinção para os vários tipos de sistemas de água (Adaptado de KERBEL *et al.*, 2015)

| Ponto de amostragem | Risco | | |
|--|-------------------------------------|----------|-------|
| | Baixo | Moderado | Alto |
| | Concentração de Legionella (ufc/mL) | | |
| Humidificadores e nebulizadores | <1 | 1-10 | >10 |
| Fontes ornamentais | <1 | 1-10 | >10 |
| Banheiras de hidromassagem e spas | <1 | 1-10 | >10 |
| Água potável | <10 | 10-100 | >100 |
| Água de aplicação industrial | <10 | 10-100 | >100 |
| Torres de arrefecimento condensadores evaporativos ^e | <100 | 100-1000 | >1000 |

5. Desinfecção de sistemas de abastecimento

Embora já sejam utilizados vários métodos de desinfecção e controle, há muito tempo que a prevalência de *Legionella* em sistemas de distribuição de água artificiais continua a apresentar desafios para a saúde pública.

Existem vários processos de desinfecção para eliminar a *Legionella* dos sistemas de abastecimento. Estes dividem-se em dois tipos, físicos como a desinfecção térmica ou a utilização de luz ultravioleta (UV) e químicos como a cloração, a utilização de metais como cobre e prata, de dióxido de cloro, de cloraminas, nomeadamente a monocloramina e ainda a desinfecção por ozono. Estes e outros métodos têm sido amplamente investigados em vários estudos e os resultados mostram que é difícil conseguir a eliminação completa da *Legionella* de um sistema de distribuição de água, seja qual for o procedimento de desinfecção.

Uma vez que cada método de desinfecção apresenta vantagens e desvantagens, ainda não foi identificado um método que seja óptimo (PULE, 2016).

5.1 Métodos físicos

A desinfecção térmica é uma prática comum nos sistemas de distribuição de água, principalmente em hospitais e hotéis. A temperatura da água quente é elevada a 70°C, uma vez que é temperatura efectiva para eliminar a *Legionella*, e deve-se verificar nos pontos mais críticos do sistema, ou seja, aqueles que estão mais distantes e que normalmente coincidem com os pontos terminais das redes, nomeadamente torneiras e chuveiros. Assim, faz-se circular a água àquela temperatura nos chuveiros e torneiras durante 30 minutos. Nos pontos de utilização, a temperatura deve ser confirmada e monitorizada, não devendo ser inferior a 60°C e devendo a água circular em todo o sistema durante duas horas, mantendo o mesmo em carga (BENOLIEL *et al.*, 2018). Contudo, existem outras metodologias que recomendam, por exemplo que se eleve a temperatura da água quente para valores de 70 a 80°C, recorrendo às caldeiras que constituem o sistema, assim como aos permutadores de calor, e que se faça re-circular a água durante 1 a 3 horas e assegurando que à saída das torneiras, nos pontos de extremidade, se verificam 65°C. Posteriormente, deve-se abrir sequencialmente todas as torneiras e chuveiros durante cinco minutos, confirmando-se posteriormente a temperatura estabelecida. Quando não for possível estabelecer as temperaturas recomendadas nos vários processos de desinfecção térmica, deve recorrer-se à desinfecção química (DIEGUES *et al.*, 2013).

O superaquecimento ou produção de vapor e descarga é o método mais antigo para controlar *Legionella* em sistemas de distribuição de água (CHEN *et al.*, 2005). Este processo consiste na produção de vapor a 100°C, recorrendo ao uso de caldeiras a alta pressão e posteriormente fazendo circular o vapor pela tubagem da rede predial de água quente, de modo a que a temperatura seja mantida entre os 70 a 80°C. Pode-se também recorrer ao processo instantâneo de produção de vapor, elevando a temperatura da água quente para valores superiores aos 88°C e posteriormente misturar água fria até obtenção da temperatura desejada. Esta opção permite evitar custos excessivos, em virtude de não necessitar de pessoal especializado para a operação, podendo ser a equipa da manutenção do edifício a executar esta tarefa. Por outro lado, a manutenção deste sistema é usualmente mais complexa do que o recurso a tanques de água quente para a desinfecção térmica. Este sistema de desinfecção com o recurso à produção de vapor instantâneo, funciona melhor quando na concepção da rede sanitária foi prevista a sua instalação (DIEGUES *et al.*, 2013).

Em vários estudos, além de se aumentar a temperatura da água, as torneiras e os chuveiros foram quimicamente desinfetados ou substituídos, no entanto, tais acções não demonstraram ter efeito na diminuição de *Legionella* (CHEN *et al.*, 2005).

Se a temperatura da água na saída não exceder um ponto crítico ou a duração da descarga for muito curta, o procedimento de desinfecção provavelmente não terá efeito (CHEN *et al.*, 2005). No entanto, é possível obter uma redução logarítmica na contagem de *Legionella* com uma descarga de menos de um minuto a 70 ° C. A 60 ° C o tempo de descarga necessário é inferior a 5 minutos (KIM *et al.*, 2002). Contudo, embora a desinfecção térmica seja amplamente utilizada, ainda não há consenso sobre a duração da descarga. Além disso, a desinfecção térmica pode ser apenas temporária, e é possível que ocorra recolonização com *Legionella* (CHEN *et al.*, 2005). A colonização do sistema de água pode ocorrer em dias, semanas ou meses após a desinfecção, especialmente nos casos em que as temperaturas de circulação sejam inferiores a 45-50° C (BLANC *et al.*, 2005, CHEN *et al.*, 2005).

Uma das principais vantagens da desinfecção térmica é que não é necessário nenhum equipamento especial, por isso pode ser iniciada com rapidez, o que é uma vantagem notável numa situação de surto e quando a eliminação de *Legionella* do sistema de distribuição de água deva ser imediata (CHEN *et al.*, 2005). Outra vantagem, consiste no facto do método ser menos dispendioso comparado com outros métodos de desinfecção. As principais desvantagens são o facto de ser um procedimento demorado e que envolve vários operadores para monitorizar o tempo e temperatura das descargas (PULE, 2016), o facto de não ser aplicável na rede sanitária de água fria porque este processo apenas permite o controlo na rede sanitária de água quente (DIEGUES *et al.*, 2013), a incapacidade de afectar as bactérias dos biofilmes, o efeito de desinfecção ser de curto prazo, e ainda o facto de não ser adequado para grandes edifícios, onde temperaturas superiores a 60° C nas descargas não podem ser mantidas (CHEN *et al.*, 2005).

A desinfecção da água por radiação ultravioleta é usada hoje em dia para obter água de elevada qualidade bacteriológica, nomeadamente na indústria farmacêutica, na indústria alimentar para produção de bebidas, como por exemplo nas cervejeiras, no tratamento de água ultrapura para a indústria electrónica e de semicondutores, bem como para aquecimento e até para tratamento de água para consumo humano, quer à escala doméstica quer no abastecimento das comunidades (DIEGUES *et al.*, 2013).

O tratamento com radiação UV consiste na transferência de energia electromagnética de uma lâmpada de arco mercúrio para um organismo. Quando a radiação UV penetra na estrutura da célula, através da membrana celular, destrói a estrutura do DNA e compromete a capacidade replicativa da célula (DIEGUES *et al.*, 2013, SIMÕES *et al.*, 2013).

O comprimento de onda da radiação UV que conduz a uma eliminação mais eficaz dos microrganismos, encontra-se entre 250 a 270 nm. Assim, para eliminar 99,9% das células de *Legionella* é necessário dimensionar os equipamentos, de modo a obter-se uma dose de radiação UV entre os 25 a 30 mJ/cm² e um tempo de exposição entre 1 a 2 segundos (DIEGUES *et al.*, 2013). No entanto, estudos sobre o efeito deste método em *Legionella* mostraram que a radiação UV por si só é insuficiente para controlar *Legionella*, e que a sua utilização deve ser combinada com outros métodos de desinfecção como hipocloração periódica, superaquecimento e descarga ou tratamento com peróxido de hidrogénio (KIM *et al.*, 2002). Da mesma forma, a eficácia da desinfecção UV pode ser aumentada com pré-filtração, de forma a remover as partículas em suspensão, que interfiram com a acção da radiação UV e com a sua eficácia, atrasando assim a recolonização por *Legionella* em cerca de 3 meses. Caso não se proceda à pré-filtração da água, a recolonização tem tendência a ocorrer no período de semanas (PULE, 2016).

As unidades de tratamento por radiação UV são geralmente instaladas perto do ponto de uso, portanto este método muitas vezes não é adequado para a desinfecção de todo o edifício porque as bactérias persistem em biofilmes, dentro das tubagens e em especial nos pontos terminais, sem utilização e seções estagnadas do sistema. Os poucos estudos focados no impacto da desinfecção por radiação UV no biofilme e no seu crescimento nos sistemas de abastecimento de água, mostraram que tal tratamento não teve um efeito consistente no biofilme (PULE, 2016).

As vantagens da desinfecção por radiação UV são o facto de o sistema ser de instalação fácil, com requisitos de espaço pequenos, sem perigo de sobredosagem e de produção de subprodutos indesejáveis (excepto quando seja seguida de desinfecção química) e sem necessidade de manusear e armazenar produtos químicos tóxicos. Adicionalmente, este tratamento não confere sabor nem odor à água, não depende do pH e não tem efeito adverso nas canalizações. A radiação UV elimina vírus, bactérias e algas e é efectiva no combate aos protozoários, incluindo *Cryptosporidium parvum* e *Giardia*, além disso destrói as cloraminas e reduz os trihalometanos (THM), tendo ainda um efeito de oxidação avançada devido à produção de radicais hidroxilo (DIEGUES *et al.*, 2013).

Algumas desvantagens deste processo são o facto de não ter um efeito desinfectante residual na água tratada (KIM *et al.*, 2002), como a cloração por exemplo, o que significa que são necessários procedimentos adicionais de tratamento, sobretudo em redes de grandes dimensões, o que origina despesas adicionais. Outras desvantagens são a formação de biofilmes na superfície da lâmpada UV, a baixa eficácia de desinfecção quando a água apresenta turvação (PULE, 2016) e o facto da radiação UV destruir o cloro e interagir com os produtos halogenados (DIEGUES *et al.*, 2013).

5.2 Métodos químicos

Quando existem casos associados de Doença dos Legionários que envolvem sistemas prediais de água, ou os valores detectados são superiores a 1000 ufc/L de *Legionella pneumophila*, é muitas vezes necessário recorrer a tratamentos de choque por via química, recorrendo por exemplo, ao uso de cloro ou dos seus derivados (DIEGUES *et al.*, 2013).

O cloro, tal como outros agentes oxidantes (dióxido de cloro, cloraminas, ozono e peróxido de hidrogénio) são geralmente usados para a desinfecção de água potável, sendo a cloração o método mais aplicado nos serviços de abastecimento de água (KIM *et al.*, 2002), tanto na desinfecção primária como na desinfecção residual. Contudo, encontram-se em desenvolvimento outros métodos devido à preocupação com a formação de subprodutos resultantes da desinfecção com cloro.

O cloro pode ser adicionado à água no estado líquido, principalmente como hipoclorito de sódio ou ácido hipocloroso purificado, como gás ou como sólido (habitualmente como hipoclorito de sódio ou cálcio). O cloro reduz e controla o desenvolvimento de *Legionella*, desde que as concentrações residuais sejam mantidas. No entanto, para controlar de forma contínua o desenvolvimento da bactéria, são necessárias concentrações de cloro de 2 a 6 mg/L, concentrações muito superiores às habitualmente encontradas (KIM *et al.*, 2002). A hiper-cloração de choque pode ser aplicada para a desinfecção de um sistema de água durante 1 a 2 horas, seguida da substituição da água e manutenção dos valores de cloro na água próximos de 1 mg/L. Após este procedimento, a recolonização por *Legionella* só ocorre depois dos níveis de cloro diminuírem (KIM *et al.*, 2002, PULE, 2016).

Diferentes estudos mostram que o cloro é mais eficaz contra *Legionella* a temperaturas mais elevadas, sem efeito de turbidez, embora a concentração de cloro diminua mais rapidamente com temperaturas mais altas. O mesmo acontece para valores de pH elevados, pelo que a eficácia do cloro é maior para valores de pH próximos de 6 (PULE, 2016).

Para melhorar a eficácia da desinfecção, podem ser utilizadas abordagens múltiplas, por exemplo uso de cloro e radiação UV ou iões de cobre e prata. A cloração pode assim ser combinada com outros métodos de desinfecção, sendo necessárias nessas condições concentrações muito mais baixas de cloro.

A principal vantagem da cloração é que permite estabelecer uma determinada concentração residual de desinfectante em todo o sistema de distribuição de água, minimizando a colonização por *Legionella* ao longo da rede e mesmo nos pontos extremos (PULE, 2016). Usualmente, valores de cloro residual livre de 2 mg/L permitem manter concentrações de *Legionella* inferiores a 100 ufc /100 mL, quando na presença de biofilmes (DIEGUES *et al.*, 2013).

As principais desvantagens associadas à cloração são os custos significativos, o facto de potenciar os fenómenos de corrosão nas redes prediais, sendo necessário adicionar produtos químicos anticorrosivos e materiais silicatados. Os subprodutos de cloro, podem levar à formação elevada de trihalometanos nos sistemas de água quente, quando o teor de cloro residual livre excede os 4 mg/L. Outras desvantagens são a toxicidade do cloro, a eficácia a curto prazo, que está relacionada com a presença de *Legionella* no interior das células das amebas, situação que pode conferir resistência à bactéria e pode interferir no processo de penetração do cloro no biofilme, sendo necessário recorrer à adição de biodispersantes (DIEGUES *et al.*, 2013, PULE, 2016).

O dióxido de cloro é uma alternativa usual à desinfecção com as outras formas de cloro referidas, quer no tratamento de água para consumo humano, quer no tratamento da água para processos industriais, tendo em conta que além do poder de desinfecção elevado, não potencia os fenómenos de corrosão dos materiais das redes (DIEGUES *et al.*, 2013). O dióxido de cloro é um forte agente oxidante, é um gás verde-amarelo, solúvel em água, que não pode ser armazenado porque se decompõe rapidamente. Para redução do risco de armazenamento devido à sua elevada toxicidade, deve ser produzido no local de utilização, a partir de soluções diluídas de ácido hipoclorídico e de cloreto de sódio. O uso deste agente no tratamento da água está a tornar-se cada vez mais comum, porque se formam menos subprodutos indesejáveis (KIM *et al.*, 2002, PULE, 2016).

A maior diferença entre o dióxido de cloro e os outros compostos à base de cloro é o seu efeito gradual na eliminação do biofilme, mesmo em doses baixas. O dióxido de cloro é um biocida mais efectivo que a solução aquosa de hipoclorito de sódio e do que os seus derivados, requer menos tempo de contacto e apresenta uma acção mais forte no combate à carga bacteriana, sendo necessário recorrer a doses mais baixas (DIEGUES *et al.*, 2013). O dióxido de cloro é mais eficaz a temperaturas e valores de pH mais elevados. No entanto, o efeito de inactivação pelo pH é menos pronunciado, do que o que se verifica para o cloro (KIM *et al.*, 2002).

Diversos estudos mostraram a diminuição significativa da colonização por *Legionella* após a desinfecção com dióxido de cloro, no entanto outros estudos recomendam o tratamento convencional, pois não identificam um efeito significativo na utilização deste tipo de desinfecção (PULE, 2016). Da mesma forma, a influência do dióxido de cloro no biofilme não é clara, por um lado Diegues *et al.* indicam que o dióxido de cloro permite destruir os agentes patogénicos e os biofilmes, no entanto, outros autores descreveram

apenas que na maioria dos casos se verifica melhor desempenho na inactivação de bactérias no biofilme do que na desinfectação por cloração, mas não se verifica a eliminação completa da *Legionella* dos sistemas de água (DIEGUES *et al.*, 2013).

As principais vantagens do dióxido de cloro são os custos relativamente baixos, não conferir sabor nem odor à água e o facto dos subprodutos de desinfectação serem menos nocivos. Adicionalmente, não forma substâncias tóxicas como as cloraminas e os THM. No entanto, as incertezas quanto à eficácia do dióxido de cloro contra *Legionella* são uma desvantagem significativa (DIEGUES *et al.*, 2013, PULE, 2016).

Os iões de metal, como os iões de cobre e prata, são agentes bactericidas, que formam ligações electrostáticas com locais carregados negativamente na parede celular do microrganismo. Essas ligações criam tensões que levam à rotura na permeabilidade da parede celular o que juntamente com a desnaturação de proteínas, leva à lise e à morte celular. Os iões metálicos podem ser adicionados à água, por exemplo como sais metálicos.

Estudos sobre a aplicação de iões cobre e prata foram realizados contra a *Legionella*, tanto no uso separado como combinado. Com uma concentração do ião de cobre de 0.1 mg/L foi registada uma redução de 6 ciclos logarítmicos de *Legionella* em 2.5 horas e para uma concentração igual do ião prata a mesma redução levou aproximadamente 8 horas. Verificou-se ainda que a combinação dos dois iões era sinérgica (KIM *et al.*, 2002), e que o uso intermitente similar de iões de cobre e prata também foi bem sucedido (PULE, 2016).

No entanto, existem alguns aspectos a ter em conta na aplicação destes métodos, nomeadamente deve-se controlar o pH da água e monitorizar regularmente as concentrações do cobre e da prata. A concentração do cobre deve ser mantida em valores de 400 µg/L e da prata em 40 µg/L. Contudo, se a água for macia, a concentração de prata pode variar entre os 20 a 30 µg/L e caso as águas tenham elevada dureza, pode ser difícil manter a concentração de prata (DIEGUES *et al.*, 2013).

A manutenção de altas temperaturas no sistema de água pode melhorar a eficácia da ionização cobre/prata, enquanto a eficácia a valores de pH elevados ainda é questionável. Embora em vários estudos, a ionização de cobre/prata não tenha conduzido à redução da colonização por *Legionella*, na maioria dos casos é descrita elevada eficácia para o controle de *Legionella* durante um ano, após a activação da unidade de ionização. Os casos de falha provavelmente podem ser justificados por baixas concentrações de iões ou devido a elevado pH na água (PULE, 2016).

As vantagens da ionização cobre/prata são os custos relativamente baixos, fácil instalação e manutenção. As desvantagens estão relacionadas com o facto dos eléctrodos da unidade de ionização necessitarem

de ser limpos regularmente, para garantir o máximo desempenho. Além disso, o nível de iões de cobre e prata pode flutuar. Concentrações excessivas de iões podem conferir coloração à água e às superfícies, pelo que a monitorização dos níveis de iões deve ser realizada regularmente. O tratamento a longo prazo com iões de cobre e prata pode teoricamente resultar no desenvolvimento de resistência a estes iões. Como outros métodos convencionais de desinfecção, a ionização de cobre/prata não permite erradicar completamente *Legionella* do sistema de abastecimento, porque a bactéria persiste no biofilme (DIEGUES *et al.*, 2013, PULE, 2016).

Em alguns países, a legislação e as regulamentações locais não permitem o uso de cobre, o que inviabiliza a aplicação deste método. Em Portugal o Decreto-Lei nº 152/2017, de 7 de Dezembro, estabelece para o cobre o valor paramétrico de 2 mg/L, mas para a prata não estabelece qualquer valor. A *United States Environmental Protection Agency* (EPA) recomenda valores na água de consumo humano de 1.3 mg/L para o cobre e 100 µg/L para a prata.

Outro método de desinfecção que está a ganhar popularidade é o uso de cloraminas, especialmente da monoclорamina. O interesse por este composto aumentou, devido à preocupação com os subprodutos prejudiciais da cloração (KIM *et al.*, 2002). As cloraminas produzem os mesmos subprodutos que o cloro, mas em quantidades mais baixas, além disso não são tão reactivas com produtos de ferro como o cloro e no que respeita à corrosão, são ainda mais estáveis e a sua concentração residual é mantida por longos períodos (PULE, 2016).

Embora alguns estudos indiquem que o uso de monoclорamina pode ser mais eficaz que o uso de cloro para controle de *Legionella* (KIM *et al.*, 2002), a maioria dos trabalhos refere que as cloraminas são menos eficazes do que o cloro livre, e por esse motivo, sugerem o uso combinado de cloro e monoclорamina para obter uma maior desinfecção e menos subprodutos (SIMÕES *et al.*, 2013).

As principais vantagens das cloraminas são, efectivamente, a produção de menos subprodutos de desinfecção e a inactivação mais eficaz de bactérias nos biofilmes. As desvantagens são o aumento do risco de anemia para pacientes com hemodiálise renal, aumento da concentração de outros microrganismos (espécies de *Mycobacterium*), presença de subprodutos de azoto e aumento da lixiviação de chumbo na água potável (PULE, 2016).

Outro método convencional de desinfecção faz uso de ozono. Como o ozono é obtido quando uma corrente alternada de alta voltagem é descarregada na presença de oxigénio, recorre-se à instalação de ozonizadores, que através da acção de corrente eléctrica transformam o O₂ em O₃.

O ozono inactiva os microrganismos pela produção de radicais livres hidroxilo e superóxido, o que afecta a permeabilidade da membrana celular, a actividade enzimática e o DNA das células das bactérias. O ozono reage rapidamente, portanto a inactivação pode ocorrer tanto por acção do ozono gasoso, como do ozono dissolvido (KIM *et al.*, 2002). Para sistemas das redes prediais recomenda-se que no ponto de injeção se atinjam concentrações de ozono de 1 a 2 mg/L, o que leva a uma redução de *Legionella* de 5 ciclos logarítmicos (DIEGUES *et al.*, 2013).

A eficácia da desinfecção por ozono não é afectada significativamente pelo pH, nem pela temperatura (KIM *et al.*, 2002) e não ocorre interacção com a amónia. Contudo, a presença de sólidos em suspensão pode reduzir a eficácia desta desinfecção (PULE, 2016).

Segundo Diegues e colaboradores o ozono é um oxidante extremamente activo e eficaz para eliminar a *Legionella*, porque a inactiva instantaneamente, contudo tem um período de vida curto e decompõe-se de novo em oxigénio, pelo que Blanc e colaboradores referem que, embora o ozono seja um oxidante muito mais forte do que o cloro, não é eficiente o suficiente para controlar *Legionella* em sistemas de água quando usado sozinho (BLANC *et al.*, 2005, DIEGUES *et al.*, 2013).

Como o ozono não permanece na água tempo suficiente para proporcionar um efeito residual contra a potencial contaminação no sistema de distribuição, pode ser usado como o desinfectante primário seguido de cloração (KIM *et al.*, 2002). A principal vantagem do ozono é que produz relativamente poucos subprodutos de desinfecção e não deixa sabor e nem odor, contudo a reacção de ozono com iões brometo produz bromato, que é um agente mutagénico e com potencial cancerígeno (SIMÕES *et al.*, 2013). Outros subprodutos que resultam do tratamento com ozono são aldeídos, bromofórmio e ácidos acéticos bromados. Além de ser um método mais caro do que a cloração, a principal desvantagem é, como referido anteriormente, a falta de acção como desinfectante residual no sistema de distribuição (KIM *et al.*, 2002, BLANC *et al.*, 2005).

5.3 Métodos alternativos

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos alguns métodos alternativos para a desinfecção de sistemas de água, nomeadamente desinfecção electroquímica, processos foto-catalíticos e processo de Fenton.

A desinfecção electroquímica é um conceito relativamente novo nas tecnologias de desinfecção e é considerada uma das alternativas ao cloro mais promissoras. É considerada uma tecnologia robusta, económica e amiga do ambiente (HUSSAIN, *et al.*, 2014), porque permite obter acção desinfectante tanto primária como residual. Este método não envolve a adição directa de substâncias químicas na água, e resulta da aplicação de uma corrente de baixa tensão que é direccionada através de eléctrodos, e que

leva à formação de agentes oxidantes como cloro livre, dióxido de cloro, peróxido de hidrogénio, ozono e outros agentes oxidantes de curta duração. A desinfecção residual resulta da transmissão da energia reactiva dos oxidantes, que se mantêm na água por algum tempo (PULE, 2016).

A eficácia de inactivação da desinfecção electroquímica depende sobretudo da configuração e do material do eléctrodo, da composição electrolítica, dos microrganismos presentes, das condições de transferência de massa e de outros parâmetros, como o caudal de água e a intensidade da corrente (HUSSAIN *et al.*, 2014). A presença de cloreto no electrólito aumenta a eficácia da inactivação das células porque dá origem a espécies de cloro com acção germicida, no entanto, os sistemas electroquímicos, que geram quantidades excessivas de espécies de cloro, têm as mesmas desvantagens que a desinfecção com cloro (PULE, 2016).

Ainda está em aberto a hipótese de os sistemas electroquímicos poderem vir a substituir a desinfecção por cloro. As pesquisas relativas à produção de subprodutos da desinfecção electroquímica na água tratada revelam uma redução de mais de 50% nos THM totais, o que poderá ser a principal vantagem deste tipo de desinfecção. Outras vantagens incluem o facto de se evitar o transporte e armazenamento de produtos químicos perigosos usados em métodos de desinfecção à base de cloro ou outros compostos químicos (HUSSAIN, *et al.*, 2014), o que torna a desinfecção electroquímica um processo mais ecológico. Contudo, os custos elevados dos sistemas electroquímicos e altas tensões celulares associadas à condutividade relativamente baixa da água submetida a tratamento também podem ser barreiras para a sua implementação (HUSSAIN, *et al.*, 2014). Os processos electroquímicos são referenciados como eficazes para a desinfecção, no entanto, as bactérias do biofilme são extremamente resistentes a este tipo de desinfecção, portanto, pode não ser possível conseguir a eliminação completa de bactérias de *Legionella*, o que vai ao encontro dos resultados publicados para outros métodos de desinfecção. Importa referir que os estudos sobre o impacto deste tipo de desinfecção têm sido realizados principalmente à escala laboratorial, pelo que é necessário continuar a avaliar este método e a sua influência quer na *Legionella*, quer nas amebas e biofilmes (PULE, 2016).

Também os processos foto-catalíticos de semicondutores mostraram grande potencial para o tratamento de água sendo também mais económicos e amigos do ambiente, devido à sua baixa toxicidade, estabilidade química e térmica, baixo consumo de energia e baixo custo. O TiO_2 é visto como um dos semicondutores mais adequados para a foto-catálise (CHONG *et al.*, 2010). A foto-catálise requer activação por luz ultravioleta, luz fluorescente ou luz visível (PULE, 2016). Na maioria dos ensaios à escala laboratorial tem sido utilizada luz UV.

A inactivação de microrganismos por TiO_2 deve-se principalmente às espécies reactivas de oxigénio, como radicais hidroxilo, aniões superóxido e peróxido de hidrogénio, produzidos por irradiação com TiO_2 . Como

já foi referido, os radicais hidroxilo causam danos e rupturas nas membranas celulares o que resulta na morte celular (CHONG *et al.*, 2010).

As experiências à escala laboratorial, demonstram que a foto-catálise é eficaz para a inactivação de bactérias, no entanto, o reaparecimento das bactérias pode ocorrer se não for utilizado também um processo final de desinfecção (por exemplo, com adição de cloro ou dióxido de cloro) e se se verificarem na rede de distribuição as condições ambientais óptimas para o crescimento dos microrganismos. A aplicação de foto-catálise para a desinfecção da água de abastecimento ainda está em investigação, especialmente a foto-catálise induzida por luz visível, que seria menos dispendiosa do que a conduzida por luz UV (PULE, 2016).

A principal barreira para a aplicação da desinfecção foto-catalítica é o facto da actividade foto-catalítica ser uma cinética lenta. Valores elevados de turvação, presença de compostos orgânicos e inorgânicos também podem reduzir a eficiência deste método de desinfecção (CHONG *et al.*, 2010).

A reacção de Fenton é um processo de oxidação avançado, baseado em processos físico-químicos que dão origem e utilizam espécies químicas transitórias com um potencial oxidante muito alto, como o radical hidroxilo. O reagente de Fenton é formado a partir de ferro e de peróxido de hidrogénio, não envolvendo esta reacção nenhum tipo de radiação. Os iões de ferro decompõem o peróxido de hidrogénio e dão origem à formação de radicais hidroxilo (GOSSELIN *et al.*, 2013). O processo de produção de radicais hidroxilo pela reacção de Fenton é muito sensível ao pH, à razão ferro/peróxido de hidrogénio e à concentração de iões Fe^{2+} . A reacção de Fenton é eficaz para condições ácidas, com pH óptimo de 3 a 4 e a sua eficácia diminui rapidamente a um pH superior a 5 (GOSSELIN *et al.*, 2013). A presença de carbonatos, fosfatos, sulfatos e iões de cloro também pode afectar o desempenho ao diminuir a taxa de reacção e diminuir a eficiência de consumo de peróxido de hidrogénio (CHONG *et al.*, 2010).

Ao contrário dos métodos de desinfecção anteriormente descritos, o processo de Fenton é eficaz para a inactivação de bactérias de biofilme, especialmente nos casos em que os biofilmes se desenvolvem em áreas com corrosão, isto é, quando há uma grande quantidade de ferro disponível. Em tais condições, é possível uma inactivação rápida mesmo a pH 5 (GOSSELIN *et al.*, 2013). Outra vantagem em relação aos desinfectantes à base de cloro é a prevenção do reaparecimento de bactérias, sem formação de subprodutos indesejáveis ou prejudiciais. Os produtos químicos envolvidos no processo de Fenton são facilmente manipuláveis, não são tóxicos nem nocivos para o meio ambiente (GOSSELIN *et al.*, 2013) e são económicos. Outra vantagem do processo de Fenton é que não é necessário fornecer energia para activar o peróxido de hidrogénio, porque a reacção é possível à pressão e temperatura ambiente. As desvantagens são a necessidade de condições ácidas e a formação de grandes quantidades de resíduos de ferro (CHONG *et al.*, 2010).

Este processo de Fenton pode ser acelerado na presença de uma fonte de luz, reacção de foto-Fenton, o que leva à rápida decomposição do peróxido de hidrogénio e formação de radicais. Quando uma fonte de luz está presente, a taxa de reacção de foto-Fenton é aumentada principalmente devido ao efeito fotoquímico da luz na regeneração dos iões de Fe^{2+} e dos radicais hidroxilo no sistema (CHONG *et al.*, 2010).

Em resumo, os métodos convencionais de desinfecção são utilizados no tratamento da água há anos, no entanto, apresentam algumas desvantagens, como a produção de subprodutos indesejáveis e a ineficácia em alguns casos, para eliminação particular de *Legionella* nos sistemas de abastecimento, o que requer pesquisa e desenvolvimento de métodos alternativos. O principal desafio é a necessidade de inactivar bactérias presentes em biofilmes, que são mais resistentes aos desinfectantes do que bactérias livres. Os processos avançados de oxidação (por exemplo, foto-catálise, Fenton e processos semelhantes a Fenton) mostraram resultados promissores, embora até ao momento, a maioria dos estudos terem sido realizados à escala laboratorial, sendo necessário avaliar o seu desempenho noutras escalas, a longo prazo e combinando diferentes métodos.

6. Métodos de análise de *Legionella*

A análise microbiológica permite aos investigadores identificar e relacionar epidemiologicamente os casos de Doença dos Legionários com uma fonte ambiental. É importante, sempre que possível, que o teste de confirmação seja realizado, idealmente em laboratórios de Referência ou Acreditados com experiência na detecção de *Legionella*, para garantir elevado nível de confiança. Existem muitos métodos de detecção e muitas variações de cada método, mas existem essencialmente quatro tipos de metodologias microbiológicas que podem ser aplicadas para detectar e identificar *Legionella*. A saber: culturais, com base em anticorpos, com base em DNA e fluorescência. A escolha da técnica a utilizar, baseia-se no tipo de amostra e na sua disponibilidade, bem como na experiência e preferências adicionais que podem ser orientadas pela necessidade de cumprir requisitos legais, de regulamentação ou de qualidade. Contudo, a técnica preferencial continua a ser a cultural, que além de confirmar a presença de *Legionella* numa amostra, também permite obter material celular para fazer uma análise mais detalhada e para identificação ao nível da estirpe se necessário (ECDC^a).

6.1 Métodos Normalizados

A identificação de métodos de análise começa pela consulta de referenciais normativos nas entidades de normalização, como *International Organization for Standardization* e *American Society for Testing and Materials*, ou mesmo *Health Protection Agency*, actualmente designada *Public Health England*, a *Deutsches Institut für Normung* (Instituto de Normalização da Alemanha), *Association Française de Normalisation* e *International Accreditation New Zealand*.

Foram identificadas duas normas para análise de *Legionella*, a ISO 11731 *Water quality -- Enumeration of Legionella* e ISO/TS 12869 *Water quality -- Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)*.

A ISO 11731:2017 substitui as ISO 11731:1998 e ISO 11731-2:2004 e descreve o método cultural de detecção de *Legionella*.

O meio de cultura utilizado pela metodologia descrita nesta Norma é o meio de extracto de levedura com carvão tamponado e a este meio podem ser adicionados agentes selectivos. O período de incubação é de 7 a 10 dias, a 36°C. Para aplicação deste método, as amostras podem ser concentradas por filtração e caso seja expectável que apresentem elevada concentração de microrganismos interferentes, as amostras podem ser sujeitas a pré-tratamento térmico e ácido. Após o período de incubação, as placas são analisadas à lupa e as colónias suspeitas de *Legionella* são sujeitas a confirmação, por crescimento em

meio sem cisteína. Este aminoácido é essencial para o crescimento de *Legionella*, pelo que as colónias que não crescerem na sua ausência são consideradas *Legionella* spp..

Para identificação de *Legionella pneumophila*, devem ser efectuados teste complementares, como por exemplo o teste de aglutinação de latex. Este teste é composto por partículas azuis de látex, sensibilizadas com anticorpos que aglutinam na presença de antígenos específicos da parede celular da *Legionella*, formando agregados visíveis a olho nu. Este teste permite identificar *L. pneumophila* serogrupo 1, *L. pneumophila* serogrupos 2 a 14, e *Legionella* spp. não *pneumophila*. O método cultural é descrito em pormenor no capítulo seguinte desta tese.

A ISO/TS 12869:2012 foi elaborada com base na Norma Francesa NF T90-471 de 2006 - *Qualité de l'eau - Détection et quantification des Legionella et/ou Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)*, que tinha sido anulada em 2010, passando a *Qualité de l'eau - Détection et quantification des Legionella et/ou Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT - PCR)*.

Este método envolve a amplificação de DNA a partir de *primer's* específicos para o DNA alvo ou de interesse. Há uma grande quantidade de métodos publicados e *kits* disponíveis comercialmente capazes de identificar *Legionella* usando a técnica de PCR. Uma vantagem do PCR é que é rápido e as amostras podem ser analisadas em poucas horas para detectar a presença de *Legionella*. O PCR pode ser optimizado para amplificar um único alvo ou múltiplos alvos e com a abordagem de alvo múltiplo é possível identificar várias espécies. O PCR também pode ser desenvolvido para se quantificar a bactéria. Actualmente esta técnica é muito utilizada em microbiologia e na biologia molecular, como tal, tornou-se tecnicamente mais fácil e mais acessível, embora do ponto de vista técnico não seja tão simples quanto o método cultural (ECDC^b).

6.2 Outros métodos de análise

Existe uma variedade de métodos que se baseiam na detecção de antígenos específicos presentes na parede celular das diferentes espécies de *Legionella*. Alguns destes estão disponíveis comercialmente, outros são métodos internos dos laboratórios. Estes métodos incluem técnicas de imunofluorescência directa, imunofluorescência indirecta, imunodifusão e aglutinação. Alguns são aplicáveis directamente a amostras ambientais, outros requerem crescimento prévio em cultura (ECDC^b).

Alguns destes métodos disponíveis no mercado, que permitem proceder à pesquisa e quantificação de *Legionella* em amostras de água, são desenvolvidos pelas próprias marcas comerciais, por exemplo o Legipid® desenvolvido pela Biótica®.

O Legipid® *Legionella* Fast Detection é um método rápido, que permite detectar e quantificar *Legionella* spp. em amostras de água em apenas uma hora. A análise baseia-se em técnicas de ligação das partículas imunomagnéticas e do ensaio imunoenzimático para a detecção e quantificação de microorganismos. Esta técnica é designada CEIA do inglês *Immunomagnetic Capture and Enzyme Immunoassay*. O alvo microbiano é capturado pelas partículas imunomagnéticas (figura 4) e separado do resto da amostra de água para ser analisado por ensaio imunoenzimático (TECNILAB). A interpretação de resultados pode ser semi-quantitativa, utilizando a carta de cores que acompanha o *kit* ou pode ser quantitativa, no caso de se utilizar um leitor óptico. A determinação através da leitura óptica permite um Limite de Detecção de 40 ufc/volume e um Limite de Quantificação de 60 ufc/volume. Este teste Legipid® está validado pelo *Association of Official Agricultural Chemists Research Institute pelo Performance Tested Method Program* para água potável, natural e industrial (TECNILAB, ALBALAT *et al.*, 2014).

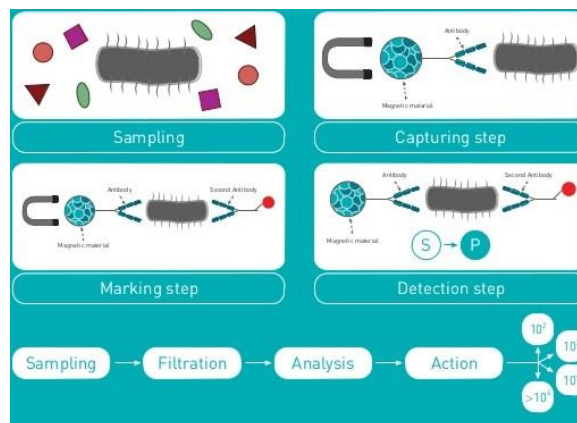


Figura 4 - Esquema simplificado da análise por Legipid® (adaptado de LEGIPID)

Outros métodos disponíveis no mercado baseiam-se na detecção de enzimas, como por exemplo o sistema bioquímico Legiolert™ desenvolvido pela Idexx (figura 5). O Legiolert™ baseia-se na tecnologia de detecção enzimática para identificação de microorganismos. A presença de *Legionella pneumophila* é identificada pela utilização do substrato presente no reagente do Legiolert™. O período de incubação é de 7 dias e não requer quaisquer passos de confirmação (IDEXX). Quando ocorre crescimento de bactérias de *Legionella pneumophila* o substrato muda de cor e adquire uma tonalidade castanha. A quantificação através deste método apresenta um resultado em Número Mais Provável (NMP)/volume. Este método é adequado a amostras de água e dispõe de dois protocolos distintos, um para águas potáveis para análise de volumes de 10 ou 100 mL de amostra com incubação a 39 ± 0.5 °C, e outro para águas não potáveis para análise de volumes de 0.1 ou 1.0 mL de amostra e incubação a 37 ± 0.5 °C (IDEXX, RECH *et al.*, 2018).

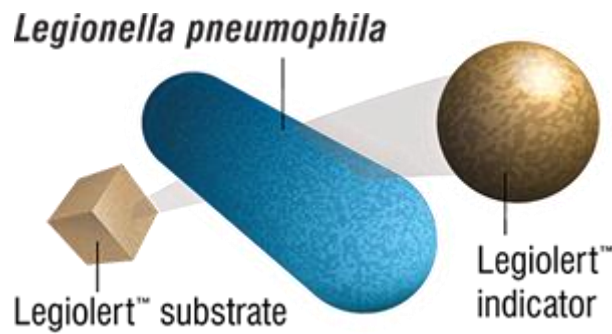


Figura 5 - Identificação de *Legionella pneumophila* pelo método Legiolert™ (fonte: IDEXX)

No entanto, se por um lado o Legipid® só tem capacidade para identificar *Legionella* spp., ou seja identificação ao nível do género sem identificar a espécie, por outro lado, o Legiolert™ detecta apenas *Legionella pneumophila*, sem identificar outras espécies do mesmo género.

A espectrometria de massa (MS) em especial a metodologia MALDI-TOF, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*, tem sido amplamente utilizada para identificação de *Legionella*, também WCMS do inglês *Whole Cell MALDI-TOF-MS*, tem sido estudado para aplicação a amostras ambientais, no entanto esta técnica é utilizada apenas na confirmação das colónias que crescem em cultura (BISWAS *et al.*, 2013; GAIA *et al.*, 2011, TRNKOVA *et al.*, 2018).

Existem na literatura vários estudos e ensaios de comparação dos métodos aqui descritos, todos apresentam vantagens e desvantagens, e todos têm as suas limitações, quer do ponto de vista técnico, quer por imperativos legais, pelo que até ao momento o método cultural continua a ser o método de referência.

É importante referir que a detecção de *Legionella* numa amostra ambiental não permite por si só identificar o local a partir do qual determinado surto teve origem. No entanto, permite eliminar de forma razoavelmente rápida pontos de origem suspeitos da investigação, se para as respectivas amostras forem obtidos resultados negativos. Contudo, se uma amostra ambiental apresenta *Legionella* então, esta pode ser comparada com a *Legionella* encontrada numa amostra clínica de um paciente envolvido num surto, o que poderá evidenciar a origem desse surto (ECDC^a).

7. Implementação do método de análise

7.1 Elaboração do Procedimento Técnico

O procedimento técnico (PT mic – Detecção e enumeração de *Legionella* – Anexo B) foi elaborado segundo a Norma ISO 11731. O laboratório iniciou a pesquisa e quantificação de *Legionella* no ano de 2015. Entre 2015 e 2017 as amostras foram analisadas de acordo com a Norma ISO 11731:1998, pelo que as amostras, concentradas ou não, foram analisadas por espalhamento em placa. Em 2017 foi publicada a revisão da Norma.

A Norma ISO 11731:2017 prevê uma abordagem diferente no tratamento e preparação da amostra, que separa as amostras consoante a metodologia de análise aplicada. Assim, o procedimento foi dividido por métodos diferentes consoante as amostras, a concentração de microrganismos interferentes presentes na amostra e o limite de detecção (LD) pretendido. A amostra pode ser analisada directamente por espalhamento (Directa), filtrada por membrana (FM), filtrada por membrana com eluição (FME) ou ainda diluída (Diluída). À amostra a analisar podem ser aplicados pré-tratamentos antes da sementeira, de forma a reduzir a concentração de microrganismos interferentes, nomeadamente, tratamento térmico, tratamento ácido ou tratamentos térmico e ácido combinados. Após a sementeira em placa de meio não selectivo de Extracto de Levedura com Carvão Tamponado, (*Buffered Charcoal Yeast Extract* (BCYE)) ou de meio selectivo BCYE com adição de Glicina, Vancomicina, Polimixina B e Cicloheximida (GVPC) e incubação, as placas são analisadas à lupa para identificação de colónias características. Para confirmação de colónias presuntivas de *Legionella* é efectuado o crescimento em meio de cultura com e sem L-cisteína. Às colónias que não crescem na ausência deste aminoácido é realizado o teste de confirmação complementar de aglutinação. Este teste permite identificar *Legionella pneumophila* serogrupo 1, *Legionella pneumophila* serogrupos (2-14) e *Legionella* spp.

A Norma refere a utilização de meio de cultura selectivo BCYE+AB para amostras com baixa concentração de interferentes, este meio é BCYE com adição de suplemento de três antibióticos Polimixina B, Piramicina e Cefazolina, no entanto no desenvolvimento deste procedimento os meios de crescimento utilizados foram apenas BCYE e GVPC. Os meios de cultura e soluções utilizadas estão descritos em pormenor na tabela 7.

Equipamentos e Materiais

- Estufa de incubação de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$:
Marca: Memmert, modelo: B50.
- Câmara de UV 360 ± 20 nm:
Marca: Ficher Bioblock Scientific, modelo: BP111 e lâmpada: VL-6L de 6W 365 nm.
- Rampa e bomba de filtração:
Marca: Millipore™, modelo: EZ Stream.
- Filtros de membrana:
 - Para concentração seguida de Eluição: membrana de *polyethersulfone* (PES), diâmetro 47 mm e poro $0,2 \mu\text{m}$ (Marca Millipore™, referência GPWP04700)
 - Para cultura directa do filtro de membrana: membrana de mistura de ésteres de celulose, *Mixed Cellulose Esters* (MCE), diâmetro 47 mm e poro $0,45 \mu\text{m}$ (Marca Millipore™, referência EZHAWG474).
- Agitador *Vortex*:
Marca: Heidolph, modelo: Reax Top.
- Banho de água de $50\pm 1^{\circ}\text{C}$:
Marca: Memmert, modelo: WNB14.
- Lupa de amplificação de 4x com luz oblíqua:
Marca: VWR, modelo: Visioscope STB250.
- Micropipeta 20-200 μL :
Marca: Brand, modelo: Transferpette S.
- Material esterilizado de uso corrente como esferas de vidro, frascos de 100 mL, espalhadores, tubos de 1,5 mL e ansas.

Meios de Culturas, soluções e reagentes

Os meios de cultura e reagentes estão descritos pormenorizadamente na tabela 5.

- Meio BCYE
- Meio GVPC
- Meio BCYE-Cys
- Solução diluente: *Page's saline*
- Solução tampão ácido
- Teste de aglutinação de Latex

Preparar os meios de cultura conforme indicação do fabricante. Secar antecipadamente as placas dos meios a usar. De acordo com a norma ISO 11133:2014 podem deixar-se as placas a secar semi abertas na estufa entre $25-50^{\circ}\text{C}$, apenas o tempo necessário para secar todas as gotículas. Podem também deixar-se na câmara de fluxo laminar 30-60 min, ou deixar-se as placas fora do frigorífico, invertidas, de um dia para o outro.

A tabela 5 resume os meios de cultura utilizados neste procedimento, bem como as principais características e as condições de conservação.

Tabela 5 - Tabela de resumo dos meios de cultura e reagentes, condições de conservação e modo de acção, quando aplicável

| | Condições de conservação do meio/reagente | |
|---|--|---|
| SOLUÇÃO DE DILUIÇÃO | (5 ± 3) °C, no escuro 6 meses | |
| Diluyente: Sol. Salina de Page | | |
| MODO DE ACÇÃO: A solução salina de Page é recomendada para a concentração de bactérias por filtração, incluindo <i>Legionella</i> . | | |
| SOLUÇÃO DE TRATAMENTO ÁCIDO | Temp. ambiente, 1 mês | pH 2,2±0.2 |
| Sol. Tampão Ácido | | |
| A solução ácida preparada com 3.9 mL de solução A (sol. HCl 0.2M) + 25 mL de solução B (sol. KCl 0.2M), acerto de pH com solução KOH 1M. Solução A: HCl 0.2 M – 17.4 mL HCL (ρ=1.184, 37%) ou 20 mL HCl (ρ=1.16, 31.5%) em 1000 mL água Solução B: KCl 0.2M – 14.9 g KCl em 1000 mL água. | | |
| MEIO DE CRESCIMENTO | (5 ± 3) °C, no escuro 3 meses | Marca Oxoid, referência CM0655; Suplemento: SR0110 |
| Meio BCYE | | |
| MODO DE ACÇÃO: O meio de BCYE é baseado na fórmula de Edelstein e está em conformidade com a norma ISO 11731. O carvão activado decompõe o peróxido de hidrogénio, liga o dióxido de carbono, altera a tensão superficial e remove os produtos metabólicos tóxicos. O extracto de levedura fornece proteínas e vitaminas para o crescimento bacteriano. O tampão ACES/hidróxido de potássio estabiliza o pH do meio e a presença de L-cisteína, de pirofosfato de ferro (III) e do α-cetoglutarato favorecem o crescimento de espécies de <i>Legionella</i> e fornecem factores de crescimento essenciais. | | |
| MEIO DE CRESCIMENTO SELECTIVO | (5 ± 3) °C, no escuro 1 mês | Marca Oxoid, referência CM0655; Suplemento: SR0110 e SR 0152 |
| Meio GVPC | | |
| MODO DE ACÇÃO: O meio de GVPC é preparado como o meio BCYE mas com a adição de agentes selectivos. nomeadamente a Glicina e os antibióticos Vancomicina, Polimixina B e Cicloheximida. A Glicina e a Polimixina B para inibição da flora secundária de Gram negativas, a Vancomicina para inibição de bactérias Gram positivas e a Cicloheximida para inibição de fungos. | | |
| MEIO DE CONFIRMAÇÃO | (5 ± 3) °C, no escuro 3 meses | Marca Oxoid, referência CM0655; Suplemento: SR0175 |
| Meio BCYE-Cys | | |
| MODO DE ACÇÃO: O meio de BCYE-Cys é preparado como o meio BCYE, mas sem L-cisteína, pelo que este meio, combinado com BCYE é utilizado para confirmação de <i>Legionella</i> spp. presuntiva, uma vez que as espécies de <i>Legionella</i> crescem em meio BCYE mas não conseguem crescer na ausência de L-cisteína. | | |
| MEIO DE CONFIRMAÇÃO ALTERNATIVO | (5 ± 3) °C, no escuro 6 meses frasco, 1 mês em placa | |
| Meio <i>Trypto-casein Soy Agar</i> ou Nutriente Agar | | |
| MODO DE ACÇÃO: Uma vez que as espécies de <i>Legionella</i> não conseguem crescer na ausência de L-cisteína, os meios <i>Trypto-casein Soy Agar</i> e Nutriente Agar não contendo este aminoácido permitem proceder à confirmação deste género. | | |
| TESTE DE CONFIRMAÇÃO-REAGENTE SEROLÓGICO | (5 ± 3) °C, | Marca Oxoid, referência DR0800 |
| Aglutinação <i>Legionella</i> Latex Test | | |
| MODO DE ACÇÃO: O <i>Legionella Latex Test</i> utiliza partículas de látex azul com anticorpos imobilizados que aglutinam na presença de antigénios específicos da parede celular de <i>Legionella</i> e formam aglomerados visíveis. Este teste permite identificar <i>L. pneumophila</i> serogrupo 1, serogrupo 2 a 14 e outras espécies de <i>Legionella</i> não <i>pneumophila</i> . | | |

I. Amostragem

A colheita da amostra deve ser realizada de acordo com o Procedimento Auxiliar de Microbiologia (PAM) 19 – Colheita para análise de *Legionella* (Anexo C.1). As amostras devem ser transportadas protegidas de calor e da luz solar e a menos de 18°C, mas a uma temperatura superior a 6°C. Devem ser entregues no laboratório tão rápido quanto possível, o que não deve exceder os dois dias.

II. Selecção do método a aplicar

Como já foi referido, devido à natureza complexa das diferentes matrizes de amostras, como por exemplo águas provenientes de torres de refrigeração ou de águas residuais, o laboratório deve determinar o método apropriado a cada tipo de amostra. Se for expectável que a concentração de *Legionella* seja superior a 10⁴ ufc/L, pode proceder-se à sementeira directamente com a amostra sem ser concentrada (método directo). As amostras extremamente contaminadas devem ser diluídas e inoculadas com e sem tratamento prévio (método diluído).

Para garantir a detecção de *Legionella* em amostras de água será necessário na maioria dos casos concentrar a amostra por filtração em membrana, e quando não é conhecido o grau de contaminação da amostra, em geral, deve aplicar-se a técnica de concentração da amostra por filtração em membrana (figuras 6 e 7). A técnica de filtração em membrana pode ser seguida de colocação directa do filtro em placa contendo meio de cultura ou pode ser seguida de eluição.



Figura 6 - Diferentes membranas utilizadas na técnica de filtração, à esquerda membrana de MCE ao centro membrana PES



Figura 7 - Método de filtração por membrana

- Descrição do método de filtração em membrana (FM) e colocação direta do filtro em placa:

Filtrar um volume de amostra (sem tratamento, depois de tratamento ácido, e se necessário, depois de tratamento térmico) através da membrana MCE de 0,45 μm . O tratamento ácido também pode ser aplicado directamente na membrana. Remover cuidadosamente a membrana e colocar na placa de meio de cultura, com a face virada para cima e sem deixar bolhas de ar entre a membrana e o meio (figura 8).

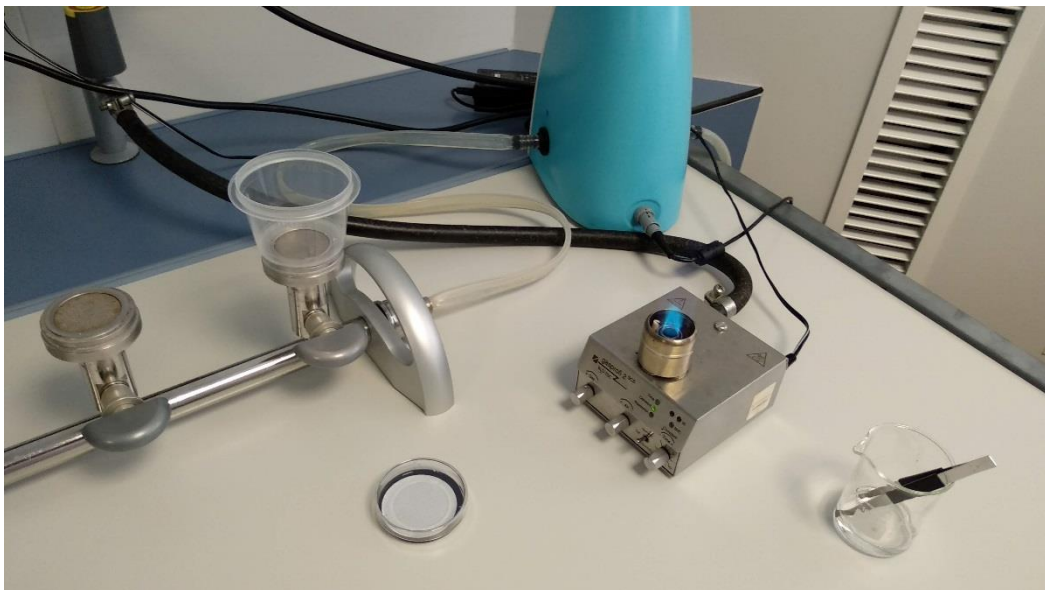


Figura 8 - Concentração da amostra pelo método FM

- Descrição do método de filtração em membrana e eluição (FME) - concentração da amostra:

Filtrar um volume de amostra através da membrana de PES de 0.2 μm . Remover a membrana cuidadosamente, evitar perder o eventual depósito de resíduo e colocar a membrana com a face virada para baixo num frasco estéril com esferas de vidro. Adicionar 10 mL de diluente ou amostra, agitar vigorosamente, pelo menos durante dois minutos (figura 9). Este concentrado representa a amostra preparada, que deve ser inoculado, sem tratamento, com tratamento ácido e com tratamento térmico.



Figura 9 - Concentração da amostra pelo método FME

III. Pré-tratamento da amostra

- Para o tratamento térmico da amostra, colocar 1 mL de amostra num tubo esterilizado e incubar no banho de água a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ (figura 10) durante 30 ± 2 minutos.



Figura 10 - Tratamento térmico da amostra

- No tratamento ácido diluir um volume de amostra em nove de solução tampão ácido, habitualmente 1 em 9 mL, agitar bem e deixar em repouso 5 ± 0.5 minutos (figura 11).

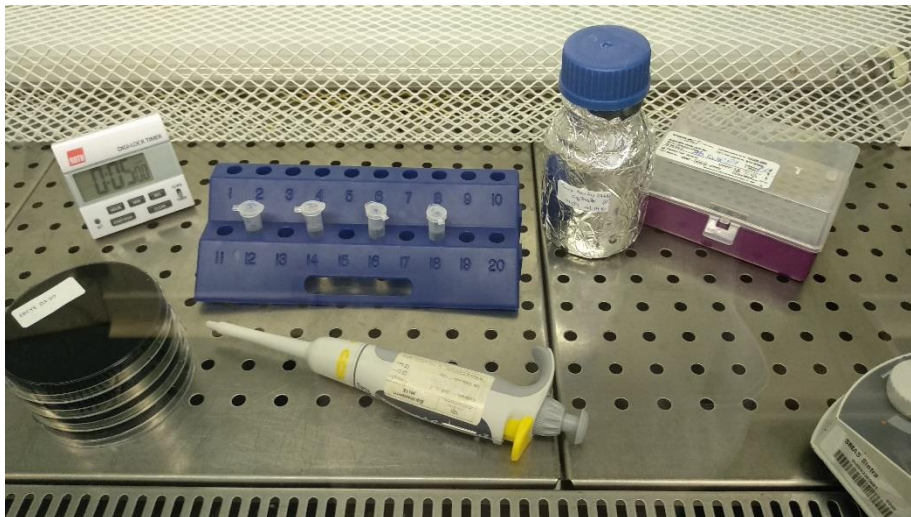


Figura 11 - Tratamento ácido da amostra

O tratamento ácido pode ser aplicado directamente na membrana de filtração, para tal, adicionar cerca de 30 mL de solução ácida na rampa de filtração e deixar durante 5 ± 0.5 minutos, remover o ácido por filtração e lavar a membrana com pelo menos 20 mL de diluente.

IV. Cultura

A escolha da metodologia de cultura depende da origem e das características da amostra, bem como do motivo da análise e do limite de detecção pretendido. Assim:

a) cultura de amostras com elevada concentração de *Legionella* ($>10^4$ ufc/L) e baixa concentração de microrganismos interferentes: inocular por espalhamento 0.1 mL de amostra directa nas placas de meio BCYE e GVPC.

b) cultura de amostras com baixa concentração de *Legionella* e baixa concentração de microrganismos interferentes:

b.1) cultura do filtro de membrana em placa: filtrar a amostra e colocar a membrana directamente em placa de meio BCYE. Quando aplicado tratamento ácido no filtro de membrana, este deve ser colocado em placa de meio GVPC.

b. 2) cultura do filtro de membrana com eluição: inocular por espalhamento 0.1 mL de cada toma do concentrado da amostra, sem tratamento, com tratamento ácido e com tratamento térmico, em placa de BCYE e GVPC.

c) cultura de amostras com elevada concentração de microrganismos interferentes: separar a amostra, directa, concentrada ou diluída (1:10), em três porções, uma sem tratamento, outra com tratamento térmico e outra com tratamento ácido e inocular por espalhamento 0.1 mL em placa de meio GVPC (figura 12).



Figura 12 - Inoculação de uma amostra concentrada (FME) por espalhamento

d) Cultura de amostras com concentração extremamente elevada de microrganismos interferentes: Inocular as amostras directa e diluída (1:10 e 1:100) após o pré-tratamento térmico e ácido combinados,

isto é, efectuar primeiro o tratamento térmico tal como descrito anteriormente, arrefecer até à temperatura ambiente e efectuar o tratamento ácido. Preparar as diluições após o tratamento ácido com o diluente. Inocular por espalhamento 0.1 mL de cada toma (10^0 , 10^{-1} e 10^{-2}) em placa de meio GVPC.

V. Incubação das placas

Deixar as placas em repouso até à absorção completa do inóculo. Inverter as placas e incubar na estufa de $36\pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 a 10 dias. Prevenir a desidratação das placas, criando uma atmosfera húmida, por exemplo, colocando as placas a incubar em recipiente fechado.

VI. Leitura das placas

Analisar as placas pela primeira vez no dia 2, 3, 4 ou 5, e posteriormente no fim do período de incubação. O resultado final só pode ser determinado findo o período de incubação. Como o crescimento de *Legionella* é lento, é recomendável analisar as placas à lupa (figura 13). Registrar o número de cada tipo de colónias características de *Legionella*. As colónias características de *Legionella* são geralmente brancas acinzentadas, mas podem aparecer com outras cores. São lisas, de bordos inteiros e têm a característica de aparência de “vidro-moído”.

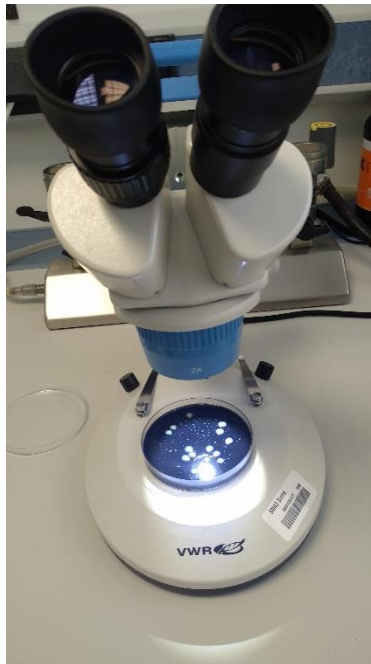


Figura 13 - Leitura de placa de GVPC à lupa

Quando observadas sob lâmpada de luz ultravioleta, algumas espécies de *Legionella* apresentam autofluorescência (figura 14), a cor da fluorescência pode ajudar a distinguir colônias de diferentes espécies de *Legionella*, que possam estar presentes. As placas devem ser observadas à lâmpada UV pelo tempo mínimo possível. É importante salientar que novas espécies de *Legionella* podem apresentar características diferentes das descritas anteriormente.

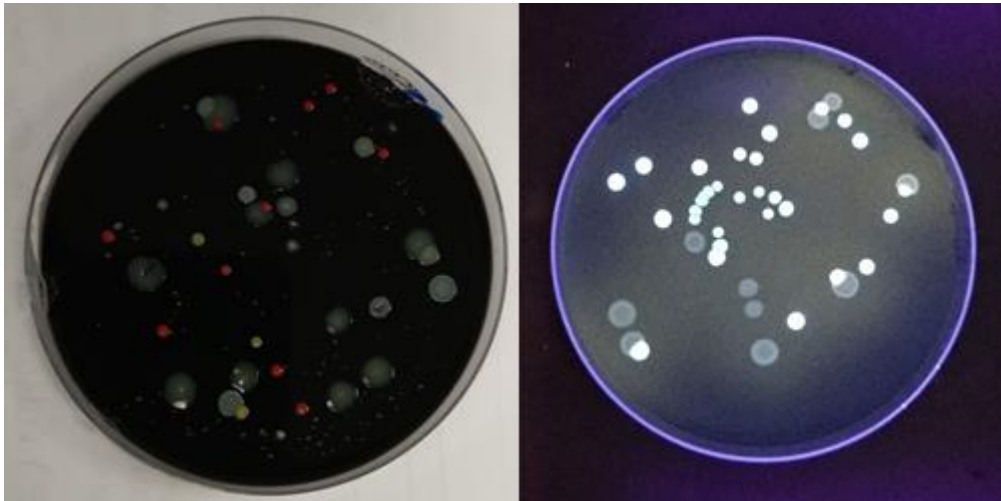


Figura 14 - Leitura das placas. À direita observação da fluorescência da *Legionella anisa*.

VII. Confirmação das colônias presuntivas em placas de meio BCYE e meio BCYE sem cisteína (BCYE-Cys)

Repicar as colônias características da placa que apresentar maior contagem de colônias presuntivas por volume de água. Quando só existir um tipo de colônias presuntivas, repicar três colônias. Se existirem mais do que um tipo de colônias, retirar pelo menos uma colônia de cada tipo. Repicar as colônias presuntivas, tendo o cuidado de não arrastar meio de cultura da placa inicial e inocular primeiro em placa de meio BCYE-Cys e de seguida em placa de BCYE.

Incubar na estufa de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 a 5 dias. Considerar como *Legionella* spp. as colônias que crescerem em BCYE, mas que não apresentem crescimento no meio sem cisteína (figura 15). Se as colônias iniciais não se confirmarem como *Legionella*, analisar as colônias de outras placas, de diferente meio de cultura ou de outro pré-tratamento.

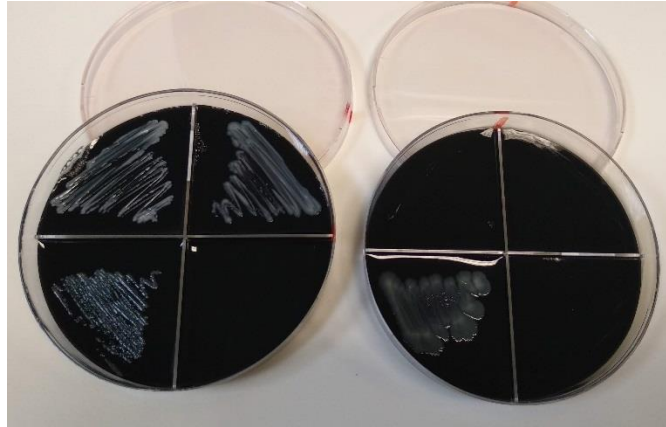


Figura 15 - Confirmação de colónias suspeitas em meios BCYE (à esquerda) e BCYE-Cys (à direita)

VIII. Confirmação das colónias de *Legionella pneumophila*

Nas colónias identificadas como *Legionella* spp. realiza-se o teste serológico de aglutinação (figura 16) para identificação de *Legionella pneumophila* e do serogrupo (1 ou 2 - 14). Este teste é realizado de acordo com as instruções do fabricante.

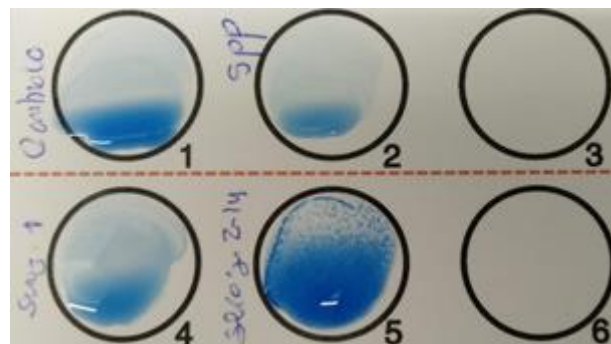


Figura 16 - Teste de aglutinação para confirmação de serogrupo das colónias identificadas como *Legionella* spp.. Na imagem identificação de *Legionella pneumophila* serogrupo 2 a 14.

IX. Expressão de resultados

Para apresentar o resultado em unidades formadoras de colónias de *Legionella* estimado para a amostra, escolher a placa ou placas (desde que do mesmo meio de cultura) que apresentam o maior número de colónias confirmadas por volume de água. Ter em consideração a diluição em causa. Não considerar como réplicas os resultados obtidos por diferentes métodos, tratamentos ou em diferentes meios de cultura. Para calcular o número de ufc de *Legionella* por litro escolher a fórmula adequada na tabela 6.

Se não existirem colónias confirmadas, o resultado é expresso como Não detectado/Volume examinado. O limite de detecção é determinado de acordo com a tabela 6 e em função da técnica aplicada.

Foi elaborado um impresso próprio Im 32 – Legionella – Registo de Resultados (Anexo C.2) para registo de métodos, meios, tratamentos e resultados obtidos.

O Relatório de Ensaio deve explicitar a(s) técnica(s) aplicada(s), o(s) tratamento(s), o(s) meio(s) de cultura e o volume máximo usado na análise. Deve também apresentar a identificação da amostra para que não suscite dúvidas: morada, local exacto da colheita, técnica de amostragem usada, tipo de amostra, temperatura da amostra durante a colheita e concentração do biocida na amostra.

A tabela 6 resume os diferentes métodos de cultura bem como o LD, as vantagens e desvantagens de cada um.

Tabela 6 - Tabela resumo dos métodos de cultura, com respectiva fórmula de cálculo, limite de detecção, vantagens () e desvantagens ()

| | | |
|---|--|---|
| <i>Cultura directa da amostra (Método Directo):</i> | | |
| $N_{ufc} = \frac{n}{V_t} \times V_r$ | Ex. volume inoculado 0.1 mL: LD: 10000 ufc/L | <input checked="" type="checkbox"/> Contagem fácil <input checked="" type="checkbox"/> Elevada recuperação <input type="checkbox"/> Elevado LD |
| <i>Cultura do filtro de membrana em placa (Método FM):</i> | | |
| $N_{ufc} = \frac{n}{V_t} \times V_r$ | Ex. volume filtrado 10 mL: LD: 100 ufc/L | <input checked="" type="checkbox"/> Método fácil <input checked="" type="checkbox"/> Baixo LD <input type="checkbox"/> Influência da membrana <input type="checkbox"/> Contagem difícil devido a interferentes |
| <i>Cultura do filtro de membrana e eluição (Método FME):</i> | | |
| $N_{ufc} = \frac{n \times V_c}{V \times V_t} \times V_r$ | Ex. volume filtrado 500 mL, concentrado preparado com 5 mL de diluente e volume inoculado 0.1mL: LD: 100 ufc/L (caso não ocorra crescimento ou confirmação de colónias no tratamento ácido o LD aumenta 10x, LD: 1000 ufc/L) | <input checked="" type="checkbox"/> Contagem fácil <input checked="" type="checkbox"/> Baixo LD <input type="checkbox"/> Baixa recuperação <input type="checkbox"/> Processo demorado |
| <i>Cultura após diluição da amostra (Método Diluído):</i> | | |
| $N_{ufc} = \frac{n \times V_r}{V_{dil}} \times F$ | Ex. tratamento ácido de 1mL amostra diluída de 1/10 com 9 mL de ácido, e volume inoculado 0.1 mL: LD: 1000000 ufc/L | <input checked="" type="checkbox"/> Contagem fácil <input checked="" type="checkbox"/> Elevada recuperação <input type="checkbox"/> Elevado LD <input type="checkbox"/> Processo demorado |
| Onde: | | |
| $N_{ufc} = \text{número de } Legionella \text{ em } \frac{ufc}{L}$ | | |
| $n = \text{número de colónias} = \frac{\text{colónias positivas}}{\text{colónias confirmadas}} \times \text{total de colónias contadas na placa}$ | | |
| V_t = Volume total analisado, mL | | |
| V_r = Volume de referência (normalmente 1000 mL) | | |
| V_c = Volume final de concentrado, mL | | |
| V = Volume inoculado na placa ou placas do mesmo meio de cultura, mL | | |
| V_{dil} = Volume da diluição inoculado na placa ou placas do mesmo meio de cultura, mL | | |
| F = Factor de Diluição | | |

- Matriz de Decisão

Para decidir qual a metodologia a aplicar a cada tipo de amostra o laboratório recorre à Matriz de Decisão (tabela 7) que se divide em quatro passos:

1º Passo - Tipo de amostra:

Determinar a origem e as características da amostra (normalmente o cliente pode dar esta informação) e enquadrá-la numa das 4 opções:

- ❖ Amostra com baixa concentração de interferentes, por exemplo água de abastecimento:
 - é expectável elevada concentração de *Legionella* – proceder ao método de cultura descrito em iv - a);
 - é expectável baixa concentração de *Legionella* – proceder ao método de cultura descrito em iv - b);
- ❖ Amostra com elevada concentração de interferentes, por exemplo água de torres de refrigeração, camaras de lavagem de ar, águas de processo – proceder ao método de cultura descrito em iv - c);
- ❖ Amostra com concentração extremamente elevada de interferentes ou microrganismos que só sejam removidos por tratamento ácido e térmico combinado, por exemplo água residual – proceder ao método de cultura descrito em iv - d);

2º Passo - Determinar o Limite de Detecção pretendido:

Determinar o Limite de Detecção pretendido e seleccionar um ou mais métodos adequados.

3º Passo - Escolher o pré-tratamento, além do tratamento indicado em cada método de cultura pode ser aplicado outro opcional que se considere adequado.

4º Passo - Escolher o meio de cultura, além do meio de cultura indicado em cada método de cultura pode ser aplicado outro opcional que se considere adequado.

Tabela 7 - Matriz de Decisão para selecção da metodologia a aplicar

| 1º Passo: Matriz/Amostra | | | | | | | | | | |
|--|--------------------------|----------------|---|----------------|------|----------------|---|------|----------------|----------------|
| Amostra com baixa concentração de interferentes Por exemplo água de abastecimento Método de Cultura: a) e b) | | | Amostra com elevada concentração de interferentes Por exemplo água de torres de refrigeração, camaras de lavagem de ar, águas de processo Método de Cultura: c) | | | | Amostra com extremamente elevada concentração de interferentes ^a Por exemplo água residual Método de Cultura: d) | | | |
| 4º Passo: Meio de Cultura | | | | | | | | | | |
| 2º Passo: LD | 3º Passo Pré- tratamento | BCYE | BCYE+AB | GVPC | BCYE | BCYE+AB | GVPC | BCYE | BCYE+AB | GVPC |
| Método Directo LD: Elevado | Sem tratamento | √ | ○ ^x | √ ^x | | ○ | √ | | | |
| | Trat. térmico | ○ | ○ | ○ | | ○ | √ | | | |
| | Trat. ácido | ○ | ○ | ○ | | ○ | √ | | | |
| | Térmico+ácido combinado | | | | | ○ | ○ | | ○ | √ |
| Método Filtração por Membrana (FM) LD: Baixo | Sem tratamento | √ | ○ | ○ | | | | | | |
| | Trat. térmico | ○ | ○ | ○ | | ○ | ○ | | | |
| | Trat. ácido | ○ | √ ^b | | | ○ | ○ | | | |
| Método Filtração por Membrana e Eluição (FME) LD: Baixo | Sem tratamento | √ | √ ^b | | | ○ | √ | | | |
| | Trat. térmico | √ | √ ^b | | | ○ | √ | | | |
| | Trat. ácido | √ | √ ^b | | | ○ | √ | | | |
| Método Diluído LD: Muito Elevado | Sem tratamento | ○ ^c | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^c | √ ^c | | | |
| | Trat. térmico | ○ ^c | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^c | √ ^c | | | |
| | Trat. ácido | ○ ^c | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^c | √ ^c | | | |
| | Térmico+ácido combinado | | | | | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^d | √ ^d |

√ – Obrigatório; ○ – opcional;

a - Para este tipo de amostras é obrigatório proceder à cultura directa e com diluição;

b - Escolher entre os meios BCYE+AB ou GVPC

c - Diluição 1:10

d - Diluição 1:10 e 1:100

x- a Norma ISO 11731:2018 indica como obrigatório a utilização do meio BCYE+AB e não o meio GVPC

X. Controlo de qualidade

Efectuar o controlo de qualidade definido no Procedimento Auxiliar de Microbiologia (PAM) 11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia (Anexo C.3), este procedimento auxiliar descreve o controlo de qualidade a efectuar para esta análise.

Resumidamente:

- Branco (por série de amostras)

Acompanhar cada serie de amostras com uma toma, de água destilada esterilizada, de volume igual ao da amostra analisada.

- Controlo positivo (por série de amostras)

Acompanhar todas as amostras com controlo positivo de *L. pneumophila* e outra espécie de *Legionella*.

- Duplicados (semanal)

Utiliza-se uma amostra que apresente crescimento previsível, contaminada artificialmente ou não, fazendo pelo menos duas tomas iguais de um volume que se considere apropriado. Para efeitos de confirmação, considera-se apenas a amostra cujo número de colónias está compreendido entre 0 e 150. Procede-se a confirmação das colónias de cada tipo, de acordo com o procedimento técnico. Pode também ser efectuado com material de referência e nesse caso não se procede à confirmação.

- Ensaio em paralelo (Trimestral)

Utiliza-se uma amostra contaminada, que é analisada por duas analistas qualificadas nas mesmas condições. Preferencialmente, será realizado com uma água natural contaminada, embora também possa ser realizado uma amostra contaminada artificialmente ou com material de referência.

- Materiais de referência (MR) – Produtividades (Por cada lote de meio de cultura e/ou mensalmente).

A produtividade, de acordo com a Norma e com o PAM 09 – Controlo de qualidade de meios de cultura (Anexo C.4), é determinada pela razão entre o número de colónias obtidas no meio de cultura selectivo e o número de colónias obtidas no meio de cultura não selectivo, que deve ser superior a 50%. Ou pela razão entre o número de colónias obtidas no meio de cultura não selectivo e o lote anterior do mesmo meio que já esteja validado e que deve ser superior a 70%. O laboratório adquire culturas de referência na forma de lentículas ou pastilhas. É preparada uma suspensão de MR de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 e outra de *Legionella anisa* WDCM 00106 que são inoculadas nos meios GVPC e BCYE, para determinação da produtividade do GVPC. Na produtividade do meio BCYE é utilizada apenas a suspensão de *L. pneumophila* e é determinada com um lote anterior do mesmo meio.

7.2 Caracterização das amostras

Embora a Norma ISO 11731:2018 seja aplicável a todas as amostras de água e matrizes relacionadas, é importante identificar e separar os diferentes tipos de amostras. Para tal, o laboratório utilizou como referência o documento IPAC OEC021:2017-06-30 e separou as amostras em cinco tipos de produtos, os quais incluem diferentes matrizes (Tabela 8).

Tabela 7 - Diferentes produtos e matrizes relacionadas de amostras

| Produto | Exemplos de Matrizes | | | |
|-----------------------|----------------------|------------------|--|------------------|
| 1 Consumo | Abastecimento | Naturais | | |
| 2 Piscina | Piscina | Jacuzzi | | |
| 3 Residual | Efluente | Efluente tratado | Ecoágua Residual | |
| 4 Natural doce | Superficial | Subterrânea | Balnear (praia fluvial) | Ecoágua Captação |
| 5 Processo | Torres Refrigeração | Caldeiras | Tratada (não destinada a consumo humano) | |

As amostras com a designação Ecoágua são amostras que integram o Projecto Ecoágua dos SMAS de Sintra. Este projecto iniciado em 2003, tem como objectivo racionalizar e garantir o uso sustentável e sustentado da água, através da redução dos consumos a partir da rede de abastecimento. Este projecto permite o fornecimento gratuito de água não tratada e não controlada, com recurso a antigas captações desactivadas e às águas residuais tratadas produzidas nas ETAR após a sua desinfecção. Assim, existem dois tipos de amostras Ecoágua: Ecoágua Captação e Ecoágua Residual.

As amostras analisadas no ano de 2018 estão separadas e identificadas de acordo com o método aplicado tabelas 9, 10, 11 e 12.

Tabela 8 - Amostras analisadas pelo método Directo em 2018

| | Data | Amostra | Produto | Matriz | Local | Observações | Concentração de <i>Legionella</i> (ufc/L) | Positivos |
|----|------------|------------|----------|------------------------|-------|-------------|---|-----------|
| 1 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | Lj | 4,0E+04 | L spp. |
| 2 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | La | 2,0E+04 | L spp. |
| 3 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | Lp | 2,4E+05 | L p |
| 4 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 2,0E+06 | L p |
| 5 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | La | 1,5E+05 | L spp. |
| 6 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 1,1E+06 | L p |
| 7 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | La | 1,7E+05 | L spp. |
| 8 | 08-05-2018 | 1628+La+Lp | Piscina | Piscina | - | - | 6,0E+5 + 8,0E+4 | Lspp.+Lp |
| 9 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 5,7E+05 | Lspp. |
| 10 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 1,2E+06 | Lp |
| 11 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 1,4E+06 | Lspp. |
| 12 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 8,0E+04 | Lp |
| 13 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 3,4E+05 | Lspp. |
| 14 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 6,4E+05 | Lp |
| 15 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 7,7E+05 | Lp |
| 16 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 8,4E+05 | Lspp. |
| 17 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 6,9E+05 | Lp |
| 18 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 6,7E+05 | Lspp. |
| 19 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 1,1E+06 | Lp |
| 20 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 6,6E+05 | Lspp. |
| 21 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 4,0E+04 | Lspp. |
| 22 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 2,0E+04 | Lp |
| 23 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 2,0E+04 | Lspp. |
| 24 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 3,0E+04 | Lp |
| 25 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 1,0E+05 | Lspp. |
| 26 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 1,0E+04 | Lp |
| 27 | 13-07-2018 | MR | - | - | - | La | 6,9E+05 | Lspp. |
| 28 | 13-07-2018 | MR | - | - | - | Lp | 4,0E+05 | Lp |
| 29 | 13-07-2018 | MR | - | - | - | La | 8,1E+05 | Lspp. |
| 30 | 13-07-2018 | MR | - | - | - | Lp | 5,8E+05 | Lp |
| 31 | 20-07-2018 | 2699 | Processo | torres de refrigeração | - | - | - | - |
| 32 | 20-07-2018 | 2699 | Processo | torres de refrigeração | - | - | - | - |
| 33 | 20-07-2018 | 2699+MR | Processo | torres de refrigeração | Lp | 3,0E+04 | Lp | Lp |
| 34 | 20-07-2018 | 2699+MR | Processo | torres de refrigeração | Lp | 1,0E+04 | Lp | Lp |

La: *Legionella anisa*; Lj: *Legionella jordanis*; Lp: *Legionella pneumophila*; Lspp: *Legionella* spp.; MR – Material de referência; EIL: Ensaio interlaboratorial; -:Não aplicável

Tabela 9 - Amostras analisadas pelo método FM em 2018

| | Data | Amostra | Produto | Matriz | Local | Observações | Concentração de <i>Legionella</i> (ufc/L) | Positivos |
|----|------------|---------|--------------|---------------|---------------------|-------------|---|-----------|
| 1 | 13-04-2018 | 1384 | Natural doce | subterrânea | Pedra Furada, furo | - | <10 | - |
| 2 | 13-04-2018 | 1393 | Consumo | abastecimento | Chafariz de Anços | - | <10 | - |
| 3 | 13-04-2018 | 1388 | Consumo | abastecimento | R51 Penedo | - | <10 | - |
| 4 | 13-04-2018 | 1383 | Natural doce | subterrânea | Mina Urca | - | <10 | - |
| 5 | 13-04-2018 | 1390 | Consumo | abastecimento | R22 Capuchos | - | <10 | - |
| 6 | 13-04-2018 | 1395 | Natural doce | subterrânea | Mina duche | - | <10 | - |
| 7 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | Lj | 2,0E+04 | L spp. |
| 8 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | La | 7,0E+04 | L spp. |
| 9 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | Lp | 2,1E+05 | L p |
| 10 | 20-04-2018 | 1476 | Natural doce | subterrânea | Pedra Furada, furo | - | <4 | - |
| 11 | 20-04-2018 | 1477 | Natural doce | superficial | Pedra Furada, lagoa | - | <4 | - |
| 12 | 20-04-2018 | 1476 | Natural doce | subterrânea | Pedra Furada, furo | - | <4 | - |
| 13 | 20-04-2018 | 1477 | Natural doce | superficial | Pedra Furada, lagoa | - | <4 | - |
| 14 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 3,0E+05 | L p |
| 15 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | La | 1,5E+05 | L spp. |
| 16 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 8,3E+05 | L p |
| 17 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | La | 8,0E+04 | L spp. |
| 18 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 2,4E+05 | Lspp. |
| 19 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 4,6E+05 | Lp |
| 20 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 3,9E+05 | Lspp. |
| 21 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 9,5E+05 | Lp |
| 22 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 2,1E+05 | Lspp. |
| 23 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 9,8E+05 | Lp |
| 24 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 3,5E+05 | Lp |
| 25 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 1,8E+05 | Lspp. |
| 26 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 4,1E+05 | Lp |
| 27 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 3,4E+05 | Lspp. |
| 28 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 5,8E+05 | Lp |
| 29 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 4,4E+05 | Lspp. |
| 30 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 4,0E+04 | Lspp. |
| 31 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 1,0E+04 | Lp |
| 32 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 1,0E+04 | Lspp. |
| 33 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 1,0E+04 | Lp |

La: *Legionella anisa*; Lj: *Legionella jordanis*; Lp: *Legionella pneumophila*; Lspp: *Legionella* spp. MR – Material de referência; EIL: Ensaio interlaboratorial; -: Não aplicável

Tabela 10 - Amostras analisadas pelo método FME em 2018

| Data | Amostra | Produto | Matriz | Local | Observações | Concentração de <i>Legionella</i> (ufc/L) | Positivos | |
|------|------------|----------------|--------------|---------------|---------------------|---|------------------|----------|
| 1 | 13-04-2018 | 1384 | Natural doce | subterrânea | Pedra Furada, furo | - | <100000 ufc/L | - |
| 2 | 13-04-2018 | 1393 | Consumo | abastecimento | Chafariz de Anços | - | <100000 ufc/L | - |
| 3 | 13-04-2018 | 1388 | Consumo | abastecimento | R51 Penedo | - | <100000 ufc/L | - |
| 4 | 13-04-2018 | 1383 | Natural doce | subterrânea | Mina Urca | - | <100000 ufc/L | - |
| 5 | 13-04-2018 | 1390 | Consumo | abastecimento | R22 Capuchos | - | <100000 ufc/L | - |
| 6 | 13-04-2018 | 1395 | Natural doce | subterrânea | Mina duche | - | <100000 ufc/L | - |
| 7 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | Lj | 2,0E+04 | L spp. |
| 8 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | La | 6,0E+04 | L spp. |
| 9 | 18-04-2018 | MR | - | - | - | Lp | 6,0E+04 | L p |
| 10 | 20-04-2018 | 1476 | Natural doce | subterrânea | Pedra Furada, furo | - | <2500 | - |
| 11 | 20-04-2018 | 1477 | Natural doce | superficial | Pedra Furada, lagoa | - | <2500 | - |
| 12 | 20-04-2018 | 1476+La | Natural doce | subterrânea | Pedra Furada, furo | - | 1,0E+02 | L spp. |
| 13 | 20-04-2018 | 1477+Lp | Natural doce | superficial | Pedra Furada, lagoa | - | 1,4E+04 | L p |
| 14 | 20-04-2018 | 1476 | Natural doce | subterrânea | Pedra Furada, furo | - | <2500 | - |
| 15 | 20-04-2018 | 1477 | Natural doce | superficial | Pedra Furada, lagoa | - | <2500 | - |
| 16 | 03-05-2018 | 1628+MR | Piscina | piscina | - | - | 2,2E+05 | L spp. |
| 17 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 3,9E+05 | L p |
| 18 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | La | 4,0E+04 | L spp. |
| 19 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 4,4E+05 | L p |
| 20 | 04-05-2018 | MR | - | - | - | La | 8,0E+04 | L spp. |
| 21 | 08-05-2018 | 1628+La+Lp | Piscina | piscina | - | - | 1,84E+5 + 8,0E+3 | Lspp.+Lp |
| 22 | 11-05-2018 | (1) 1628+La+Lp | Piscina | piscina | - | - | 2,0E+4 + 4,0E+4 | Lspp.+Lp |
| 23 | 11-05-2018 | (2) Fonte + MR | Natural doce | subterrânea | - | - | 5,0E+03 | Lp |
| 24 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 5,0E+04 | Lspp. |
| 25 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 5,1E+05 | Lp |
| 26 | 11-05-2018 | (1) 1628+La+Lp | Piscina | piscina | - | - | 7,2E+4 + 2,0E+4 | Lspp.+Lp |
| 27 | 11-05-2018 | (2) Fonte + MR | Natural doce | subterrânea | - | - | 7,5E+03 | Lp |

| Data | Amostra | Produto | Matriz | Local | Observações | Concentração de <i>Legionella</i> (ufc/L) | Positivos | |
|------|------------|-----------------------|--------------|------------------------|-------------------------------|---|-------------------|-------------------|
| 28 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 7,0E+04 | Lspp. |
| 29 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 6,0E+05 | Lp |
| 30 | 11-05-2018 | (1) 1628+La+ Lp | Piscina | piscina | - | - | 4,0E+03 | Lspp. |
| 31 | 11-05-2018 | (2) Fonte + MR | Natural doce | subterrânea | - | - | 8,0E+03 | Lp |
| 32 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | La | 5,0E+04 | Lspp. |
| 33 | 11-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 5,2E+05 | Lp |
| 34 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 4,2E+05 | Lp |
| 35 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 7,5E+04 | Lspp. |
| 36 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 3,9E+05 | Lp |
| 37 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 8,0E+04 | Lspp. |
| 38 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | Lp | 4,9E+05 | Lp |
| 39 | 18-05-2018 | MR | - | - | - | La | 2,3E+05 | Lspp. |
| 40 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 6,0E+03 | Lspp. |
| 41 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 1,0E+04 | Lp |
| 42 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 5,0E+03 | Lspp. |
| 43 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 8,0E+03 | Lp |
| 44 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | 4,0E+03 | Lspp. |
| 45 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 4,0E+03 | Lp |
| 46 | 20-07-2018 | 2699 | Processo | torres de refrigeração | | - | 3,0E+3+2, 0E+3 | Lp 2- 14+Lspp. |
| 47 | 20-07-2018 | 2699 | Processo | torres de refrigeração | | - | 1,0E+03 | Lp 2-14 |
| 48 | 20-07-2018 | 2700 | Consumo | abastecimento | Chuveiro balneários femininos | - | <100 | - |
| 49 | 20-07-2018 | 2700 | Consumo | abastecimento | Chuveiro balneários femininos | - | <100 | - |
| 50 | 20-07-2018 | 2699+MR | Processo | torres de refrigeração | | - | 1,0E+03 | Lp |

La: *Legionella anisa*; Lp: *Legionella pneumophila*; Lspp: *Legionella* spp. MR – Material de referência; EIL: Ensaio interlaboratorial; - :Não aplicável

Tabela 11 - Amostras analisadas pelo método Diluído em 2018

| Data | Amostra | Produto | Matriz | Local | Observações | Concentração de <i>Legionella</i> (ufc/L) | Positivos | |
|------|------------|---------|--------------|------------------|------------------------|---|-----------|-------|
| 1 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | < 1000000 | Lspp. |
| 2 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 1,0E+05 | Lp |
| 3 | 25-05-2018 | 1813 | - | - | - | EIL G111A | <1000000 | Lspp. |
| 4 | 25-05-2018 | 1814 | - | - | - | EIL G111B | 1,0E+05 | Lp |
| 5 | 13-07-2018 | 2508 | Residual | Efluente | Almoçageme | Trat. Combinado | <100000 | - |
| 6 | 13-07-2018 | 2519 | Residual | Ecoágua Residual | Janas | Trat. Combinado | <100000 | - |
| 7 | 13-07-2018 | 2520 | Residual | Ecoágua Residual | Cortegaça | Trat. Combinado | <100000 | - |
| 8 | 13-07-2018 | 2521 | Residual | Ecoágua Residual | Montelavar | Trat. Combinado | <100000 | - |
| 9 | 13-07-2018 | 2523 | Natural doce | naturais | Largo de colares | Trat. Combinado | <100000 | - |
| 10 | 13-07-2018 | 2524 | Natural doce | naturais | Ribeira S1 | Trat. Combinado | <100000 | - |
| 11 | 13-07-2018 | 2526 | Residual | efluente tratado | Magoito | Trat. Combinado | <100000 | - |
| 12 | 13-07-2018 | 2527 | Natural doce | naturais | Foz Ribeira de Magoito | Trat. Combinado | <100000 | - |

Lp: *Legionella pneumophila*; Lspp: *Legionella* spp. ; EIL: Ensaio interlaboratorial; -:Não aplicável

É importante referir que a maioria das amostras analisadas não apresentaram *Legionella*, salvo quando contaminadas artificialmente, pelo que o método Diluído não apresenta grande aplicabilidade para a realidade do laboratório.

7.3 Validação do método

A validação é, de acordo com a Norma ISO 17025:2018, a verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido. A validação (primária) de um método, refere-se a situações novas, como um método desenvolvido pelo laboratório ou alterações de técnicas, de meios, de confirmações ou mesmo quando métodos normalizados são utilizados fora do âmbito de utilização previsto e em que é necessário definir características e requisitos, o que implica normalmente a participação de diversos laboratórios. A implementação (validação secundária) é um processo mais simples (e é o usado no laboratório). Aplica-se quando se seguem métodos normalizados ou equivalentes, publicados por organismos de normalização ou organismos sectoriais credíveis, e em que se pretende verificar se o laboratório obtém o desempenho esperado. Para validação do método o laboratório dispõe de um procedimento interno, PAM 15 – Validação/Implementação de métodos. (Anexo C.5).

A validação consiste em acompanhar os ensaios com o respectivo controlo de qualidade estabelecido, nomeadamente ensaios de brancos, duplicados, paralelos e Materiais de Referência. Prevê a análise de pelo menos 30 amostras das várias matrizes, com que o laboratório trabalha habitualmente, das quais no mínimo 10 têm que apresentar crescimento característico contabilizável. Para completar o processo de validação do método, o laboratório deve participar em Ensaio Interlaboratoriais (EIL) com desempenho satisfatório.

Pela análise de amostras em duplicados, o laboratório determina o Critério de Precisão (CP) do método, enquanto a Estimativa de Incerteza (EI) do método é calculada pela realização de ensaios em paralelo.

A análise de MR fornece a rastreabilidade necessária às medições e é usada, por exemplo, para demonstrar a exactidão dos resultados, monitorizar o desempenho do laboratório, validar o método, permitindo também a comparação de métodos.

A publicação da Norma ISO 11133 "Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media em 2014, levou o laboratório a substituir a construção de Cartas Guia para análise de MR por Cartas Guia de Produtividade de meios de cultura.

O processo de validação do método de análise de *Legionella* spp. e de *Legionella pneumophila* terminou com a Avaliação Externa. Por um lado, o desempenho do laboratório foi avaliado pela participação em EIL do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade, do Departamento de Epidemiologia do Instituto Ricardo Jorge, INSA, por outro, uma vez que o laboratório efectuou o pedido ao IPAC de extensão da Acreditação para este método, o mesmo foi alvo de Auditorias Interna e Externa.

7.3.1 Ensaio em duplicado - Determinação do Critério de Precisão

Foram analisadas algumas amostras em duplicado. No entanto, como para as amostras que o laboratório analisa obtem-se normalmente resultado nulo, foram analisadas em duplicados amostras contaminadas artificialmente e Material de Referência.

O tratamento dos duplicados foi efectuado também de acordo com o método aplicado e separadamente para *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila*.

O critério de precisão foi determinado pela amplitude dos duplicados, tal como descrito no livro *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (RICE *et al.*, 2012). O cálculo do CP implica determinar as média das amplitudes do logaritmo de cada duplicado (Anexo D):

$$R_{log} = |\log D_1 - \log D_2| \quad (eq\ 1)$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R_{log}}{n} \quad (eq\ 2)$$

$$CP = 3,27 \bar{R} \quad (eq\ 3)$$

$$LSA = 2,512 \bar{R} \quad (eq\ 4)$$

Onde: D₁ e D₂: resultados em ufc/L de cada duplicado;

R_{log}: amplitude do duplicado;

\bar{R} : média das amplitudes;

LSA: Limite superior de aviso

É de ter em conta que contagens inferiores a 10 não são consideradas para determinação do CP, bem como duplicados com R_{log} > 1,5 CP, pois estes são considerados “aberrantes”.

Os critérios de precisão foram estabelecidos considerando 20 duplicados para *Legionella* spp. (tabelas 13, 14 e 15) e 10 duplicados para *Legionella pneumophila* (tabelas 16, 17 e 18). Logo que o laboratório disponha de um número de duplicados suficiente irá proceder a novo cálculo do Critério de Precisão.

Tabela 12 - Determinação do CP para *Legionella* spp. método Directo

| Determinação do Critério de Precisão de 2018 | | | | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|--------|---------|----------------------------------|--------------|-----------|
| Parâmetro: <i>Legionella</i> spp.; método Directo | | | | | | | | | |
| Data | Concentração D1 (ufc/L) | Concentração D2 (ufc/L) | Média das Concentrações (ufc/L) | Analista | Log D1 | Log D2 | R _{log} = Log D1-Log D2 | | |
| | | | | | | | Total | A considerar | |
| 1 | 11-mai-18 | 600000 | 530000 | 565000 | CR | 5,77815 | 5,72428 | 0,05388 | 0,05388 |
| 2 | 11-mai-18 | 150000 | 180000 | 165000 | CR | 5,17609 | 5,25527 | 0,07918 | 0,07918 |
| 3 | 11-mai-18 | 1140000 | 1260000 | 1200000 | CR | 6,05690 | 6,10037 | 0,04347 | 0,04347 |
| 4 | 11-mai-18 | 390000 | 550000 | 470000 | CR | 5,59106 | 5,74036 | 0,14930 | 0,14930 |
| 5 | 11-mai-18 | 1450000 | 1410000 | 1430000 | RP | 6,16137 | 6,14922 | 0,01215 | 0,01215 |
| 6 | 11-mai-18 | 850000 | 850000 | 850000 | RP | 5,92942 | 5,92942 | 0,00000 | 0,00000 |
| 7 | 11-mai-18 | 30000 | 130000 | 80000 | RP | 4,47712 | 5,11394 | 0,63682 | Aberrante |
| 8 | 11-mai-18 | 10000 | 30000 | 20000 | RP | 4,00000 | 4,47712 | 0,47712 | Aberrante |
| 9 | 11-mai-18 | 230000 | 640000 | 435000 | CL | 5,36173 | 5,80618 | 0,44445 | 0,44445 |
| 10 | 11-mai-18 | 130000 | 260000 | 195000 | CL | 5,11394 | 5,41497 | 0,30103 | 0,30103 |
| 11 | 11-mai-18 | 370000 | 300000 | 335000 | CL | 5,56820 | 5,47712 | 0,09108 | 0,09108 |
| 12 | 11-mai-18 | 120000 | 140000 | 130000 | CL | 5,07918 | 5,14613 | 0,06695 | 0,06695 |
| 13 | 18-mai-18 | 820000 | 710000 | 765000 | CR | 5,91381 | 5,85126 | 0,06256 | 0,06256 |
| 14 | 18-mai-18 | 450000 | 350000 | 400000 | CR | 5,65321 | 5,54407 | 0,10914 | 0,10914 |
| 15 | 18-mai-18 | 940000 | 740000 | 840000 | CR | 5,97313 | 5,86923 | 0,10390 | 0,10390 |
| 16 | 18-mai-18 | 620000 | 500000 | 560000 | CR | 5,79239 | 5,69897 | 0,09342 | 0,09342 |
| 17 | 18-mai-18 | 410000 | 580000 | 495000 | CR | 5,61278 | 5,76343 | 0,15064 | 0,15064 |
| 18 | 18-mai-18 | 480000 | 440000 | 460000 | CR | 5,68124 | 5,64345 | 0,03779 | 0,03779 |
| 19 | 18-mai-18 | 990000 | 680000 | 835000 | CR | 5,99564 | 5,83251 | 0,16313 | 0,16313 |
| 20 | 18-mai-18 | 600000 | 770000 | 685000 | CL | 5,77815 | 5,88649 | 0,10834 | 0,10834 |
| 21 | 18-mai-18 | 460000 | 420000 | 440000 | CL | 5,66276 | 5,62325 | 0,03951 | 0,03951 |
| 22 | 18-mai-18 | 650000 | 680000 | 665000 | CL | 5,81291 | 5,83251 | 0,01960 | 0,01960 |

Tabela 13 - Determinação do CP para *Legionella* spp. método FM

| Determinação do Critério de Precisão de 2018 | | | | | | | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|--------|---------|----------------------------------|--------------|---------|
| Parâmetro: <i>Legionella</i> spp.; método Filtração por Membrana | | | | | | | | | |
| Data | Concentração D1 (ufc/L) | Concentração D2 (ufc/L) | Média das Concentrações (ufc/L) | Analista | Log D1 | Log D2 | R _{log} = Log D1-Log D2 | | |
| | | | | | | | Total | A considerar | |
| 1 | 11-mai-18 | 250000 | 220000 | 235000 | CR | 5,39794 | 5,34242 | 0,05552 | 0,05552 |
| 2 | 11-mai-18 | 180000 | 200000 | 190000 | CR | 5,25527 | 5,30103 | 0,04576 | 0,04576 |
| 3 | 11-mai-18 | 470000 | 450000 | 460000 | CR | 5,67210 | 5,65321 | 0,01889 | 0,01889 |
| 4 | 11-mai-18 | 670000 | 610000 | 640000 | CR | 5,82607 | 5,78533 | 0,04074 | 0,04074 |
| 5 | 11-mai-18 | 990000 | 900000 | 945000 | RP | 5,99564 | 5,95424 | 0,04139 | 0,04139 |
| 6 | 11-mai-18 | 820000 | 690000 | 755000 | RP | 5,91381 | 5,83885 | 0,07496 | 0,07496 |
| 7 | 11-mai-18 | 390000 | 390000 | 390000 | RP | 5,59106 | 5,59106 | 0,00000 | 0,00000 |
| 8 | 11-mai-18 | 290000 | 250000 | 270000 | RP | 5,46240 | 5,39794 | 0,06446 | 0,06446 |
| 9 | 11-mai-18 | 870000 | 980000 | 925000 | CL | 5,93952 | 5,99123 | 0,05171 | 0,05171 |
| 10 | 11-mai-18 | 600000 | 750000 | 675000 | CL | 5,77815 | 5,87506 | 0,09691 | 0,09691 |
| 11 | 11-mai-18 | 210000 | 210000 | 210000 | CL | 5,32222 | 5,32222 | 0,00000 | 0,00000 |
| 12 | 11-mai-18 | 110000 | 200000 | 155000 | CL | 5,04139 | 5,30103 | 0,25964 | 0,25964 |
| 13 | 18-mai-18 | 250000 | 440000 | 345000 | CR | 5,39794 | 5,64345 | 0,24551 | 0,24551 |
| 14 | 18-mai-18 | 230000 | 360000 | 295000 | CR | 5,36173 | 5,55630 | 0,19457 | 0,19457 |
| 15 | 18-mai-18 | 160000 | 200000 | 180000 | CR | 5,20412 | 5,30103 | 0,09691 | 0,09691 |
| 16 | 18-mai-18 | 180000 | 240000 | 210000 | CR | 5,25527 | 5,38021 | 0,12494 | 0,12494 |
| 17 | 18-mai-18 | 400000 | 410000 | 405000 | CL | 5,60206 | 5,61278 | 0,01072 | 0,01072 |
| 18 | 18-mai-18 | 190000 | 340000 | 265000 | CL | 5,27875 | 5,53148 | 0,25273 | 0,25273 |
| 19 | 18-mai-18 | 540000 | 620000 | 580000 | RP | 5,73239 | 5,79239 | 0,06000 | 0,06000 |
| 20 | 18-mai-18 | 330000 | 320000 | 325000 | RP | 5,51851 | 5,50515 | 0,01336 | 0,01336 |

Tabela 14 - Determinação do CP para *Legionella spp.* método FME

| Determinação do Critério de Precisão de 2018 | | | | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|--------|---------|----------------------------------|---------|---------|
| Parâmetro: <i>Legionella spp.</i> ; método Filtração por Membrana com Eluição | | | | | | | | | |
| Data | Concentração D1 (ufc/L) | Concentração D2 (ufc/L) | Média das Concentrações (ufc/L) | Analista | Log D1 | Log D2 | R _{log} = Log D1-Log D2 | | |
| | | | | | | | Total | Total | |
| 1 | 20-abr-18 | 3600 | 9900 | 6750 | RP | 3,55630 | 3,99564 | 0,43933 | 0,43933 |
| 2 | 20-abr-18 | 13600 | 12200 | 12900 | RP | 4,13354 | 4,08636 | 0,04718 | 0,04718 |
| 3 | 11-mai-18 | 20000 | 80000 | 50000 | CR | 4,30103 | 4,90309 | 0,60206 | 0,60206 |
| 4 | 11-mai-18 | 20000 | 10000 | 15000 | CR | 4,30103 | 4,00000 | 0,30103 | 0,30103 |
| 5 | 11-mai-18 | 620000 | 400000 | 510000 | CR | 5,79239 | 5,60206 | 0,19033 | 0,19033 |
| 6 | 11-mai-18 | 330000 | 220000 | 275000 | CR | 5,51851 | 5,34242 | 0,17609 | 0,17609 |
| 7 | 11-mai-18 | 500000 | 690000 | 595000 | RP | 5,69897 | 5,83885 | 0,13988 | 0,13988 |
| 8 | 11-mai-18 | 300000 | 460000 | 380000 | RP | 5,47712 | 5,66276 | 0,18564 | 0,18564 |
| 9 | 11-mai-18 | 60000 | 80000 | 70000 | RP | 4,77815 | 4,90309 | 0,12494 | 0,12494 |
| 10 | 11-mai-18 | 60000 | 30000 | 45000 | RP | 4,77815 | 4,47712 | 0,30103 | 0,30103 |
| 11 | 11-mai-18 | 520000 | 150000 | 335000 | CL | 5,71600 | 5,17609 | 0,53991 | 0,53991 |
| 12 | 11-mai-18 | 100000 | 120000 | 110000 | CL | 5,00000 | 5,07918 | 0,07918 | 0,07918 |
| 13 | 18-mai-18 | 430000 | 400000 | 415000 | CR | 5,63347 | 5,60206 | 0,03141 | 0,03141 |
| 14 | 18-mai-18 | 170000 | 170000 | 170000 | CR | 5,23045 | 5,23045 | 0,00000 | 0,00000 |
| 15 | 18-mai-18 | 90000 | 60000 | 75000 | CR | 4,95424 | 4,77815 | 0,17609 | 0,17609 |
| 16 | 18-mai-18 | 40000 | 120000 | 80000 | CR | 4,60206 | 5,07918 | 0,47712 | 0,47712 |
| 17 | 18-mai-18 | 390000 | 170000 | 280000 | CL | 5,59106 | 5,23045 | 0,36062 | 0,36062 |
| 18 | 18-mai-18 | 190000 | 150000 | 170000 | CL | 5,27875 | 5,17609 | 0,10266 | 0,10266 |
| 19 | 18-mai-18 | 100000 | 60000 | 80000 | CL | 5,00000 | 4,77815 | 0,22185 | 0,22185 |
| 20 | 18-mai-18 | 30000 | 40000 | 35000 | CL | 4,47712 | 4,60206 | 0,12494 | 0,12494 |

Tabela 15 - Determinação do CP para *Legionella pneumophila* método Directo

| Determinação do Critério de Precisão de 2018 | | | | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|--------|---------|----------------------------------|--------------|---------|
| Parâmetro: <i>Legionella pneumophila</i> ; método Directo | | | | | | | | | |
| Data | Concentração D1 (ufc/L) | Concentração D2 (ufc/L) | Média das Concentrações (ufc/L) | Analista | Log D1 | Log D2 | R _{log} = Log D1-Log D2 | | |
| | | | | | | | Total | A considerar | |
| 1 | 11-mai-18 | 1140000 | 1260000 | 1200000 | CR | 6,05690 | 6,10037 | 0,04347 | 0,04347 |
| 2 | 11-mai-18 | 390000 | 550000 | 470000 | CR | 5,59106 | 5,74036 | 0,14930 | 0,14930 |
| 3 | 11-mai-18 | 1450000 | 1410000 | 1430000 | RP | 6,16137 | 6,14922 | 0,01215 | 0,01215 |
| 4 | 11-mai-18 | 850000 | 850000 | 850000 | RP | 5,92942 | 5,92942 | 0,00000 | 0,00000 |
| 5 | 11-mai-18 | 230000 | 640000 | 435000 | CL | 5,36173 | 5,80618 | 0,44445 | 0,44445 |
| 6 | 11-mai-18 | 130000 | 260000 | 195000 | CL | 5,11394 | 5,41497 | 0,30103 | 0,30103 |
| 7 | 18-mai-18 | 820000 | 710000 | 765000 | CR | 5,91381 | 5,85126 | 0,06256 | 0,06256 |
| 8 | 18-mai-18 | 450000 | 350000 | 400000 | CR | 5,65321 | 5,54407 | 0,10914 | 0,10914 |
| 9 | 18-mai-18 | 480000 | 440000 | 460000 | CR | 5,68124 | 5,64345 | 0,03779 | 0,03779 |
| 10 | 18-mai-18 | 990000 | 680000 | 835000 | CR | 5,99564 | 5,83251 | 0,16313 | 0,16313 |

Tabela 16 - Determinação do CP para *Legionella pneumophila* método FM

| Determinação do Critério de Precisão de 2018 | | | | | | | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|--------|---------|----------------------------------|--------------|---------|
| Parâmetro: <i>Legionella pneumophila</i> ; método Filtração por Membrana | | | | | | | | | |
| Data | Concentração D1 (ufc/L) | Concentração D2 (ufc/L) | Média das Concentrações (ufc/L) | Analista | Log D1 | Log D2 | R _{log} = Log D1-Log D2 | | |
| | | | | | | | Total | A considerar | |
| 1 | 11-mai-18 | 470000 | 450000 | 460000 | CR | 5,67210 | 5,65321 | 0,01889 | 0,01889 |
| 2 | 11-mai-18 | 670000 | 610000 | 640000 | CR | 5,82607 | 5,78533 | 0,04074 | 0,04074 |
| 3 | 11-mai-18 | 990000 | 900000 | 945000 | RP | 5,99564 | 5,95424 | 0,04139 | 0,04139 |
| 4 | 11-mai-18 | 820000 | 690000 | 755000 | RP | 5,91381 | 5,83885 | 0,07496 | 0,07496 |
| 5 | 11-mai-18 | 870000 | 980000 | 925000 | CL | 5,93952 | 5,99123 | 0,05171 | 0,05171 |
| 6 | 11-mai-18 | 600000 | 750000 | 675000 | CL | 5,77815 | 5,87506 | 0,09691 | 0,09691 |
| 7 | 18-mai-18 | 250000 | 440000 | 345000 | CR | 5,39794 | 5,64345 | 0,24551 | 0,24551 |
| 8 | 18-mai-18 | 230000 | 360000 | 295000 | CR | 5,36173 | 5,55630 | 0,19457 | 0,19457 |
| 9 | 18-mai-18 | 400000 | 410000 | 405000 | CL | 5,60206 | 5,61278 | 0,01072 | 0,01072 |
| 10 | 18-mai-18 | 190000 | 340000 | 265000 | CL | 5,27875 | 5,53148 | 0,25273 | 0,25273 |

Tabela 17 - Determinação do CP para *Legionella pneumophila* método FME

| Determinação do Critério de Precisão de 2018 | | | | | | | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|--------|---------|----------------------------------|--------------|-----------|
| Parâmetro: <i>Legionella pneumophila</i> ; método Filtração por Membrana com Eluição | | | | | | | | | |
| Data | Concentração D1 (ufc/L) | Concentração D2 (ufc/L) | Média das Concentrações (ufc/L) | Analista | Log D1 | Log D2 | R _{log} = Log D1-Log D2 | | |
| | | | | | | | Total | A considerar | |
| 1 | 20-abr-18 | 3600 | 9900 | 6750 | RP | 3,55630 | 3,99564 | 0,43933 | 0,43933 |
| 2 | 20-abr-18 | 13600 | 12200 | 12900 | RP | 4,13354 | 4,08636 | 0,04718 | 0,04718 |
| 3 | 11-mai-18 | 620000 | 400000 | 510000 | CR | 5,79239 | 5,60206 | 0,19033 | 0,19033 |
| 4 | 11-mai-18 | 330000 | 220000 | 275000 | CR | 5,51851 | 5,34242 | 0,17609 | 0,17609 |
| 5 | 11-mai-18 | 500000 | 690000 | 595000 | RP | 5,69897 | 5,83885 | 0,13988 | 0,13988 |
| 6 | 11-mai-18 | 300000 | 460000 | 380000 | RP | 5,47712 | 5,66276 | 0,18564 | 0,18564 |
| 7 | 11-mai-18 | 520000 | 150000 | 335000 | CL | 5,71600 | 5,17609 | 0,53991 | Aberrante |
| 8 | 11-mai-18 | 100000 | 120000 | 110000 | CL | 5,00000 | 5,07918 | 0,07918 | 0,07918 |
| 9 | 18-mai-18 | 430000 | 400000 | 415000 | CR | 5,63347 | 5,60206 | 0,03141 | 0,03141 |
| 10 | 18-mai-18 | 170000 | 170000 | 170000 | CR | 5,23045 | 5,23045 | 0,00000 | 0,00000 |
| 11 | 18-mai-18 | 390000 | 170000 | 280000 | CL | 5,59106 | 5,23045 | 0,36062 | 0,36062 |

Anualmente e em função do número de ensaios realizados em duplicado, é efectuada a revisão do CP

Tabela 18 - Resumo do Critério de Precisão estabelecido por método para cada parâmetro

| Legionella spp. | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| Método Directo | | Método FM | | Método FME | |
| Ano | 2018 | Ano | 2018 | Ano | 2018 |
| Total de valores para cálculo de CP | 20 | Total de valores para cálculo de CP | 20 | Total de valores para cálculo de CP | 20 |
| Critério de Precisão | 0,314 | Critério de Precisão | 0,284 | Critério de Precisão | 0,481 |
| Limite Superior de aviso | 0,241 | Limite Superior de aviso | 0,219 | Limite Superior de aviso | 0,369 |
| Médias das amplitudes | 0,096 | Médias das amplitudes | 0,087 | Médias das amplitudes | 0,147 |
| Legionella pneumophila | | | | | |
| Método Directo | | Método FM | | Método FME | |
| Ano | 2018 | Ano | 2018 | Ano | 2018 |
| Total de valores para cálculo de CP | 10 | Total de valores para cálculo de CP | 10 | Total de valores para cálculo de CP | 10 |
| Critério de Precisão | 0,320 | Critério de Precisão | 0,337 | Critério de Precisão | 0,347 |
| Limite Superior de aviso | 0,246 | Limite Superior de aviso | 0,259 | Limite Superior de aviso | 0,266 |
| Médias das amplitudes | 0,098 | Médias das amplitudes | 0,103 | Médias das amplitudes | 0,106 |

7.3.2 Ensaios em paralelo - Cálculo da Estimativa de Incerteza

A incerteza da medição é definida como um parâmetro, associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores, é, portanto, uma medida da imprecisão (CTR07-AGUAS, 2016). Em análise microbiológica, a incerteza total do resultado de uma análise apenas pode ser estimada após a obtenção do resultado final, devido à incontornável "variação sem causa", que acompanha as contagens.

Para efeitos práticos, é suficiente considerar que incerteza dos resultados de ensaios microbiológicos resulta de dois grupos de componentes, ou seja, a incerteza combinada da medição é obtida através da combinação da variância operacional e da variância intrínseca. Assim, é necessário determinar estes dois parâmetros de precisão, a variância operacional, que corresponde à incerteza do próprio método e que é mais ou menos previsível e a variância intrínseca, que corresponde à variação imprevisível da distribuição das ufc.

A variância operacional, u_o^2 , é a combinação de todas as incertezas associadas às etapas técnicas do procedimento analítico. Inclui a variabilidade das subamostras, da mistura e da diluição da amostra para preparação da suspensão final. Inclui ainda, os possíveis efeitos da incubação e da incerteza da leitura do resultado.

A variância intrínseca ou variância da distribuição, u_d^2 , é a variação inevitável, sem uma causa, que está associada à distribuição das células na suspensão final e no sistema de quantificação.

O laboratório efectua o cálculo da Estimativa de Incerteza de acordo com a Norma ISO 29201:2012 – “Water Quality – The variability of test results and uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods”. A partir do anexo F da Norma ISO 29201:2012 (Anexo E) o laboratório procede à abordagem global para determinação das incertezas operacional u_o , intrínseca ou da distribuição u_d e combinada $u_c(y)$.

Na abordagem global, não é necessário quantificar ou mesmo saber exatamente quais as causas da incerteza, pois a abordagem global é baseada na análise estatística de séries de observações repetidas do resultado final, esta abordagem assenta na estimativa da incerteza combinada do resultado final, com base na duplicação de todo o processo analítico (CTR07-AGUAS, 2016).

Como tal, consideram-se 30 ensaios em paralelo, nos quais se pretende obter preferencialmente contagens entre os 80 e os 120 ufc/placa. Todas as colónias devem ser confirmadas, mas por ser incomportável proceder à confirmação de todas as colónias, o laboratório optou por utilizar MR e contaminar amostras com MR, não sendo nesse caso necessário proceder aos passos de confirmação.

Tendo em conta:

$$\text{variância da reprodutibilidade: } u_R^2 = \frac{(\log n_{c1} - \log n_{c2})^2}{2} \quad (\text{eq 5})$$

$$\text{variância da distribuição: } u_{di}^2 = \frac{2 \times 0.1886}{n_{c1i} + n_{c2i}} = \frac{0.1886}{\bar{n}_{ci}} \quad (\text{eq 6})$$

$$\text{variância operacional: } u_o^2 = u_{R'}^2 - u_d^2 \quad (\text{eq 7})$$

Onde: n_{c1} e n_{c2} são as contagens efectuadas pelas diferentes analistas.

A EI relativa é expressa normalmente em percentagens, uma vez que a abordagem por componentes é calculada a partir dos logaritmos das contagens. Para converter os resultados obtidos pelos logaritmos em percentagem ou seja, relativa, é necessário multiplicar os valores logarítmicos da variância operacional, u_o^2 , e da variância da distribuição, u_d^2 , por 5,302.

$$\text{variância operacional/distribuição relativa: } u_{o/d,rel}^2 = 5.302 \times u_{o/d}^2 \quad (\text{eq 8})$$

$$\text{incerteza operacional/distribuição relativa: } u_{o/d,rel} = \sqrt{u_{o/d,rel}^2} \approx \dots \% \quad (\text{eq 9})$$

$$\text{Incerteza combinada: } u_c(y) = \sqrt{u_o^2 + u_d^2} \quad (\text{eq 10})$$

Para determinar a incerteza combinada de um determinado resultado, n_c :

$$\text{incerteza combinada: } u_c(y) = \sqrt{\frac{0.1886}{n_c} + u_o^2 (*)} \approx u_c(y) = \sqrt{\frac{0.1886}{n_c}} \quad (\text{eq 11})$$

(*) De acordo com a referida Norma, para baixas contagens, a variância operacional pode ser desprezada e pode-se calcular a incerteza combinada considerando apenas a variância intrínseca.

Tal como foi indicado anteriormente na tabela 5, o resultado final da análise de *Legionella* resulta da confirmação parcial das colónias características (equação 12), o cálculo da EI deve contemplar determinação da incerteza da confirmação parcial (equação 13):

$$n = \frac{n_k}{n_z} \times n_c \quad (\text{eq 12})$$

Onde: n : resultado estimado por confirmação parcial;

n_k : colónias confirmadas positivas;

n_z : colónias repicadas para confirmação;

n_c : total de colónias presuntivas.

$$\text{incerteza da confirmação parcial: } u_{rel,x} = \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{n_z - n_k}{n_k n_z}} \quad (\text{eq 13})$$

E a incerteza combinada relativa, $u_{c,rel}$, é:

$$u_{c,rel} = \sqrt{\frac{n_z - n_k}{n_k n_z} + \frac{1}{n_c} + u_{o,rel}^2} \quad (\text{eq 14})$$

A EI foi calculada para *Legionella* spp. e para *Legionella pneumophila* e separadamente, para os diferentes métodos (tabelas 20 a 25). Neste momento, o laboratório está a finalizar alguns dos ensaios em paralelo, pelo que, alguns dos valores apresentados nas tabelas seguintes são ainda provisórios e só serão definitivos quando estiverem concluídos os 30 ensaios em paralelo. A EI deve ser revista quando as condições actuais em que decorrem os ensaios sofrerem algum tipo de alteração, por exemplo, a qualificação de um novo analista.

Tabela 19 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para *Legionella* spp. pelo método Directo.

| EI <i>Legionella</i> spp.- Método Directo | | | | | | | | | | | |
|---|------------|-------------|-----------------|----------|-----------------|----------|---------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>i</i> | Data | Amostra | n _{c1} | Analista | n _{c2} | Analista | log n _{c1} | log n _{c2} | u ² _{R'} | u ² _d | u ² _o |
| 1 | 04-05-2018 | MR La: BCYE | 1,7E+01 | CR | 1,5E+01 | RP | 1,2304 | 1,1761 | 0,0015 | 0,0118 | -0,0103 |
| 2 | 11-05-2018 | MR La: BCYE | 1,6E+01 | RP | 1,1E+02 | CR | 1,2041 | 2,0531 | 0,3604 | 0,0029 | 0,3574 |
| 3 | 11-05-2018 | MR La: BCYE | 1,1E+02 | CR | 6,7E+01 | CL | 2,0531 | 1,8261 | 0,0258 | 0,0021 | 0,0237 |
| 4 | 11-05-2018 | MR La: BCYE | 1,6E+01 | RP | 6,7E+01 | CL | 1,2041 | 1,8261 | 0,1934 | 0,0045 | 0,1889 |
| 5 | 11-05-2018 | MR La: GVPC | 2,6E+01 | CL | 3,3E+01 | CR | 1,4150 | 1,5185 | 0,0054 | 0,0064 | -0,0010 |
| 6 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 2,9E+02 | RP | 2,4E+02 | CR | 2,4564 | 2,3802 | 0,0029 | 0,0007 | 0,0022 |
| 7 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,7E+02 | RP | 9,4E+01 | CR | 2,2304 | 1,9731 | 0,0331 | 0,0014 | 0,0317 |
| 8 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 1,7E+02 | CR | 1,3E+02 | RP | 2,2253 | 2,1206 | 0,0055 | 0,0013 | 0,0042 |
| 9 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 1,3E+02 | RP | 1,3E+02 | CL | 2,1206 | 2,1239 | 0,0000 | 0,0014 | -0,0014 |
| 10 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 1,7E+02 | CR | 1,3E+02 | CL | 2,2253 | 2,1239 | 0,0051 | 0,0013 | 0,0039 |
| 11 | 18-05-2018 | MR La: GVPC | 1,1E+02 | CR | 1,2E+02 | RP | 2,0492 | 2,0645 | 0,0001 | 0,0017 | -0,0015 |
| 12 | 18-05-2018 | MR La: GVPC | 1,2E+02 | RP | 9,4E+01 | CL | 2,0645 | 1,9731 | 0,0042 | 0,0018 | 0,0024 |
| 13 | 18-05-2018 | MR La: GVPC | 9,4E+01 | CL | 1,1E+02 | CR | 1,9731 | 2,0492 | 0,0029 | 0,0018 | 0,0011 |
| 14 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,5E+02 | CR | 2,2E+02 | RP | 2,1847 | 2,3385 | 0,0118 | 0,0010 | 0,0108 |
| 15 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 2,2E+02 | RP | 1,4E+02 | CL | 2,3385 | 2,1367 | 0,0203 | 0,0011 | 0,0193 |
| 16 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,4E+02 | CL | 1,5E+02 | CR | 2,1367 | 2,1847 | 0,0012 | 0,0013 | -0,0002 |
| 17 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 9,5E+01 | RP | 8,0E+01 | CR | 1,9777 | 1,9031 | 0,0028 | 0,0022 | 0,0006 |
| 18 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 8,0E+01 | CR | 8,8E+01 | CL | 1,9031 | 1,9445 | 0,0009 | 0,0022 | -0,0014 |
| 19 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 8,8E+01 | CL | 9,5E+01 | RP | 1,9445 | 1,9777 | 0,0006 | 0,0021 | -0,0015 |
| 20 | 13-07-2018 | MR La: BCYE | 2,1E+02 | CR | 2,4E+02 | RP | 2,3243 | 2,3747 | 0,0013 | 0,0008 | 0,0004 |
| 21 | 13-07-2018 | MR La: BCYE | 2,2E+02 | RP | 2,1E+02 | CR | 2,3404 | 2,3243 | 0,0001 | 0,0009 | -0,0007 |

| EI <i>Legionella</i> spp.- Método Directo | | | | | | | | | | | |
|--|------------|-------------|---------|----|---------|----|--------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| 22 | 13-07-2018 | MR La: GVPC | 1,6E+02 | RP | 1,4E+02 | CR | 2,2095 | 2,1399 | 0,0024 | 0,0013 | 0,0012 |
| 23 | 13-07-2018 | MR Lp: BCYE | 9,3E+01 | CR | 2,1E+02 | RP | 1,9685 | 2,3243 | 0,0633 | 0,0012 | 0,0621 |
| 24 | 13-07-2018 | MR Lp: BCYE | 9,5E+01 | CR | 2,6E+02 | RP | 1,9777 | 2,4200 | 0,0978 | 0,0011 | 0,0967 |
| 25 | 13-07-2018 | MR Lp: GVPC | 8,0E+01 | CR | 1,2E+02 | RP | 1,9031 | 2,0607 | 0,0124 | 0,0019 | 0,0105 |
| 26 | 09-08-2018 | MR La GVPC | 4,9E+01 | CR | 5,8E+01 | CL | 1,6902 | 1,7634 | 0,0027 | 0,0035 | -0,0008 |
| 27 | 09-08-2018 | MR La GVPC | 6,4E+01 | RP | 5,8E+01 | CL | 1,8062 | 1,7634 | 0,0009 | 0,0031 | -0,0022 |
| 28 | 09-08-2018 | MR La BCYE | 5,4E+01 | CR | 7,1E+01 | RP | 1,7324 | 1,8513 | 0,0071 | 0,0030 | 0,0040 |
| 29 | 09-08-2018 | MR La BCYE | 7,1E+01 | RP | 6,2E+01 | CL | 1,8513 | 1,7924 | 0,0017 | 0,0028 | -0,0011 |
| 30 | 09-08-2018 | MR La BCYE | 6,2E+01 | CL | 5,4E+01 | CR | 1,7924 | 1,7324 | 0,0018 | 0,0033 | -0,0015 |
| Médias | | | | | | | | | 0,02897 | 0,00240 | 0,02658 |
| Variância Operacional | | | | | | | | u^2_o | 0,0266 | | |
| Variância Operacional Relativa | | | | | | | | $u^2_{o,rel}$ | 0,1409 | | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | | | | | | | | u^2_d | 0,0024 | | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | | | | | | | | $u^2_{d,rel}$ | 0,0127 | | |
| Incerteza Operacional | | | | | | | | u_o | 0,1630 | | |
| Incerteza Operacional Relativa | | | | | | | | $u_{o,rel}$ | 0,3754 | ≈38% | |
| Incerteza Intrínseca | | | | | | | | u_d | 0,0489 | | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | | | | | | | | $u_{d,rel}$ | 0,1127 | ≈11% | |
| Incerteza combinada | | | | | | | | $u_c(y)$ | 0,1702 | | |
| Determinar a incerteza combinada [$u_c(y)$] de um novo resultado com confirmação parcial [n_c]: | | | | | | | | | | | |
| Nº de colónias presuntivas | | | | | | | | n_c | 50 | | |
| Nº de colónias repicadas para confirmação | | | | | | | | n_z | 5 | | |
| Nº de colónias positivas confirmadas | | | | | | | | n_k | 4 | | |
| Incerteza combinada | | | | | | | | $u_c(y)$ | 0,4593 | | |
| Incerteza da confirmação parcial $u_{d,rel}$ | | | | | | | | 0,2646 | 26% | | |
| Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$ | | | | | | | | 1,0577 | 106% | | |
| Incerteza combinada relativa expandida | | | | | | | | 2,1153 | 212% | | |
| MR: Material de referência; La: <i>Legionella anisa</i>, Lp: <i>Legionella pneumophila</i>; GVPC e BCYE: meios de cultura | | | | | | | | | | | |

Tabela 20 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para *Legionella* spp. pelo método Filtração por Membrana

| EI <i>Legionella</i> spp. - Filtração por Membrana | | | | | | | | | | | |
|---|------------|-------------|----------|----------|----------|----------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>i</i> | Data | Amostra | n_{c1} | Analista | n_{c2} | Analista | $\log n_{c1}$ | $\log n_{c2}$ | $u^2_{R'}$ | u^2_d | u^2_o |
| 1 | 11-05-2018 | MR La: BCYE | 4,2E+01 | CL | 4,5E+01 | CR | 1,6232 | 1,6532 | 0,0004 | 0,0043 | -0,0039 |
| 2 | 11-05-2018 | MR La: BCYE | 4,5E+01 | CR | 7,8E+01 | RP | 1,6532 | 1,8921 | 0,0285 | 0,0031 | 0,0255 |
| 3 | 11-05-2018 | MR La: BCYE | 7,8E+01 | RP | 4,2E+01 | CL | 1,8921 | 1,6232 | 0,0361 | 0,0031 | 0,0330 |
| 4 | 11-05-2018 | MR La: GVPC | 3,8E+01 | CR | 5,4E+01 | RP | 1,5798 | 1,7324 | 0,0116 | 0,0041 | 0,0075 |
| 5 | 11-05-2018 | MR La: GVPC | 3,1E+01 | CL | 3,8E+01 | CR | 1,4914 | 1,5798 | 0,0039 | 0,0055 | -0,0016 |
| 6 | 11-05-2018 | MR La: GVPC | 5,4E+01 | RP | 3,1E+01 | CL | 1,7324 | 1,4914 | 0,0290 | 0,0044 | 0,0246 |
| 7 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 8,7E+01 | CR | 1,9E+02 | CL | 1,9395 | 2,2672 | 0,0537 | 0,0014 | 0,0523 |
| 8 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,9E+02 | CL | 1,9E+02 | RP | 2,2672 | 2,2765 | 0,0000 | 0,0010 | -0,0010 |
| 9 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,9E+02 | RP | 8,7E+01 | CR | 2,2765 | 1,9395 | 0,0568 | 0,0014 | 0,0554 |
| 10 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,3E+02 | CR | 1,5E+02 | RP | 2,1072 | 2,1790 | 0,0026 | 0,0014 | 0,0012 |
| 11 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,5E+02 | RP | 1,4E+02 | CL | 2,1790 | 2,1303 | 0,0012 | 0,0013 | -0,0001 |
| 12 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,4E+02 | CL | 1,3E+02 | CR | 2,1303 | 2,1072 | 0,0003 | 0,0014 | -0,0012 |
| 13 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 1,8E+01 | CR | 4,4E+01 | RP | 1,2553 | 1,6385 | 0,0734 | 0,0061 | 0,0673 |
| 14 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 1,8E+01 | CR | 3,4E+01 | CL | 1,2553 | 1,5315 | 0,0381 | 0,0073 | 0,0309 |
| 15 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 3,4E+01 | CL | 4,4E+01 | RP | 1,5315 | 1,6385 | 0,0057 | 0,0049 | 0,0009 |
| 16 | 18-05-2018 | MR La: GVPC | 3,0E+01 | CL | 2,1E+01 | CR | 1,4771 | 1,3222 | 0,0120 | 0,0074 | 0,0046 |
| 17 | 18-05-2018 | MR La: GVPC | 2,1E+01 | CR | 3,4E+01 | RP | 1,3222 | 1,5315 | 0,0219 | 0,0069 | 0,0150 |
| 18 | 18-05-2018 | MR La: GVPC | 3,4E+01 | RP | 3,0E+01 | CL | 1,5315 | 1,4771 | 0,0015 | 0,0059 | -0,0044 |
| 19 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 6,9E+01 | CR | 1,2E+02 | RP | 1,8388 | 2,0645 | 0,0254 | 0,0020 | 0,0234 |
| 20 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,2E+02 | RP | 8,1E+01 | CL | 2,0645 | 1,9085 | 0,0122 | 0,0019 | 0,0102 |
| 21 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 8,1E+01 | CL | 6,9E+01 | CR | 1,9085 | 1,8388 | 0,0024 | 0,0025 | -0,0001 |
| 22 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 5,9E+01 | CR | 6,5E+01 | RP | 1,7709 | 1,8129 | 0,0009 | 0,0030 | -0,0022 |
| 23 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 6,5E+01 | RP | 5,3E+01 | CL | 1,8129 | 1,7243 | 0,0039 | 0,0032 | 0,0007 |
| 24 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 5,3E+01 | CL | 5,9E+01 | CR | 1,7243 | 1,7709 | 0,0011 | 0,0034 | -0,0023 |
| 25 | 09-08-2018 | MR La BCYE | 3,1E+01 | RP | 1,9E+01 | CR | 1,4914 | 1,2788 | 0,0226 | 0,0075 | 0,0151 |
| 26 | 09-08-2018 | MR La BCYE | 1,9E+01 | CR | 5,5E+01 | CL | 1,2788 | 1,7404 | 0,1065 | 0,0051 | 0,1014 |
| 27 | 09-08-2018 | MR La BCYE | 5,5E+01 | CL | 3,1E+01 | RP | 1,7404 | 1,4914 | 0,0310 | 0,0044 | 0,0266 |
| 28 | 09-08-2018 | MR La GVPC | 2,9E+01 | RP | 2,0E+01 | CL | 1,4624 | 1,3010 | 0,0130 | 0,0077 | 0,0053 |
| 29 | 09-08-2018 | MR La GVPC | 2,0E+01 | CL | 2,0E+01 | CR | 1,3010 | 1,3010 | 0,0000 | 0,0094 | -0,0094 |
| 30 | 09-08-2018 | MR La GVPC | 2,0E+01 | CR | 2,9E+01 | RP | 1,3010 | 1,4624 | 0,0130 | 0,0077 | 0,0053 |
| Médias | | | | | | | | | 0,02030 | 0,00429 | 0,01601 |
| Variância Operacional | | | | | | | | | u^2_o | 0,0160 | |
| Variância Operacional Relativa | | | | | | | | | $u^2_{o,rel}$ | 0,0849 | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | | | | | | | | | u^2_d | 0,0043 | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | | | | | | | | | $u^2_{d,rel}$ | 0,0228 | |
| Incerteza Operacional | | | | | | | | | u_o | 0,1265 | |

| El <i>Legionella</i> spp. - Filtração por Membrana | | | | |
|--|-------------|---------------|-------------|--|
| Incerteza Operacional Relativa | $u_{o,rel}$ | 0,2913 | ≈29% | |
| Incerteza Intrínseca | u_d | 0,0655 | | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | $u_{d,rel}$ | 0,1508 | ≈15% | |
| Incerteza combinada | $u_c(y)$ | 0,1425 | | |
| Determinar a incerteza combinada [$u_c(y)$] de um novo resultado com confirmação parcial [n_c]: | | | | |
| Nº de colónias presuntivas | n_c | 50 | | |
| Nº de colónias repicadas para confirmação | n_z | 5 | | |
| Nº de colónias positivas confirmadas | n_k | 4 | | |
| Incerteza combinada | $u_c(y)$ | 0,3935 | | |
| Incerteza da confirmação parcial $u_{d,rel}$ | 0,2646 | 26% | | |
| Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$ | 0,9063 | 91% | | |
| Incerteza combinada relativa expandida | 1,8127 | 181% | | |
| MR: Material de referência; La: <i>Legionella anisa</i>, Lp: <i>Legionella pneumophila</i>; GVPC e BCYE: meios de cultura | | | | |

Tabela 21 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para *Legionella* spp. pelo método Filtração por Membrana com Eluição

| El <i>Legionella</i> spp. - Filtração por Membrana com Eluição | | | | | | | | | | | |
|---|------------|---------------|----------|----------|----------|----------|---------------|---------------|------------|---------|---------|
| <i>i</i> | Data | Amostra | n_{c1} | Analista | n_{c2} | Analista | $\log n_{c1}$ | $\log n_{c2}$ | $u^2_{R'}$ | u^2_d | u^2_o |
| 1 | 20-04-2018 | 1477+Lp: GVPC | 1,4E+02 | CR | 1,3E+02 | RP | 2,1399 | 2,1106 | 0,0004 | 0,0014 | -0,0010 |
| 2 | 11-05-2018 | MR La: BCYE | 1,4E+01 | RP | 1,0E+01 | CR | 1,1461 | 1,0000 | 0,0107 | 0,0157 | -0,0050 |
| 3 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 6,7E+01 | CL | 1,0E+02 | CR | 1,8261 | 2,0086 | 0,0167 | 0,0022 | 0,0144 |
| 4 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,0E+02 | CR | 1,2E+02 | RP | 2,0086 | 2,0755 | 0,0022 | 0,0017 | 0,0005 |
| 5 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,2E+02 | RP | 6,7E+01 | CL | 2,0755 | 1,8261 | 0,0311 | 0,0020 | 0,0291 |
| 6 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 2,2E+01 | CL | 7,6E+01 | RP | 1,3424 | 1,8808 | 0,1449 | 0,0038 | 0,1411 |
| 7 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 7,6E+01 | RP | 5,5E+01 | CR | 1,8808 | 1,7404 | 0,0099 | 0,0029 | 0,0070 |
| 8 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 5,5E+01 | CR | 2,2E+01 | CL | 1,7404 | 1,3424 | 0,0792 | 0,0049 | 0,0743 |
| 9 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 9,0E+00 | CR | 1,0E+01 | CL | 0,9542 | 1,0000 | 0,0010 | 0,0199 | -0,0188 |
| 10 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 1,0E+01 | CL | 1,2E+01 | RP | 1,0000 | 1,0792 | 0,0031 | 0,0171 | -0,0140 |
| 11 | 18-05-2018 | MR La: BCYE | 1,2E+01 | RP | 9,0E+00 | CR | 1,0792 | 0,9542 | 0,0078 | 0,0180 | -0,0102 |
| 12 | 18-05-2018 | MR La: GVPC | 1,8E+01 | RP | 1,6E+01 | CR | 1,2553 | 1,2041 | 0,0013 | 0,0111 | -0,0098 |
| 13 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 9,7E+01 | RP | 8,3E+01 | CR | 1,9868 | 1,9191 | 0,0023 | 0,0021 | 0,0002 |
| 14 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 8,3E+01 | CR | 5,6E+01 | CL | 1,9191 | 1,7482 | 0,0146 | 0,0027 | 0,0119 |
| 15 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 5,6E+01 | CL | 9,7E+01 | RP | 1,7482 | 1,9868 | 0,0285 | 0,0025 | 0,0260 |
| 16 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 3,4E+01 | CL | 3,6E+01 | RP | 1,5315 | 1,5563 | 0,0003 | 0,0054 | -0,0051 |
| 17 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 3,6E+01 | RP | 3,4E+01 | CR | 1,5563 | 1,5315 | 0,0003 | 0,0054 | -0,0051 |
| 18 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 3,4E+01 | CR | 3,4E+01 | CL | 1,5315 | 1,5315 | 0,0000 | 0,0055 | -0,0055 |
| 19 | 20-07-2018 | TORRE: 2699 | 1,0E+01 | RP | 1,0E+01 | CR | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 | 0,0189 | -0,0189 |

| El <i>Legionella</i> spp. - Filtração por Membrana com Eluição | | | |
|--|---------------|---------|-----------------|
| Médias | | 0,01865 | 0,00754 0,01111 |
| Variância Operacional | u^2_o | 0,0111 | |
| Variância Operacional Relativa | $u^2_{o,rel}$ | 0,0589 | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | u^2_d | 0,0075 | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | $u^2_{d,rel}$ | 0,0400 | |
| Incerteza Operacional | u_o | 0,1054 | |
| Incerteza Operacional Relativa | $u_{o,rel}$ | 0,2427 | 24% |
| Incerteza Intrínseca | u_d | 0,0868 | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | $u_{d,rel}$ | 0,1999 | 20% |
| Incerteza combinada | $u_c (y)$ | 0,1366 | |
| Determinar a incerteza combinada [$u_c(y)$] de um novo resultado com confirmação parcial [n_c]: | | | |
| Nº de colónias presuntivas | n_c | 50 | |
| Nº de colónias repicadas para confirmação | n_z | 5 | |
| Nº de colónias positivas confirmadas | n_k | 4 | |
| Incerteza combinada | $u_c(y)$ | 0,3590 | |
| Incerteza da confirmação parcial $u_{d,rel}$ | | 0,2646 | 26% |
| Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$ | | 0,8269 | 83% |
| Incerteza combinada relativa expandida | | 1,6538 | 165% |
| MR: Material de referência; La: <i>Legionella anisa</i>, Lp: <i>Legionella pneumophila</i>; GVPC e BCYE: meios de cultura | | | |

Da mesma forma, está a ser calculada a EI por método, para o parâmetro *Legionella pneumophila* (tabelas 23, 24 e 25).

Tabela 22 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para *Legionella pneumophila* pelo método Directo

| El <i>Legionella pneumophila</i> - Método Directo | | | | | | | | | | | |
|--|------------|-------------|----------|----------|----------|----------|---------------|---------------|------------|---------|---------|
| <i>i</i> | Data | Amostra | n_{c1} | Analista | n_{c2} | Analista | $\log n_{c1}$ | $\log n_{c2}$ | $u^2_{R'}$ | u^2_d | u^2_o |
| 1 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 2,9E+02 | RP | 2,4E+02 | CR | 2,4564 | 2,3802 | 0,0029 | 0,0007 | 0,0022 |
| 2 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,7E+02 | RP | 9,4E+01 | CR | 2,2304 | 1,9731 | 0,0331 | 0,0014 | 0,0317 |
| 3 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,5E+02 | CR | 2,2E+02 | RP | 2,1847 | 2,3385 | 0,0118 | 0,0010 | 0,0108 |
| 4 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 2,2E+02 | RP | 1,4E+02 | CL | 2,3385 | 2,1367 | 0,0203 | 0,0011 | 0,0193 |
| 5 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,4E+02 | CL | 1,5E+02 | CR | 2,1367 | 2,1847 | 0,0012 | 0,0013 | -0,0002 |
| 6 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 9,5E+01 | RP | 8,0E+01 | CR | 1,9777 | 1,9031 | 0,0028 | 0,0022 | 0,0006 |
| 7 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 8,0E+01 | CR | 8,8E+01 | CL | 1,9031 | 1,9445 | 0,0009 | 0,0022 | -0,0014 |
| 8 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 8,8E+01 | CL | 9,5E+01 | RP | 1,9445 | 1,9777 | 0,0006 | 0,0021 | -0,0015 |
| 9 | 13-07-2018 | MR Lp: BCYE | 9,3E+01 | CR | 2,1E+02 | RP | 1,9685 | 2,3243 | 0,0633 | 0,0012 | 0,0621 |
| 10 | 13-07-2018 | MR Lp: BCYE | 9,5E+01 | CR | 2,6E+02 | RP | 1,9777 | 2,4200 | 0,0978 | 0,0011 | 0,0967 |
| 11 | 13-07-2018 | MR Lp: GVPC | 8,0E+01 | CR | 1,2E+02 | RP | 1,9031 | 2,0607 | 0,0124 | 0,0019 | 0,0105 |

| El <i>Legionella pneumophila</i> - Método Directo | | | | | | | | | | | |
|---|------------|-------------|---------|----|---------|----|--------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| 12 | 09-08-2018 | MR Lp: BCYE | 4,4E+01 | RP | 4,3E+01 | CL | 1,6435 | 1,6335 | 0,0000 | 0,0043 | -0,0043 |
| 13 | 09-08-2018 | MR Lp: BCYE | 4,3E+01 | CL | 4,4E+01 | CR | 1,6335 | 1,6435 | 0,0000 | 0,0043 | -0,0043 |
| 14 | 09-08-2018 | MR Lp: BCYE | 4,4E+01 | CR | 4,4E+01 | RP | 1,6435 | 1,6435 | 0,0000 | 0,0043 | -0,0043 |
| 15 | 09-08-2018 | MR Lp: GVPC | 2,0E+01 | RP | 2,6E+01 | CL | 1,3010 | 1,4150 | 0,0065 | 0,0082 | -0,0017 |
| 16 | 09-08-2018 | MR Lp: GVPC | 2,6E+01 | CL | 2,7E+01 | CR | 1,4150 | 1,4314 | 0,0001 | 0,0071 | -0,0070 |
| 17 | 09-08-2018 | MR Lp: GVPC | 2,7E+01 | CR | 2,0E+01 | RP | 1,4314 | 1,3010 | 0,0085 | 0,0080 | 0,0005 |
| Médias | | | | | | | | | 0,01543 | 0,00309 | 0,01234 |
| Variância Operacional | | | | | | | | u^2_o | 0,0123 | | |
| Variância Operacional Relativa | | | | | | | | $u^2_{o,rel}$ | 0,0654 | | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | | | | | | | | u^2_d | 0,0031 | | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | | | | | | | | $u^2_{d,rel}$ | 0,0164 | | |
| Incerteza Operacional | | | | | | | | u_o | 0,1111 | | |
| Incerteza Operacional Relativa | | | | | | | | $u_{o,rel}$ | 0,2558 | 26% | |
| Incerteza Intrínseca | | | | | | | | u_d | 0,0556 | | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | | | | | | | | $u_{d,rel}$ | 0,1280 | 13% | |
| Incerteza combinada | | | | | | | | $u_c(y)$ | 0,1242 | | |
| Determinar a incerteza combinada $[u_c(y)]$ de um novo resultado com confirmação parcial $[n_c]$: | | | | | | | | | | | |
| Nº de colónias presuntivas | | | | | | | | n_c | 50 | | |
| Nº de colónias repicadas para confirmação | | | | | | | | n_z | 5 | | |
| Nº de colónias positivas confirmadas | | | | | | | | n_k | 4 | | |
| Incerteza combinada | | | | | | | | $u_c(y)$ | 0,3680 | | |
| Incerteza da confirmação parcial $u_{d,rel}$ | | | | | | | | 0,2646 | 26% | | |
| Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$ | | | | | | | | 0,8475 | 85% | | |
| Incerteza combinada relativa expandida | | | | | | | | 1,6949 | 169% | | |
| MR: Material de referência; Lp: <i>Legionella pneumophila</i>; GVPC e BCYE: meios de cultura | | | | | | | | | | | |

Tabela 23 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para *Legionella pneumophila* pelo método Filtração por Membrana

| El <i>Legionella pneumophila</i> Filtração por Membrana | | | | | | | | | | | |
|--|------------|-------------|----------|----------|----------|----------|---------------|---------------|------------|---------|---------|
| <i>i</i> | Data | Amostra | n_{c1} | Analista | n_{c2} | Analista | $\log n_{c1}$ | $\log n_{c2}$ | $u^2_{R'}$ | u^2_d | u^2_o |
| 1 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 8,7E+01 | CR | 1,9E+02 | CL | 1,9395 | 2,2672 | 0,0537 | 0,0014 | 0,0523 |
| 2 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,9E+02 | CL | 1,9E+02 | RP | 2,2672 | 2,2765 | 0,0000 | 0,0010 | -0,0010 |
| 3 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,9E+02 | RP | 8,7E+01 | CR | 2,2765 | 1,9395 | 0,0568 | 0,0014 | 0,0554 |
| 4 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,3E+02 | CR | 1,5E+02 | RP | 2,1072 | 2,1790 | 0,0026 | 0,0014 | 0,0012 |
| 5 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,5E+02 | RP | 1,4E+02 | CL | 2,1790 | 2,1303 | 0,0012 | 0,0013 | -0,0001 |
| 6 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 1,4E+02 | CL | 1,3E+02 | CR | 2,1303 | 2,1072 | 0,0003 | 0,0014 | -0,0012 |
| 7 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 6,9E+01 | CR | 1,2E+02 | RP | 1,8388 | 2,0645 | 0,0254 | 0,0020 | 0,0234 |

| El <i>Legionella pneumophila</i> Filtração por Membrana | | | | | | | | | | | |
|---|------------|-------------|---------|----|---------|----|--------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| 8 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,2E+02 | RP | 8,1E+01 | CL | 2,0645 | 1,9085 | 0,0122 | 0,0019 | 0,0102 |
| 9 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 8,1E+01 | CL | 6,9E+01 | CR | 1,9085 | 1,8388 | 0,0024 | 0,0025 | -0,0001 |
| 10 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 5,9E+01 | CR | 6,5E+01 | RP | 1,7709 | 1,8129 | 0,0009 | 0,0030 | -0,0022 |
| 11 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 6,5E+01 | RP | 5,3E+01 | CL | 1,8129 | 1,7243 | 0,0039 | 0,0032 | 0,0007 |
| 12 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 5,3E+01 | CL | 5,9E+01 | CR | 1,7243 | 1,7709 | 0,0011 | 0,0034 | -0,0023 |
| 13 | 09-08-2018 | MR Lp: BCYE | 4,2E+01 | RP | 3,1E+01 | CL | 1,6232 | 1,4914 | 0,0087 | 0,0052 | 0,0035 |
| 14 | 09-08-2018 | MR Lp: BCYE | 3,1E+01 | CL | 4,2E+01 | CR | 1,4914 | 1,6232 | 0,0087 | 0,0052 | 0,0035 |
| 15 | 09-08-2018 | MR Lp: BCYE | 4,2E+01 | CR | 4,2E+01 | RP | 1,6232 | 1,6232 | 0,0000 | 0,0045 | -0,0045 |
| 16 | 09-08-2018 | MR Lp: GVPC | 2,6E+01 | RP | 3,3E+01 | CL | 1,4150 | 1,5185 | 0,0054 | 0,0064 | -0,0010 |
| 17 | 09-08-2018 | MR Lp: GVPC | 3,3E+01 | CL | 2,3E+01 | CR | 1,5185 | 1,3617 | 0,0123 | 0,0067 | 0,0056 |
| 18 | 09-08-2018 | MR Lp: GVPC | 2,3E+01 | CR | 2,6E+01 | RP | 1,3617 | 1,4150 | 0,0014 | 0,0077 | -0,0063 |
| <i>Médias</i> | | | | | | | | | 0,01094 | 0,00331 | 0,00763 |
| Variância Operacional | | | | | | | | u^2_o | 0,0076 | | |
| Variância Operacional Relativa | | | | | | | | $u^2_{o,rel}$ | 0,0404 | | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | | | | | | | | u^2_d | 0,0033 | | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | | | | | | | | $u^2_{d,rel}$ | 0,0176 | | |
| Incerteza Operacional | | | | | | | | u_o | 0,0873 | | |
| Incerteza Operacional Relativa | | | | | | | | $u_{o,rel}$ | 0,2011 | 20% | |
| Incerteza Intrínseca | | | | | | | | u_d | 0,0575 | | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | | | | | | | | $u_{d,rel}$ | 0,1325 | 13% | |
| Incerteza combinada | | | | | | | | $u_c (y)$ | 0,1046 | | |
| Determinar a incerteza combinada $[u_c(y)]$ de um novo resultado com confirmação parcial $[n_c]$: | | | | | | | | | | | |
| Nº de colónias presuntivas | | | | | | | | n_c | 50 | | |
| Nº de colónias repicadas para confirmação | | | | | | | | n_z | 5 | | |
| Nº de colónias positivas confirmadas | | | | | | | | n_k | 4 | | |
| Incerteza combinada | | | | | | | | $u_c(y)$ | 0,3323 | | |
| Incerteza da confirmação parcial $u_{d,rel}$ | | | | | | | | 0,2646 | 26% | | |
| Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$ | | | | | | | | 0,7654 | 77% | | |
| Incerteza combinada relativa expandida | | | | | | | | 1,5307 | 153% | | |
| MR: Material de referência; Lp: <i>Legionella pneumophila</i>; GVPC e BCYE: meios de cultura | | | | | | | | | | | |

Tabela 24 - Resultados dos ensaios em paralelo e determinação da EI para *Legionella pneumophila* pelo método Filtração por Membrana com Eluição

| El <i>Legionella pneumophila</i> - Filtração por Membrana com Eluição | | | | | | | | | | | |
|--|------------|---------------------|----------|----------|----------|----------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>i</i> | Data | Amostra | n_{c1} | Analista | n_{c2} | Analista | $\log n_{c1}$ | $\log n_{c2}$ | $u^2_{R'}$ | u^2_d | u^2_o |
| 1 | 20-04-2018 | 1477+Lp: GVPC | 1,4E+02 | CR | 1,3E+02 | RP | 2,1399 | 2,1106 | 0,0004 | 0,0014 | -0,0010 |
| 2 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 6,7E+01 | CL | 1,0E+02 | CR | 1,8261 | 2,0086 | 0,0167 | 0,0022 | 0,0144 |
| 3 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,0E+02 | CR | 1,2E+02 | RP | 2,0086 | 2,0755 | 0,0022 | 0,0017 | 0,0005 |
| 4 | 11-05-2018 | MR Lp: BCYE | 1,2E+02 | RP | 6,7E+01 | CL | 2,0755 | 1,8261 | 0,0311 | 0,0020 | 0,0291 |
| 5 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 2,2E+01 | CL | 7,6E+01 | RP | 1,3424 | 1,8808 | 0,1449 | 0,0038 | 0,1411 |
| 6 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 7,6E+01 | RP | 5,5E+01 | CR | 1,8808 | 1,7404 | 0,0099 | 0,0029 | 0,0070 |
| 7 | 11-05-2018 | MR Lp: GVPC | 5,5E+01 | CR | 2,2E+01 | CL | 1,7404 | 1,3424 | 0,0792 | 0,0049 | 0,0743 |
| 8 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 9,7E+01 | RP | 8,3E+01 | CR | 1,9868 | 1,9191 | 0,0023 | 0,0021 | 0,0002 |
| 9 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 8,3E+01 | CR | 5,6E+01 | CL | 1,9191 | 1,7482 | 0,0146 | 0,0027 | 0,0119 |
| 10 | 18-05-2018 | MR Lp: BCYE | 5,6E+01 | CL | 9,7E+01 | RP | 1,7482 | 1,9868 | 0,0285 | 0,0025 | 0,0260 |
| 11 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 3,4E+01 | CL | 3,6E+01 | RP | 1,5315 | 1,5563 | 0,0003 | 0,0054 | -0,0051 |
| 12 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 3,6E+01 | RP | 3,4E+01 | CR | 1,5563 | 1,5315 | 0,0003 | 0,0054 | -0,0051 |
| 13 | 18-05-2018 | MR Lp: GVPC | 3,4E+01 | CR | 3,4E+01 | CL | 1,5315 | 1,5315 | 0,0000 | 0,0055 | -0,0055 |
| 14 | 20-07-2018 | TORRE: 2699 Lp 2-14 | 5,0E+00 | CR | 1,0E+01 | RP | 0,6990 | 1,0000 | 0,0453 | 0,0251 | 0,0202 |
| Médias | | | | | | | | | 0,02684 | 0,00484 | 0,02200 |
| Variância Operacional | | | | | | | | | u^2_o | 0,0220 | |
| Variância Operacional Relativa | | | | | | | | | $u^2_{o,rel}$ | 0,1166 | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | | | | | | | | | u^2_d | 0,0048 | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | | | | | | | | | $u^2_{d,rel}$ | 0,0257 | |
| Incerteza Operacional | | | | | | | | | u_o | 0,1483 | |
| Incerteza Operacional Relativa | | | | | | | | | $u_{o,rel}$ | 0,3415 | 34% |
| Incerteza Intrínseca | | | | | | | | | u_d | 0,0696 | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | | | | | | | | | $u_{d,rel}$ | 0,1602 | 16% |
| Incerteza combinada | | | | | | | | | $u_c(y)$ | 0,1638 | |
| Determinar a incerteza combinada $[u_c(y)]$ de um novo resultado com confirmação parcial $[n_c]$: | | | | | | | | | | | |
| Nº de colónias presuntivas | | | | | | | | | n_c | 50 | |
| Nº de colónias repicadas para confirmação | | | | | | | | | n_z | 5 | |
| Nº de colónias positivas confirmadas | | | | | | | | | n_k | 4 | |
| Incerteza combinada | | | | | | | | | $u_c(y)$ | 0,4320 | |

| El <i>Legionella pneumophila</i> - Filtração por Membrana com Eluição | | | | |
|---|--------|------|--|--|
| Incerteza da confirmação parcial $u_{d,rel}$ | 0,2646 | 26% | | |
| Incerteza combinada relativa do resultado $u_c(y)$ | 0,9949 | 99% | | |
| Incerteza combinada relativa expandida | 1,9898 | 199% | | |
| MR: Material de referência; Lp: <i>Legionella pneumophila</i>; GVPC e BCYE: meios de cultura | | | | |

Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 26, na qual é possível verificar as incertezas operacional e intrínseca relativas, bem como a incerteza combinada. Tal como já foi referido anteriormente, apenas o parâmetro *Legionella* spp. está concluído pelo método Directo e FM, os restantes o laboratório ainda não dispõe dos resultados dos 30 ensaios em paralelo entre analistas.

Tabela 25 - Resumo dos resultados obtidos para a Estimativa de Incertza por parâmetro para cada método

| | | Métodos | | | | | |
|---|---------------|----------------|-----|-----------|-----|------------|-----|
| El <i>Legionella</i> spp. | | Directo | | FM | | FME | |
| Variância Operacional | u^2_o | 0,0266 | | 0,0160 | | 0,0111 | |
| Variância Operacional Relativa | $u^2_{o,rel}$ | 0,1409 | | 0,0849 | | 0,0589 | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | u^2_d | 0,0024 | | 0,0043 | | 0,0075 | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | $u^2_{d,rel}$ | 0,0127 | | 0,0228 | | 0,0400 | |
| Incerteza Operacional | u_o | 0,1630 | | 0,1265 | | 0,1054 | |
| Incerteza Operacional Relativa | $u_{o,rel}$ | 0,3754 | 38% | 0,2913 | 29% | 0,2427 | 24% |
| Incerteza Intrínseca | u_d | 0,0489 | | 0,0655 | | 0,0868 | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | $u_{d,rel}$ | 0,1127 | 11% | 0,1508 | 15% | 0,1999 | 20% |
| Incerteza combinada | $u_c(y)$ | 0,1702 | | 0,1425 | | 0,1366 | |
| El <i>Legionella pneumophila</i> | | Directo | | FM | | FME | |
| Variância Operacional | u^2_o | 0,0123 | | 0,0076 | | 0,0220 | |
| Variância Operacional Relativa | $u^2_{o,rel}$ | 0,0654 | | 0,0404 | | 0,1166 | |
| Variância Intrínseca (da distribuição) | u^2_d | 0,0031 | | 0,0033 | | 0,0048 | |
| Variância Intrínseca Relativa (da distribuição) | $u^2_{d,rel}$ | 0,0164 | | 0,0176 | | 0,0257 | |
| Incerteza Operacional | u_o | 0,1111 | | 0,0873 | | 0,1483 | |
| Incerteza Operacional Relativa | $u_{o,rel}$ | 0,2558 | 26% | 0,2011 | 20% | 0,3415 | 34% |
| Incerteza Intrínseca | u_d | 0,0556 | | 0,0575 | | 0,0696 | |
| Incerteza Intrínseca Relativa | $u_{d,rel}$ | 0,1280 | 13% | 0,1325 | 13% | 0,1602 | 16% |
| Incerteza combinada | $u_c(y)$ | 0,1242 | | 0,1046 | | 0,1638 | |

7.3.3 Ensaios com Material de Referência - Produtividade

Os ensaios com Material de Referência permitiram que as analistas do laboratório se familiarizassem com o aspecto e comportamento das colónias de *Legionella*. Por outro lado, o MR é utilizado habitualmente para determinação da produtividade dos meios de cultura utilizados para determinação desses parâmetros.

A produtividade dos meios de cultura é testada aquando a preparação do meio de cultura e mensalmente, ao longo da sua utilização. Para meio BCYE utiliza-se uma suspensão de *Legionella pneumophila* ATCC 33152 - WDCM 00107, marca Ielab, referência 990477, enquanto a produtividade do meio GVCP é avaliada com uma suspensão de *Legionella pneumophila* e também com uma suspensão de *Legionella anisa* ATCC 35292 – WDCM 00106 marca Ielab, referência 990537.

A produtividade (equação 15) é calculada de acordo com a norma ISO 11133:2014 e não é mais do que a razão entre a contagem no meio de cultura em avaliação (N_s) e no meio de cultura não selectivo ou no meio de cultura já validado (N_0):

$$P_r = \frac{N_s}{N_0} \quad (\text{eq 15})$$

De acordo com a já referida norma, a produtividade deve ser sempre inferior a 1.4 e deve ser superior a 0.5, quando a comparação é realizada entre um meio de cultura selectivo e outro não selectivo, como no caso do GVPC face a BCYE e deve ser superior a 0.7 quando se comparam meios de cultura não selectivos, como no caso do BCYE.

A determinação da produtividade implica a elaboração de uma Carta Guia com os primeiros 20 valores obtidos, a partir dos quais se estabelece os limites, ou seja, critérios de aceitação para os meios de cultura. No entanto estes limites são apenas representativos e devem ser sempre inferiores aos estabelecidos pela Norma. Esta carta deve ser revista a cada 30 valores.

Actualmente, o laboratório ainda está a elaborar a primeira Carta Guia para o meio BCYE, pelo que a tabela 27 apresenta apenas 12 valores de produtividade e os limites e o gráfico da Carta Guia (figura 17) são ainda provisórios.

Para elaboração da Carta Guia determina-se a média e o desvio padrão dos resultados de produtividade obtidos:

$$\bar{r} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_i = \frac{r_1 + r_2 + \dots + r_n}{n} \quad (\text{eq 16})$$

$$\bar{R} = \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=2}^n |r_i - r_{i-1}| \quad (\text{eq 17})$$

$$s = 0,8865 \times \bar{R} = \frac{\bar{R}}{1,128} \quad (\text{eq 18})$$

Onde: \bar{r} é a média das produtividades, \bar{R} é a amplitude da média, s é o desvio padrão e n o número de ensaios de produtividade considerado.

Os limites da Carta Guia são determinados considerando 95% ($\pm 2s$) para os Limites de Aviso e 99% ($\pm 3s$) para os Limites de Acção.

Tabela 26 - Determinação da Produtividade do meio de cultura BCYE

| ISO 11133:2014 | | | Meio BCYE em teste | | | Meio BCYE | | | Analista | | | |
|----------------|------------|---------|--------------------|-----|-----|---------------|-----|-----|----------|-----------|----------|-----------------------|
| | | | Contagens (C: ufc) | | | Lote Anterior | | | | | | |
| <i>i</i> | Data | Amostra | Lote | C1 | C2 | Lote | C1 | C2 | | $P_r=r_i$ | Aferição | $R = r_i - r_{i-1} $ |
| 1 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 105 | 142 | 11-04 | 112 | 123 | CR | 1,05 | 1,05 | - |
| 2 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 105 | 142 | 17-04 | 114 | 126 | CR | 1,03 | 1,03 | 0,02 |
| 3 | 11-05-2018 | Lp | 17-04 | 114 | 126 | 11-04 | 112 | 123 | CR | 1,02 | 1,02 | 0,01 |
| 4 | 18-05-2018 | Lp | 14-05 | 82 | 71 | 03-05 | 99 | 68 | CR | 0,92 | 0,92 | 0,11 |
| 5 | 25-05-2018 | Lp | 23-05 | 12 | | 14-05 | 16 | | CR | 0,75 | 0,75 | 0,17 |
| 6 | 28-06-2018 | Lp | 12-06 | 86 | 87 | 23-05 | 125 | 124 | RP | 0,69 | | |
| 7 | 13-07-2018 | Lp | 14-05 | 113 | 150 | 23-05 | 93 | 118 | RP | 1,25 | 1,25 | 0,50 |
| 8 | 13-07-2018 | Lp | 12-06 | 58 | 48 | 23-05 | 34 | 59 | CR | 1,14 | 1,14 | 0,11 |
| 9 | 13-07-2018 | Lp | 12-06 | 58 | 48 | 14-05 | 58 | 37 | CR | 1,12 | 1,12 | 0,02 |
| 10 | 13-07-2018 | Lp | 23-05 | 34 | 59 | 14-05 | 58 | 37 | CR | 0,98 | 0,98 | 0,14 |
| 11 | 20-07-2018 | Lp | 12-06 | 10 | 3 | 23-05 | 11 | 20 | CR | 0,42 | | |
| 12 | 09-08-2018 | Lp | 26-07 | 43 | 45 | 14-05 | 23 | 29 | CR | 1,69 | | |

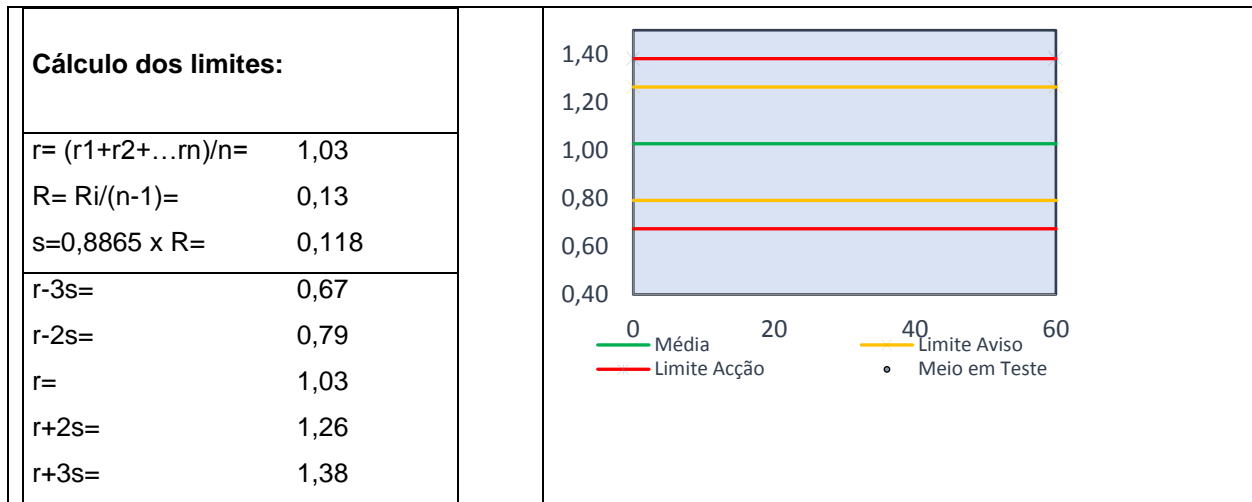


Figura 17 - Cálculo dos limites e respectivo gráfico da Carta Guia de Produtividade do meio de cultura BCYE

Para o meio de cultura GVPC são elaboradas duas Cartas Guia uma para o parâmetro de *Legionella* spp. na qual se determina a produtividade de *Legionella anisa* (tabela 28) e a outra para *Legionella pneumophila* (tabela 29).

Tabela 27 - Determinação da Produtividade do meio de cultura GVPC para *Legionella* spp. com *Legionella anisa*

| i | ISO 11133:2014 | | Meio GVPC em teste | | Meio BCYE | | Analista | | $P_r=r_i$ | Aferição | $R = r_i - r_{i-1} $ | |
|----|----------------|---------|--------------------|----|-----------|-------|----------|-----|-----------|----------|-----------------------|------|
| | Data | Amostra | Lote | C1 | C2 | Lote | C1 | C2 | | | | |
| 1 | 11-05-2018 | La | 17-04 | 18 | 20 | 17-04 | 25 | 22 | CR | 0,81 | 0,81 | - |
| 2 | 11-05-2018 | La | 17-04 | 15 | 18 | 17-04 | 53 | 60 | CR | 0,29 | | |
| 3 | 11-05-2018 | La | 03-05 | 29 | 25 | 03-05 | 39 | 39 | RP | 0,69 | 0,69 | 0,12 |
| 4 | 11-05-2018 | La | 11-04 | 39 | | 11-04 | 65 | 61 | CR | 0,62 | 0,62 | 0,07 |
| 5 | 11-05-2018 | La | 11-04 | 39 | | 17-04 | 60 | 53 | CR | 0,69 | 0,69 | 0,07 |
| 6 | 11-05-2018 | La | 11-04 | 39 | | 03-05 | 48 | 47 | CR | 0,82 | 0,82 | 0,13 |
| 7 | 11-05-2018 | La | 17-04 | 15 | 18 | 03-05 | 48 | 47 | CR | 0,35 | | |
| 8 | 11-05-2018 | La | 17-04 | 15 | 18 | 11-04 | 65 | 61 | CR | 0,26 | | |
| 9 | 11-05-2018 | La | 03-05 | 12 | 14 | 03-05 | 37 | 30 | CL | 0,39 | | |
| 10 | 18-05-2018 | La | 14-05 | 50 | 62 | 14-05 | 94 | 74 | CR | 0,67 | 0,67 | 0,15 |
| 11 | 18-05-2018 | La | 03-05 | 41 | 58 | 14-05 | 94 | 74 | CR | 0,59 | 0,59 | 0,08 |
| 12 | 18-05-2018 | La | 14-05 | 18 | 24 | 14-05 | 16 | 20 | CR | 1,17 | 1,17 | 0,58 |
| 13 | 18-05-2018 | La | 14-05 | 53 | 63 | 14-05 | 65 | 67 | RP | 0,88 | 0,88 | 0,29 |
| 14 | 18-05-2018 | La | 14-05 | 32 | 36 | 14-05 | 48 | 39 | RP | 0,78 | 0,78 | 0,10 |
| 15 | 18-05-2018 | La | 14-05 | 47 | 47 | 14-05 | 68 | 65 | CL | 0,71 | 0,71 | 0,07 |
| 16 | 28-06-2018 | La | 12-06 | 50 | 64 | 23-05 | 53 | 65 | RP | 0,97 | 0,97 | 0,26 |
| 17 | 13-07-2018 | La | 09-07 | 78 | 84 | 14-05 | 117 | 120 | RP | 0,68 | 0,68 | 0,28 |
| 18 | 13-07-2018 | La | 09-07 | 78 | 84 | 23-05 | 108 | 111 | RP | 0,74 | 0,74 | 0,06 |
| 19 | 13-07-2018 | La | 09-07 | 53 | 85 | 12-06 | 128 | 83 | CR | 0,65 | 0,65 | 0,09 |
| 20 | 20-07-2018 | La | 18-07 | 33 | 35 | 12-06 | 40 | 58 | CR | 0,69 | 0,69 | 0,04 |
| 1 | 09-08-2018 | La | 08-08 | 54 | 44 | 26-07 | 60 | 48 | CR | 0,91 | 0,91 | 0,21 |
| 2 | 09-08-2018 | La | 08-08 | 58 | | 26-07 | 62 | | CL | 0,94 | 0,94 | 0,03 |
| 3 | 09-08-2018 | La | 08-08 | 64 | | 26-07 | 71 | | RP | 0,90 | 0,90 | 0,03 |

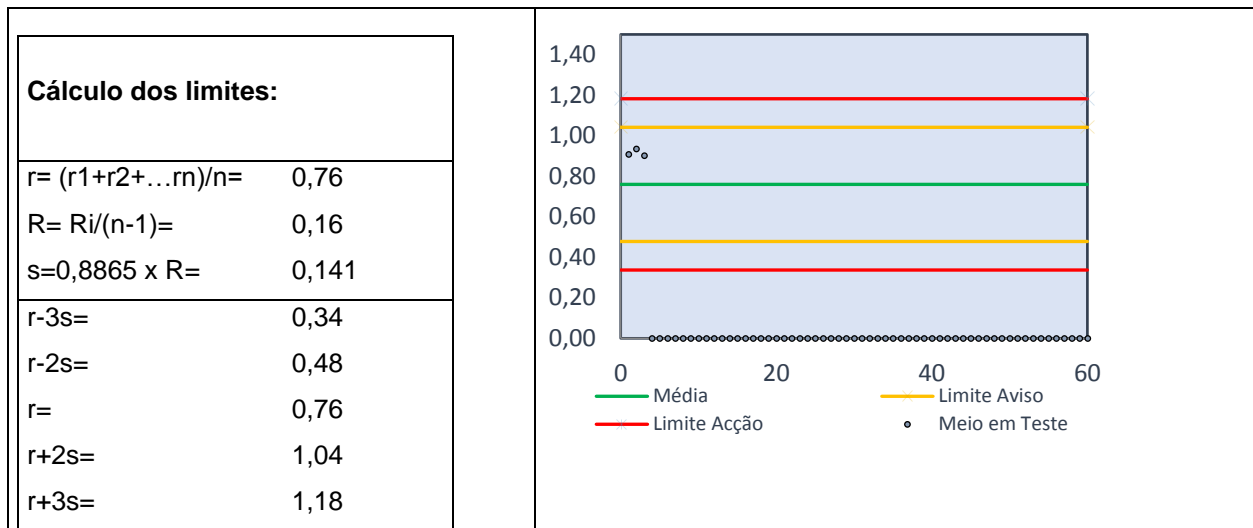


Figura 18 - Cálculo dos limites e respectivo gráfico da Carta Guia de Produtividade do meio de cultura GVPC para *Legionella anisa*

Ao elaborar a Carta Guia para o meio GVPC com a cultura de *Legionella pneumophila* o laboratório detectou valores muito inferiores ao estabelecido pela Norma, pelo que efectuou uma primeira revisão à carta de forma a obter limites razoáveis. Esta revisão ocorreu ao fim de 29 valores, dos quais alguns foram rejeitados (tabela 28).

Tabela 28 - Determinação da Produtividade do meio de cultura GVPC para *Legionella pneumophila*

| i | ISO 11133:2014 | | Meio GVPC em teste | | Meio BCYE | | Analista | | $P_r=r_i$ | Aferição | $R = r_i - r_{i-1} $ | |
|----|----------------|---------|--------------------|----|-----------|-------|----------|-----|-----------|----------|-----------------------|------|
| | Data | Amostra | Lote | C1 | C2 | Lote | C1 | C2 | | | | |
| 1 | 11-05-2018 | Lp | 17-04 | 33 | 22 | 17-04 | 40 | 62 | CR | 0,54 | 0,54 | - |
| 2 | 11-05-2018 | Lp | 17-04 | 67 | 61 | 17-04 | 47 | 45 | CR | 1,39 | | |
| 3 | 11-05-2018 | Lp | 17-04 | 39 | 55 | 17-04 | 114 | 126 | CR | 0,39 | | |
| 4 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 85 | 85 | 03-05 | 145 | 141 | RP | 0,59 | 0,59 | 0,59 |
| 5 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 82 | 69 | 03-05 | 99 | 90 | RP | 0,80 | 0,80 | 0,20 |
| 6 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 30 | 46 | 03-05 | 50 | 69 | RP | 0,64 | 0,64 | 0,16 |
| 7 | 11-05-2018 | Lp | 17-04 | 39 | 55 | 03-05 | 105 | 142 | CR | 0,38 | | |
| 8 | 11-05-2018 | Lp | 17-04 | 39 | 55 | 11-04 | 112 | 123 | CR | 0,40 | | |
| 9 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 52 | 66 | 17-04 | 47 | 45 | CR | 1,28 | | |
| 10 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 52 | 66 | 03-05 | 105 | 142 | CR | 0,48 | | |
| 11 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 52 | 66 | 11-04 | 112 | 123 | CR | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| 12 | 11-05-2018 | Lp | 03-05 | 60 | 75 | 03-05 | 87 | 98 | CL | 0,73 | 0,73 | 0,23 |
| 13 | 18-05-2018 | Lp | 14-05 | 45 | 35 | 14-05 | 82 | 71 | CR | 0,52 | 0,52 | 0,21 |
| 14 | 18-05-2018 | Lp | 03-05 | 48 | 44 | 03-05 | 99 | 68 | CR | 0,55 | 0,55 | 0,03 |
| 15 | 18-05-2018 | Lp | 14-05 | 45 | 35 | 03-05 | 99 | 68 | CR | 0,48 | | |
| 16 | 18-05-2018 | LP | 03-05 | 48 | 44 | 14-05 | 82 | 71 | CR | 0,60 | 0,60 | 0,05 |
| 17 | 18-05-2018 | Lp | 14-05 | 23 | 36 | 14-05 | 25 | 44 | CR | 0,86 | 0,86 | 0,25 |
| 18 | 18-05-2018 | Lp | 14-05 | 42 | 53 | 14-05 | 99 | 119 | RP | 0,44 | | |
| 19 | 18-05-2018 | LP | 14-05 | 32 | 33 | 14-05 | 54 | 62 | RP | 0,56 | 0,56 | 0,29 |
| 20 | 18-05-2018 | Lp | 14-05 | 46 | 42 | 14-05 | 60 | 77 | CL | 0,64 | 0,64 | 0,08 |
| 1 | 18-05-2018 | Lp | 14-5 | 19 | 34 | 14-05 | 40 | 41 | CL | 0,65 | 0,65 | 0,01 |
| 2 | 28-06-2018 | Lp | 12-06 | 50 | 64 | 12-06 | 67 | 82 | RP | 0,77 | 0,77 | 0,11 |
| 3 | 13-07-2018 | LP | 09-07 | 57 | 58 | 14-05 | 113 | 150 | RP | 0,44 | | |
| 4 | 13-07-2018 | Lp | 09-07 | 57 | 58 | 23-05 | 93 | 118 | RP | 0,55 | 0,55 | 0,22 |
| 5 | 13-07-2018 | Lp | 09-07 | 42 | 38 | 12-06 | 58 | 37 | CR | 0,84 | 0,84 | 0,30 |
| 6 | 13-07-2018 | Lp | 09-07 | 42 | 38 | 14-05 | 34 | 59 | CR | 0,86 | 0,86 | 0,02 |
| 7 | 13-07-2018 | Lp | 09-07 | 42 | 38 | 23-05 | 34 | 59 | CR | 0,86 | 0,86 | 0,00 |
| 8 | 20-07-2018 | Lp | 18-07 | 8 | | 12-06 | 13 | | CR | 0,62 | 0,62 | 0,24 |
| 9 | 09-08-2018 | Lp | 26-07 | 24 | 30 | 26-07 | 43 | 45 | CR | 0,61 | 0,61 | 0,00 |
| 10 | 09-08-2018 | Lp | 08-08 | 23 | 19 | 26-07 | 43 | 45 | CR | 0,48 | | |
| 11 | 09-08-2018 | Lp | 08-08 | 20 | | 26-07 | 44 | | RP | 0,48 | | |
| 12 | 09-08-2018 | Lp | 08-08 | 26 | | 26-07 | 43 | | CL | 0,60 | 0,60 | 0,01 |
| 13 | 09-08-2018 | Lp | 08-08 | 26 | | 26-07 | 42 | | RP | 0,62 | 0,62 | 0,01 |
| 14 | 09-08-2018 | Lp | 08-08 | 23 | | 26-07 | 42 | | CR | 0,55 | 0,55 | 0,07 |

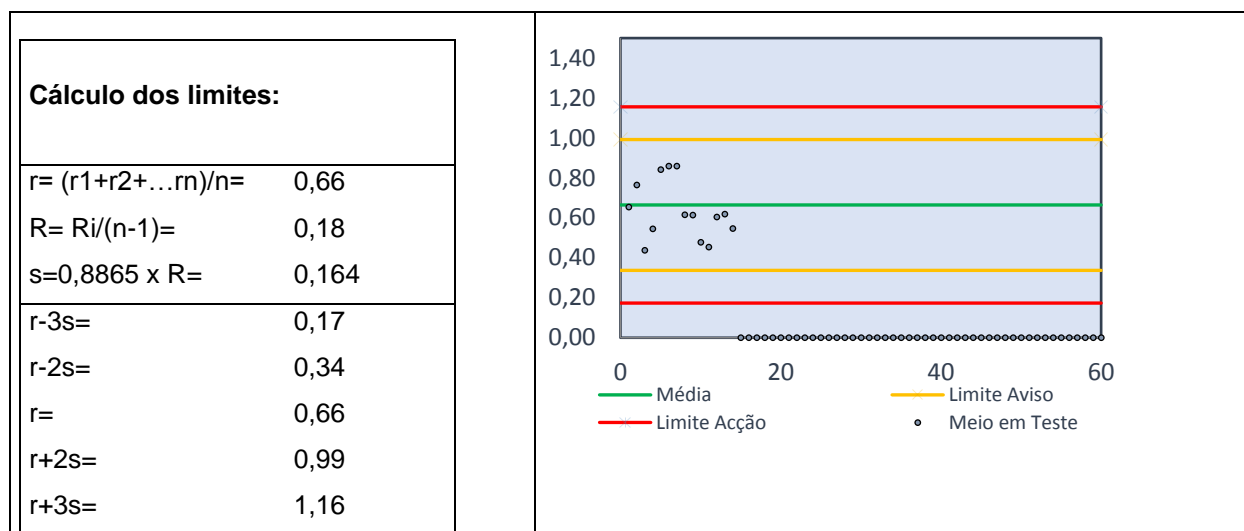


Figura 19 - Cálculo dos limites e respectivo gráfico da Carta Guia de Produtividade do meio de cultura GVPC para *Legionella pneumophila*

A elaboração da Carta Guia permite avaliar a *performance* do meio de cultura, de forma rápida e detectar tendências que podem ter influência directa no resultado das análises de *Legionella*. Assim, o laboratório tem como método de trabalho avaliar as causas e consequências sempre que:

- 1 valor ultrapassar os limites de acção;
- 2 em 3 valores ultrapassarem os limites de aviso;
- 6 valores em linha a aumentarem ou diminuírem consecutivamente;
- 9 valores em linha acima ou abaixo da média.

7.3.4 Avaliação Externa

A avaliação externa é uma exigência legal e requisito obrigatório de Acreditação. Pretende evidenciar a competência e qualidade dos resultados. Pode ser realizada de diferentes formas, no entanto, o processo de auditoria e a participação em Ensaios Interlaboratoriais (EIL) são os mais eficazes.

Participação em EIL

Os EIL são ensaios de aptidão ou testes de proficiência, organizados por entidades independentes. Estes ensaios permitem detectar erros sistemáticos e validar os métodos implementados no laboratório. Trata-se assim, de uma forma de evidenciar a avaliação de desempenho do laboratório e demonstrar a sua competência técnica perante terceiros e obter reconhecimento tanto a nível nacional como internacional.

Desde 2015, que o laboratório participa no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade, para Microbiologia de Águas, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. designado *Legionella Isolation Scheme*. Os resultados das contagens dos laboratórios participantes são convertidos em *z-scores* pela fórmula apresentada na equação 19.

$$Z - score = \frac{x_i - X_{pt}}{\delta_{pt}} \quad (eq 19)$$

Onde: x_i é o resultado do participante expresso em \log_{10} ;

X_{pt} é o valor alvo, que corresponde à mediana dos resultados expressa em \log_{10} ;

δ_{pt} é o desvio padrão estabelecido para o ensaio.

A avaliação do desempenho é elaborada pelo próprio distribuidor. Considera-se o resultado “Satisfatório” quando o z-score está entre -1.99 e 1.99, “Questionável” quando o z-score está entre -2.00 e -2.99 e entre 2.00 e 2.99 e considera-se resultado “Insatisfatório” quando o z-score é <-3.00 ou >3.00 . Os resultados obtidos pelo laboratório dos SMAS de Sintra foram na sua maioria satisfatórios, tal como está descrito na tabela 30.

Tabela 29 - Resultados obtidos na participação em EIL

| | | Resultado do laboratório | Valor alvo e intervalo | z-score |
|------------------------|---|--|--|---------|
| Junho 2015 G96 | A | <100 | 1.60x10 ² <i>L. pneumophila</i> [2.8x10 ¹ – 9.00x10 ²] | N/A |
| | B | 1.8 x10 ⁵ <i>Legionella</i> spp. | 7.90x10 ⁴ <i>Legionella</i> spp. [1.13x10 ⁴ – 4.44x10 ⁵] | 0.65 |
| Julho 2016 G102 | A | 5.00x10 ² <i>L pneumophila</i> serogrupo 1 | 6.00x10 ² <i>L. pneumophila</i> serogrupo 1 [1.07x10 ² – 3.37x10 ³] | -0.14 |
| | B | 2.00x10 ³ <i>Legionella</i> spp. | 3.59x10 ³ <i>Legionella</i> spp. [6.38x10 ² – 2.02x10 ⁴] | -0.46 |
| Julho 2017 G108 | A | 3.00x10 ⁴ <i>Legionella</i> spp. | 2.45x10 ³ <i>Legionella</i> spp. [4.0x10 ¹ – 1.71x10 ⁴] | 1.98 |
| | B | 1.45x10 ⁴ <i>L pneumophila</i> serogrupo 1 | 8.10x10 ³ <i>L pneumophila</i> serogrupo 1 [1.44x10 ³ – 4.55x10 ⁴] | 0.46 |
| Mai 2018 G111 | A | 4.00x10 ⁴ <i>Legionella</i> spp. | 5.70x10 ³ <i>Legionella</i> spp. [8.12x10 ² – 3.21x10 ⁴] | 1.54 |
| | B | 1.0x10 ⁵ <i>L pneumophila</i> serogrupo 1 | 2.5x10 ³ <i>L pneumophila</i> serogrupo 1 [4.00x10 ² – 1.41x10 ⁴] | 2.91 |
| N/A – Não avaliado | | | | |

Sempre que o desempenho do laboratório na participação em EIL não é satisfatório, é realizada uma avaliação da situação, que pretende identificar a origem desse mesmo resultado. Da mesma forma, quando o resultado é questionável é aconselhável proceder também a uma avaliação.

No ensaio de 2015, o resultado enviado pelo laboratório para a amostra G96A foi <100 ufc/L, o resultado alvo do ensaio era 160 ufc/L e o intervalo esperado era entre 28 e 900 ufc/L, o que levou o laboratório a concluir que, sendo o valor alvo tão próximo do LD e o intervalo inferior ao LD, embora o resultado não tenha sido avaliado é um resultado satisfatório.

No ensaio realizado em 2018, o resultado enviado pelo laboratório para a amostra G111B foi superior ao valor alvo e superior ao intervalo esperado, no entanto o laboratório verificou no relatório da entidade organizadora, que a maioria dos laboratórios participantes enviaram o resultado tendo utilizado o meio GVPC de acordo com a Norma ISO 11731:1998. O laboratório desde 2017 que adaptou o seu procedimento à nova versão da Norma. Nesta é possível proceder à sementeira inicial tanto no meio de GVPC como no meio BCYE. O meio de GVPC apresenta uma recuperação mais baixa que o meio BCYE. O laboratório analisou a amostra pelos vários métodos e nos meios de GVPC e BCYE, tendo obtido resultados dentro do intervalo esperado, no entanto, de acordo com o procedimento técnico, o resultado final deve ser sempre o resultado que apresenta maior número, pelo que enviou o resultado de BCYE.

Auditorias

A auditoria é um processo sistemático, independente e documentado, que visa verificar a eficácia do sistema de gestão implementado. Permite obter evidências e avaliá-las objectivamente, de forma a determinar até que ponto estão, efectivamente, implementadas e se são adequadas as metodologias em causa. Deste modo, a auditoria consiste no levantamento dos dados necessários à correta análise e avaliação do cumprimento dos requisitos do referencial.

Existem dois tipos de auditoria, a auditoria interna e a auditoria externa. As auditorias internas, também designadas de auditorias de primeira parte, são executadas pela própria organização aos seus próprios sistemas, procedimentos e instalações, recorrendo a pessoal próprio qualificado ou auditores contratados. O objectivo das auditorias internas é ajudar na identificação de actividades que necessitem de acções correctivas para melhorar o seu desempenho e, de uma forma consistente, irem ao encontro dos requisitos normativos aplicáveis.

As auditorias externas incluem auditorias de segunda e terceira parte. As auditorias de segunda parte são executadas por partes interessadas na organização, enquanto que as auditorias de terceira parte são executadas por organizações de auditoria independentes, para fins legais e regulamentares e para acreditação e certificação.

Uma vez que o laboratório efectuou o pedido de extensão da Acreditação aos parâmetros *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila*, estes foram auditados no decorrer do ano de 2018. A auditoria Interna realizou-se em Julho. A auditoria Externa, foi realizada em Setembro pela equipa auditora do IPAC. As constatações da auditoria são o resultado da avaliação das evidências e podem indicar tanto a conformidade ou não conformidade (N) com os critérios definidos, neste caso com os requisitos da Norma ISO 17025, como oportunidades de melhoria(OM).

Na Auditoria Interna foram constatadas duas oportunidades de melhoria e uma não conformidade:

I.OM (Requisito 5.4 - MÉTODOS DE ENSAIO, CALIBRAÇÃO, E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS) – *“Recomenda-se que no estudo de implementação dos ensaios de Legionella sejam avaliadas as incertezas e critério de precisão distinguindo as metodologias de sementeira por microrganismo e por técnica (FM, FME eluição e Directa)”*.

Resolução: Uma vez que o laboratório tinha efectuado a implementação do método tendo em conta as várias metodologias aplicáveis aos vários tipos de amostra, bastou preparar novas folhas de cálculo separadas por metodologia, tal como já foram apresentadas anteriormente nesta tese.

II.OM (Requisito 5.4 - MÉTODOS DE ENSAIO, CALIBRAÇÃO, E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS) – *“Recomenda-se a identificação clara da folha de Excel com as fórmulas de cálculo, adequadas a cada tipo de sementeira, utilizada nos ensaios de *Legionella* spp. e *pneumophila*”*.

Resolução: O laboratório dispõe de uma folha de cálculo (Excel) para determinação do número de ufc/L para cada metodologia, no entanto o procedimento não contemplava essa informação. O procedimento foi revisto em Setembro e neste momento no campo “Documentos complementares” já consta o “Documento Digital – Cálculo *Legionella*” (Anexo F)

I.N (Requisito 5.10 - APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS) – *“Não foram evidenciados os modelos de boletim de análise de acordo com a Norma ISO 11731:2017”*.

Resolução: O ponto “10 – Test Report” da Norma ISO 11731:2017 indica os vários campos que devem constar no boletim de análise, no entanto o laboratório que dispõe de uma plataforma integrada para gestão das amostras ainda não teve oportunidade de integrar os mesmos no parâmetro, pelo que esses valores são introduzidos manualmente nas observações de cada boletim de ensaio.

Na Auditoria Externa foram identificadas duas não conformidades:

I.N (Requisito 5.9 - GARANTIA DA QUALIDADE DOS RESULTADOS DE ENSAIO E CALIBRAÇÃO) – *“O controlo de qualidade do meio de cultura GVPC, no que se refere ao teste de selectividade, não cumpria o disposto na norma ISO 11133- controlo de qualidade de meios de cultura”*.

Resolução: É efectuado controlo de qualidade a todos os meios preparados no laboratório. De acordo com a já referida norma, o controlo de selectividade do meio GVPC indica três microrganismos opcionais *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, no entanto remete ainda para a ISO 11731. Esta Norma indica apenas *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* para controlo de selectividade,

no entanto é mandatório. A prática do laboratório era efectuar o controlo apenas com *E. coli*, pelo que passará de imediato a utilizar os dois microrganismos e irá rectificar o procedimento interno.

II.N (Requisito 5.10 - APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS) – “O relatório 1813/2018 não descrevia o significado da sigla LD (Limite de detecção e ufc/L (unidades formadoras de colónias))”.

Resolução: A situação será rectificada de imediato.

8. Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Uma vez que este trabalho foi desenvolvido no laboratório dos SMAS de Sintra, não ficaria completo sem uma reflexão sobre a prevalência e os riscos que a *Legionella* representa para os sistemas de abastecimento. Como tal, para além de uma descrição da *Legionella*, das suas características, bem como da Doença dos Legionários e da sua ocorrência, foram apresentados alguns estudos nacionais e internacionais sobre a presença dessa bactéria nos sistemas de abastecimento. Embora não se encontre disponível um estudo sobre os sistemas de abastecimento nacionais, foi detectada *Legionella* em sistemas de distribuição de países como a Itália e a Letónia, com valores de 22.6% e 42.0%, respectivamente, de presença nas amostras analisadas. Estes resultados permitem concluir que a presença deste microrganismo nos sistemas de abastecimento apresenta sérios desafios para a saúde pública.

No que respeita aos métodos de desinfeção para eliminar *Legionella* dos sistemas de abastecimento, todos, quer físicos quer químicos apresentam vantagens e desvantagens, não existindo até à data, um método que se possa considerar óptimo. Assim, torna-se muitas vezes necessário combinar a aplicação de mais que um processo de desinfeção.

Quanto aos métodos de análise de *Legionella*, apenas dois dos métodos descritos nesta tese são normalizados, o método cultural normalizado pela ISO 11731 e o método por PCR normalizado pela ISO 12869. O Legiolert™ e o Legipid®, além de não estarem até ao momento normalizados, só permitem detectar e quantificar ou *Legionella pneumophila* ou *Legionella* spp., respectivamente, o que representa uma desvantagem por não permitir dar resposta à legislação nacional.

O método cultural consiste numa análise demorada, podendo ocorrer durante o período de incubação crescimento de flora contaminante e não detecta células viáveis não cultiváveis. Por outro lado, uma análise por PCR também pode ser afectada por interferentes, muitas vezes presentes nas amostras de matrizes mais complexas, como por exemplo amostras de torres de refrigeração. Acresce ainda que, não existe até ao momento uma relação entre unidades formadoras de colónias e unidades genómicas, o que inviabiliza a aplicação da técnica de PCR para dar resposta a imperativos legais, pois a Legislação Portuguesa actual refere-se sempre à quantificação de *Legionella* em ufc. Contudo, é importante mencionar que na literatura a cultura continua a ser definida como o método de referência, apesar das limitações que apresenta.

No decorrer deste trabalho, a implementação do método teve início com a análise de Material de Referência e de amostras contaminadas artificialmente, permitindo assim a familiarização com as colónias

típicas de *Legionella* e o conhecimento do desempenho do meio de cultura. Por se tratar de um método normalizado, não foram efectuados os ensaios e cálculos relativos à sensibilidade, especificidade, selectividade, eficiência, falsos positivos e falsos negativos. Pelo que, para validação do método, o laboratório seguiu o procedimento interno de implementação/validação de métodos que contempla a determinação do critério de precisão por análise de amostras em duplicado, a estimativa de incerteza por realização de ensaios em paralelo executados por diferentes analistas, a elaboração de cartas de controlo para avaliação da produtividade dos meios de cultura e a participação em ensaios interlaboratoriais.

Os critérios de precisão determinados apresentaram valores entre os 0,284 e os 0,481. Os valores mais elevados foram observados para o método FME para os dois parâmetros, *Legionella pneumophila* e *Legionella* spp.. Os CP determinados para *Legionella pneumophila* resultam apenas de 10 valores de duplicados, no entanto, a variação do CP entre métodos é menor do que para o parâmetro *Legionella* spp..

O cálculo da estimativa de incerteza com base nos ensaios em paralelo ficou concluído apenas para o parâmetro *Legionella* spp. determinado pelos métodos Directo e por FM. Contudo, avaliando os resultados actuais verifica-se que a Incerteza Combinada varia entre os 0,1242 e os 0,1946, a Incerteza Intrínseca Relativa varia entre os 11% e os 20%, enquanto a Incerteza Operacional Relativa apresenta os valores entre os 20% e os 38%. Comparando os valores de Incerteza determinados para este parâmetro, com outros já implementados no laboratório, verifica-se que as Incerteza Combinada e Incerteza Intrínseca Relativa determinada para os parâmetros de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila*, são semelhantes aos valores já existentes para outros parâmetros. No entanto, em relação à Incerteza Operacional Relativa, esta apresenta valores ligeiramente superiores quando comparada com outros parâmetros. Importa referir que a Incerteza Operacional é a combinação de todas as incertezas associadas ao procedimento técnico, pelo que o facto da sementeira se fazer por espalhamento e o tempo de incubação ser tão extenso, podem ser factores determinantes para este aumento comparativamente aos outros métodos já implementados no laboratório.

A construção de Cartas de Controlo ou Cartas Guia para avaliação de *performance* dos meios de cultura, permitiu estudar o desempenho do meio e avaliar tendências. Foram construídas três Cartas Guia, uma para avaliação do meio BCYE, que foi comparado com um lote anterior do mesmo meio e apresentou um valor médio de 103%, sendo a produtividade pretendida entre os 70% e os 140%. Já para avaliação do meio de GVPC foram elaboradas duas Cartas Guia distintas, uma para crescimento de *Legionella anisa*, outra para *Legionella pneumophila*. Em ambos os casos pretende-se obter uma produtividade superior a 50% face ao meio de crescimento não selectivo BCYE. Obteve-se para *L. anisa* uma produtividade de 76% e para *Legionella pneumophila* uma produtividade de 66%. Estes resultados de produtividade, embora estejam afastados da situação ideal de 100% estão dentro do que era expectável para o meio GVPC.

Para realização de EIL, o Laboratório dos SMAS de Sintra participou no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade - Microbiologia de Águas, do Instituto Nacional De Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. designado por *Legionella Isolation Scheme*. Dessa participação, obteve-se desempenho satisfatório em 6 dos 8 ensaios realizados.

Actualmente, o laboratório está a aguardar a emissão pelo IPAC do novo Anexo Técnico, que evidência a Acreditação dos parâmetros de pesquisa e quantificação de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* em amostras de águas por método interno. É objectivo do laboratório obter a acreditação dos mesmos parâmetros de acordo com a Norma de Referência, para tal apenas necessita substituir a utilização do meio GVPC por meio BCYE+AB para amostras com elevada concentração de *Legionella* e baixa concentração de microrganismos interferentes.

A publicação da Lei nº 52/2018, que estabelece o regime de prevenção e controlo da Doença dos Legionários, obriga o registo de todos os equipamentos de transferência de calor que possam gerar aerossóis de água, a elaboração de um plano de controlo de pontos críticos e a realização de análises periódicas ao parâmetro *Legionella* em laboratórios Acreditados pelo IPAC, pelo que se prevê um aumento na procura desta análise por parte dos clientes externos e municipais. Por outro lado, continua em discussão a imposição legal da análise de *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* em sistemas de abastecimento de águas, pelo que o Laboratório dos SMAS de Sintra já dispõe da capacidade de resposta face a essa eventual imposição.

9. Referências bibliográficas

- ABDEL-NOUR, Mena.; DUNCAN, Carla; LOW, Donald E.; GUYARD, Cyril.- Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. – International journal of Molecular sciences. Vol. 14, (2013) p. 21660 – 21675. DOI:10.3390/ijms141121660
- ALBALAT, Guillermo Rodriguez; BROCH, Begona Bedrina; BONO, Marisa Jimenez - Method Modification of the Legipid® *Legionella* Fast Detection Test Kit, Performance Tested MethodSM 111101 – Journal of AOAC International. Vol. 97, nº5, (2014) p. 1403 – 1409. DOI: 10.5740/jaoacint.14-029
- ATLAS ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases, [Online] [consultado a 20-09-2018] disponível em WWW:<URL: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- ATLAS, Ronald M. - *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. – Environmental Microbiology. Vol. 1, nº 4 (1999) p. 283 – 293. DOI:10.1046/j.1462-2920.1999.00046.x
- BEAUTÉ, Julien; ZUCS, Philliup; Jong, Birgitta de – Risk for Travel-associated Legionnaires'Disease, Europe, 2009. Emerging Infectious Diseases. Vol. 18, nº 11 (2012) p. 1811 – 1816. DOI: <http://dx.org/10.3201/eid1811.120496>
- BEAUTÉ, Julien - Legionnaires'Disease in europe, 2011 to 2015. Surveillance and outbreak report. Eurosurveillance Journal. Vol. 22, nº 27 (2017); DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30566>
- BENOLIEL, Maria João; FERNANDO, Ana Luisa C.; DIEGUES, Paulo (Comissão Setorial para Água CS/04 – IPQ) - Prevenção e controlo de *Legionella* nos sistemas de água – 3ª Edição, EPAL (2018) ISBN IPQ 978-972-763-174-2; ISBN EPAL 978-989-8490-03-2
- BERK, S. G.; TING, R.; TURNER, G. W.; ASHBURN, R. J. - Production of Respirable Vesicles Containing Live *Legionella pneumophila* Cells by Two Acanthamoeba spp.. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. vol. 64, nº1, (1998) p. 279–286.
- BISWAS, Silpak, ROLAIN, Jean-Marc - Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture – Journal of Microbiological Methods. Vol. 92, (2013) p. 14 – 24. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.10.014>
- BLANC, D.S.; CARRARA, Ph.; ZANETTI, G.; FRANCIOLI, P. - Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control *Legionella*: seven years of experience in a university teaching hospital. Journal of Hospital Infection. Vol. 60, (2005) p. 69-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.10.016>
- BRENNER, Don J., STEIGERWALT, Arnold G., MCDADE, Joseph. - Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the Family *Legionellaceae*, familia nova. – Annals of Internal Medicine. Vol. 90, nº 4 (1979) p. 656 – 658. DOI: 10.7326/0003-4819-90-4-656

- BRENNER, Don J., STEIGERWALT, Arnold G., MCDADE, Joseph. - *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – *Bergey's Manual Trust* (2005) p. 656 – 658. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01178
- CASINI, B., BAGGIANI, A, TOTARO, M., MANSI, A., COSTA, A. L., AQUINO, F., MICCOLI, M., VALENTINI, P., BRUSCHI, F., LOPALCO, P. L., PRIVITERA, G. - Detection of viable but non-culturable *Legionella* in hospital water network following monochloramine disinfection. – *Journal of Hospital Infection*. Vol. 98, (2018) p. 46 – 52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.09.006>
- CDC^a, *Legionella* (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever), [Online] [consultado a 20-09-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.cdc.gov/Legionella/outbreaks.html>
- CDC^b Imagem de *Legionella pneumophila*, [Online] [Consult. 29-09-2018] disponível em WWW:<URL: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=22879>
- CHEN, Y.; *et al.* - Abbreviated duration of superheat-and flush and disinfection of taps for *Legionella* disinfection: Lessons learned from failure. *American Journal of Infection Control*. vol. 33, nº10, (2005) p. 606–610, Dec. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2004.12.008>
- CHONG, Meng Nan, JIN, Bo, CHOW, Christopher W. K., SAINT, Chris. - Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water Research*, vol. 44, nº 10, (2010) p. 2997–3027. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.039>
- Comunicado DGS nº C129_01_v3, GEORGE, Francisco - Doença dos Legionários no concelho da Maia. Direcção-Geral da Saúde (15/03/2017) [Online] [consultado a 23-03-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.dgs.pt/a-direccao-geral-da-saude/comunicados-e-despachos-do-director-geral/atualizacao-doenca-dos-legionarios-no-concelho-da-maia1.aspx>
- Comunicado DGS nº C129_01_v4, GEORGE, Francisco - Doença dos Legionários no concelho da Maia. Direcção-Geral da Saúde (17/03/2017) [Online] [consultado a 23-03-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.dgs.pt/a-direccao-geral-da-saude/comunicados-e-despachos-do-director-geral/atualizacao-doenca-dos-legionarios-no-concelho-da-maia5.aspx>
- Comunicado DGS nº C142_07_v1, FREITAS, Maria da Graça Gregório –Doença dos Legionários no Hospital São Francisco Xavier. Direcção Geral da Saúde (03/12/2017) [Online] [consultado a 23-03-2018] disponível em WWW:<URL: <https://www.dgs.pt/a-direccao-geral-da-saude/comunicados-e-despachos-do-director-geral/doenca-dos-legionarios-no-hospital-sao-francisco-xavier8.aspx>
- Comunicado DGS nº C144_07_v1, FREITAS, Maria da Graça Gregório - Fim do Surto de Doença dos Legionários no Hospital CUF Descobertas. Direcção Geral da Saúde (17/02/2018) [Online] [consultado a 23-03-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.dgs.pt/a-direccao-geral-da-saude/comunicados-e-despachos-do-director-geral/fim-do-surto-de-doenca-dos-legionarios-no-hospital-cuf-descobertas.aspx>

- CORDERO, César; FINN, Michael; LYTLE, Darren; GRUBBS, Thomas; HOLSINGER, Hannah; MOHANTY, Pritidhara; PFALLER, Stacy; RODGERS, Mark; RODGERS-JENKINS, Crystal; WANG, Lili; *et al.* - Technologies for *Legionella* Control in Premise Plumbing Systems: Scientific Literature Review. [Online] United States Environmental Protection Agency, Office of Water, 2016, EPA 810 – R – 16-001. [consultado a 23-03-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/technologies-Legionella-control-premise-plumbing-systems>
- CORREIA, Ana M.; GONÇALVES, Jorge; GOMES, João P.; *et al.* - Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. The New England Journal of Medicine. Vol. 374; nº5 (2016) p. 497–498. DOI: 10.1056/NEJMc1505356
- COTUK, Aysin; DOGRUOZ, Nihal; ZEYBEK, Zuhai; KIMIRAN-ERDEM, Ayten; ILHAN-SUNGUR, Esra- The effects of *Pseudomonas* and *Aeromonas* strains on *Legionella pneumophila* growth. – Annals of Microbiology. Vol 55, nº 3 (2005) p. 219 - 224.
- COMISSÃO TÉCNICA RELACRE, CTR07 – ÁGUAS. Guia RELACRE 29 - Estimativa de Incerteza em Ensaios Microbiológicos de Água - Edição: Relacre (2016); ISBN: 978-972-8574-43-7
- DGS, Doença dos Legionários, Vigilância nos Viajantes, [Online] [consultado a 23-03-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.dgs.pt/doenca-dos-legionarios/doenca-dos-legionarios/vigilancia-nos-viajantes.aspx>
- DIEGUES, Paulo; MARTINS, Vítor; - PREVENÇÃO DA DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS, Sistemas de Tratamento - vantagens e desvantagens. [Online] Direcção Geral de Saúde. (2013) [Consultado a 27-03-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.dgs.pt/doenca-dos-legionarios/relatorios-e-publicacoes/documentos-tecnicos.aspx>
- DIETERSDORFER, Elisabeth; KIRSCHNER, Alexander; SCHRAMMEL, Barbara; OHRADANOVA-REPIC, Anna; STOCKINGER, Hannes; SOMMER, Regina; WALOCHNIK, Julia; CERVERO-ARAGÓ, Sílvia- Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. – Water Research. Vol. 141, (2018) p. 428 – 438. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.058>
- ECDC^a, Legionnaires' disease outbreak investigation toolbox, Microbiology: *Legionella* laboratory diagnosis and detection, [Online] [consultado a 04-05-2018] disponível em WWW:<URL:<https://legionnaires.ecdc.europa.eu/?pid=221>,
- ECDC^b, Legionnaires' disease outbreak investigation toolbox ,Environmental samples, [Online] [consultado a 04-05-2018] disponível em WWW:<URL:<https://legionnaires.ecdc.europa.eu/?pid=222>,
- ECDC, Annual epidemiological report for 2016. [Online] Stockholm: ECDC; (2018). [Consultado a 20-09-2018] disponível em WWW:<URL:<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report.pdf>

- GAIA, Valeria, CASATI, Simona, TONOLLA, Mauro. - Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. – Systematic and Applied Microbiology. Vol. 34, (2011) p. 40 – 44. DOI:10.1016/j.syapm.2010.11.007
- GEORGE, Francisco; ALMEIDA, Fernando; RIBEIRO, Luís M. Cunha; BANZA, Nuno; LACASTA, Nuno - Surto De Doença Dos Legionários Em Vila Franca De Xira, Descrição Sumária Do Surto, [Online] DGS, INSA, ARSLVT, IGAMAOT, APA. (2014) [Consultado a 23-03-2018] disponível em WWW:<URL:<https://www.dgs.pt/a-direccao-geral-da-saude/comunicados-e-despachos-do-director-geral/surto-de-doenca-dos-legionarios.aspx>
- GEORGE, Francisco; *et al.*. - A large outbreak of Legionnaires' Disease in an industrial town in Portugal. Revista Portuguesa de Saúde Pública. Vol. 34, nº 3 (2016) p. 199–208. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2016.10.001>
- GOSSELIN, F.; MADEIRA, L. M. ; JUHNA, T.; BLOCK, J.C. - Drinking water and biofilm disinfection by Fenton-like reaction. Water Research. Vol. 47, nº 5 (2013) p 5631-5638. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.036>
- HALLSTRÖM, Lara Payne; JONG, Birgitta; ROBESYN, Emmanuel. European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease. Surveillance Network (ELDSNet) – Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. Stockholm: ECDC; (2017). ISBN 978-92-9498-165-3. DOI 10.2900/485245. TQ-05-17-229-EN-N
- HUSSAIN, S. N., HERAS, N., ASGHAR, H: M. A., BROWN, N. W., ROBERTS, E. P. L. - Disinfection of water by adsorption combined with electrochemical treatment. Water Research, vol. 54, (2014) p. 170–178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.043>
- IDEXX, Legiolert for detection of *Legionella pneumophila*, [Online] [consultado a 29-10-2018] disponível em WWW:<URL: <https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/legiolert/>
- ISO 8199:2005: Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture
- ISO 8199:2018: Water quality -- General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
- ISO 11133:2014: Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media
- ISO 11133:2014: adm 2018
- ISO 11731:1998: Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella*
- ISO 11731:2017: Water quality -- Enumeration of *Legionella*
- ISO 11731-2:2004: Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella* -- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts
- ISO 13843:2017: Water quality -- Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods

- ISO 17025:2005: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- ISO 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- ISO 29201:2012: Water quality -- The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods
- KERBEL, W.; KRAUSE, J.D.; SHELTON, B.G.; SPRINGSTON, J.P. - Recognition, Evaluation, and Control of *Legionella* in Building Water Systems. Falls Church, VA: American Industrial Hygiene Association (2015)
- KIM, B. R.; ANDERSON, J. E.; MUELLER, S. A.; GAINES, W. A.; KENDALL, A. M. - Literature review – efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. Water Research. vol. 36, nº18, (2002) p. 4433–4444. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00188-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00188-4)
- KIRSCHNER, Alexander K. T. - Determination of viable *Legionellae* in engineered water systems: Do we find what we are looking for?. – Water Research. Vol. 93, (2016) p. 276 – 288. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.016>
- LEGIPID fast detection, IN SlideShare [Online] [consultado a 29-10-2018] disponível em WWW:<URL: <https://www.slideshare.net/biotica/catalogue-legipid-english>
- LU, J.; STRUEWING, I.; VEREEN, E.; KIRBY, A. E.; LEVY, K.; MOE, C.; ASHBOLT, N. - Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with Mycobacterium spp., Pseudomonas aeruginosa and amoeba hosts in a drinking water distribution system. – Journal of Applied Microbiology. Vol. 120, (2015) p. 509 – 521. DOI: 10.1111/jam.12996
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., Stahl, D. A.- Brock Biology of Microorganisms. 20th edition. Boston: Pearson, 2009. ISBN 0-321-53615-0; ISBN 978-0321-53615-0
- MANSILHA, Catarina Rodrigues; COELHO, Carla Alexandre; REINAS, Maria Alcina; HEITOR, Ana Margarida; - Prevalência da *Legionella pneumophila* em águas de diferentes proveniências das regiões norte e centro de Portugal no período de 2000 a 2006 – Vigilância Sanitária – Revista Portuguesa de Saúde Pública. Vol. 25, nº2, (2007) p. 67 – 80.
- MORITZ, Miriam M.; FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost.- Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. – International Journal of Hygiene and Environmental Health. Vol. 213, (2010) p. 190 – 197. DOI:10.1016/j.ijheh.2010.05.003
- MOUCHTOURI, Varvara A.; RUDGE, James W. - Legionnaires' Disease in Hotels and Passenger Ships: A Systematic Review of Evidence, Sources, and Contributing Factors. Journal of Travel Medicine. Vol. 22, nº 5 (2015) p. 325-337. DOI: 10.1111/jtm.12225

- MURGA, Ricardo; FORSTER, Terri; BROWN, Ellen; PRUCKLER, Janet; FIELDS, Barry; DONLAN, Rodney - Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. – Microbiology. Vol. 147, (2001) p. 3121 – 3126.
- NCBI, Taxonomy Browser [Online] (consultado a 26-09-2018) disponível em WWW:<URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=445>,
- OE021: 2017-06-30 Laboratórios de águas, efluentes líquidos e amostras sólidas ambientais – âmbito de acreditação. IPAC (2017) disponível em WWW:<URL: http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OE021_Aguas_v20170630.pdf
- PINTO, Cátia Sousa; BORDALO, Alexandra; ALBUQUERQUE, Maria João; NASCIMENTO, Marina de Lurdes Pires Ramos; VICÊNCIO, Paula Olivença - Doenças de Declaração Obrigatória 2012-2015 VOLUME I – Portugal, [Online] Direção-Geral da Saúde, 2016. [Consult. 09 Março 2018]. disponível em WWW:<URL:<https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-nivel-de-informacao.aspx>
- PRESCOTT, Lansing M., Harley, Jonh P., Klein, Donald A.; Microbiology- 5th Edition, McGraw-Hill, 2002, ISBN: 0-07-282905-2
- PULE, Daina - Conventional and Alternative Disinfection Methods of *Legionella* in Water Distribution Systems. Construction Science. Vol. 19 (2016) p. 21–26. DOI: 10.1515/cons-2016-0007
- RICE, Eugene; BAIRD, Rodger; EATON, Andrew; CLESCERI, Lenore; 9020 - Quality assurance/Quality control/Intralaboratory quality control guidelines - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, 2012. ISBN: 978-087553-013-0
- RODRIGUES, Raquel; COELHO, Carla; FERREIRA, Filipa; PIZARRO, Cristina. Departamento de Saude ambiental, INSA - Prevalência da *Legionella* nos sistemas de água – Artigos breves nº3 – Observações - Boletim Epidemiológico [Online] (2013) p. 4 – 5. [Consultado a 23-07-2018] disponível em WWW:<URL: <https://www.rcaap.pt/detail.jsp?id=oai:repositorio.insa.pt:10400.18/1488>
- SAKAMOTO, Ryota. – Legionnaire’s disease, weather and climate. Bulletin of the World Health Organization. Vol. 93, (2015) p. 435-436. DOI: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.14.142299>
- SIMMERING, Jacob; POLGREEN, Linnea A.; HORNICK, Douglas B.; SEWELL, Daniel K.; POLGREEN, Philip M. - Weather-Dependent Risk for Legionnaires’ Disease, United States. Emerging Infectious Diseases. Vol. 23, nº 11 (2017) p. 1843 – 1851. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2311.170137>
- SIMÕES, Lucia Chaves, SIMÕES, Manuel - Biofilms in drinking water: problems and solutions. The Royal Society Chemistry Advances. Vol. 3, (2013) p. 2520–2533. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2RA22243D>

- SMAS^a, Quem somos, Natureza e Atribuições [Consult. 01-08-2018] disponível em
WWW:<URL: https://www.smas-sintra.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=20&Itemid=45
- SMAS^b, Aguas de Abastecimento, Sistemas de Abastecimento de água [Online] [Consult. 01-08-2018] disponível em WWW:<URL: https://www.smas-sintra.pt/index.php?option=com_wrapper&Itemid=199
- SMAS^c, Aguas Residuais Urbanas, Estações de tratamento de aguas residuais [Online] [Consult. 01-08-2018] disponível em WWW:<URL: https://www.smas-sintra.pt/index.php?option=com_wrapper&Itemid=193
- SMAS^d, Resíduos Urbanos, Localizações [Online] [Consult. 01-08-2018] disponível em
WWW:<URL: https://www.smas-sintra.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=629&Itemid=217
- SPRINGSTON, John.; YOCAVITCH, Liana. - Existence and control of *Legionella* bacteria in building water systems: A review. – Journal of Occupational and environmental hygiene. Vol. 14,nº 2 (2017) p. 124 – 134. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/15459624.2016.1229481>
- STEWART, Catherine; MUTHYE, Viraj; CIANCIOOTTO, Nicholas. - *Legionella pneumophila* persists within biofilms formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under Dynamic Flow Conditions. – PLOS ONE. Vol. 7, Nº 11, (2012) e50560.
- TECNILAB, Legipid Fast Detection [Online] [Consult. 29-10-2018] disponível em
WWW:<URL:<https://www.analitica.tecnilab.pt/media/118/File/documentacao/legipid.pdf>
- TREVORS, J. T. - Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. – Journal of Microbiological Methods. Vol. 86 (2011) p. 266 – 273. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.04.018
- TRNKOVA, Katarína; KOTRBANCOVA, Martina; SPALEKOVA, Margita; FULOVÁ, Miriam; BOLEDOVICOVÁ, Jana; VESTEG, Matej - MALDI-TOF MS analysis as a useful tool for an identification of *Legionella pneumophila*, a facultatively pathogenic bacterium interacting with free-living amoebae: A case study from water supply system of hospitals in Bratislava (Slovakia) – Experimental Parasitology. Vol. 184, nº5, (2018) p. 97 – 102. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.12.002>
- VANDERSMISSEN, Liesbeth; DE BUCK, Emmy; SAELS, Veerle; COIL, David A.; ANNÉ, Josef- A *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. - Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Letter 306 (2010) p. 168 - 176. DOI:10.1111/j.1574-6968.2010.01951.x

Anexos

A. Norma ISO 11731:2017 *Water Quality – Enumeration of Legionella*

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
11731

Second edition
2017-05

**Water quality — Enumeration of
*Legionella***

Qualité de l'eau — Dénombrement des Legionella

Cópia de Trabalho



Reference number
ISO 11731:2017(E)

© ISO 2017

ISO 11731:2017(E)

Cópia de Trabalho



COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT

© ISO 2017, Published in Switzerland

All rights reserved. Unless otherwise specified, no part of this publication may be reproduced or utilized otherwise in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, or posting on the internet or an intranet, without prior written permission. Permission can be requested from either ISO at the address below or ISO's member body in the country of the requester.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

ii

© ISO 2017 – All rights reserved

| Contents | Page |
|---|-------------|
| Foreword | v |
| Introduction | vi |
| 1 Scope | 1 |
| 2 Normative references | 1 |
| 3 Terms and definitions | 1 |
| 4 Principle | 2 |
| 4.1 General..... | 2 |
| 4.2 Examination..... | 2 |
| 4.3 Confirmation..... | 2 |
| 5 Apparatus and glassware | 2 |
| 6 Culture media and reagents | 3 |
| 7 Sampling | 4 |
| 8 Procedure | 4 |
| 8.1 Samples..... | 4 |
| 8.2 Concentration of water samples..... | 5 |
| 8.2.1 General..... | 5 |
| 8.2.2 Membrane filtration and direct placing of the membrane filter on culture media..... | 5 |
| 8.2.3 Membrane filtration followed by a washing procedure..... | 5 |
| 8.3 Sample pre-treatment..... | 6 |
| 8.3.1 Heat treatment..... | 6 |
| 8.3.2 Acid treatment..... | 6 |
| 8.4 Culture..... | 6 |
| 8.4.1 General..... | 6 |
| 8.4.2 Samples with a high concentration of <i>Legionella</i> species and a low concentration of interfering microorganisms..... | 6 |
| 8.4.3 Samples with a low concentration of <i>Legionella</i> species and a low concentration of interfering microorganisms..... | 6 |
| 8.4.4 Samples with a high concentration of interfering microorganisms..... | 7 |
| 8.4.5 Samples with an extremely high concentration of interfering microorganisms..... | 7 |
| 8.4.6 Incubation..... | 7 |
| 8.4.7 Examination of the plates..... | 7 |
| 8.5 Confirmation of presumptive <i>Legionella</i> colonies on culture media: BCYE agar and BCYE-cys agar..... | 8 |
| 9 Expression of results | 8 |
| 10 Test report | 9 |
| 11 Quality assurance | 10 |
| 11.1 General..... | 10 |
| 11.2 Performance testing of <i>Legionella</i> culture media..... | 10 |
| 11.3 Preparing working culture and test suspension for performance testing..... | 10 |
| Annex A (informative) <i>Legionella</i> species | 12 |
| Annex B (normative) Culture media | 14 |
| Annex C (normative) Diluents | 20 |
| Annex D (normative) Acid solution | 21 |
| Annex E (informative) Scraping or rubbing the bacteria from membrane filters | 22 |
| Annex F (informative) Centrifugation technique | 23 |

ISO 11731:2017(E)

| | |
|---|-----------|
| Annex G (informative) Indirect immunofluorescent antibody assay for the identification of <i>Legionella</i> species | 24 |
| Annex H (informative) Performance data | 27 |
| Annex I (informative) Pre-treatment of water related matrices | 31 |
| Annex J (normative) Decision matrix | 32 |
| Bibliography | 38 |

Cópia de Trabalho

ISO 11731:2017(E)

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

The procedures used to develop this document and those intended for its further maintenance are described in the ISO/IEC Directives, Part 1. In particular the different approval criteria needed for the different types of ISO documents should be noted. This document was drafted in accordance with the editorial rules of the ISO/IEC Directives, Part 2 (see www.iso.org/directives).

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this document may be the subject of patent rights. ISO shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights. Details of any patent rights identified during the development of the document will be in the Introduction and/or on the ISO list of patent declarations received (see www.iso.org/patents).

Any trade name used in this document is information given for the convenience of users and does not constitute an endorsement.

For an explanation on the voluntary nature of standards, the meaning of ISO specific terms and expressions related to conformity assessment, as well as information about ISO's adherence to the World Trade Organization (WTO) principles in the Technical Barriers to Trade (TBT) see the following URL: www.iso.org/iso/foreword.html.

This document was prepared by Technical Committee ISO/TC 147, *Water quality*, Subcommittee SC 4, *Microbiological methods*.

This second edition of ISO 11731 cancels and replaces ISO 11731:1998 and ISO 11731-2:2004, which have been technically revised.

ISO 11731:2017(E)

Introduction

After the first recognized outbreak of Legionnaires' disease in 1976, the isolated bacterium was named *Legionella pneumophila*. Legionellae are widely found in natural and artificial aquatic environments, soils, composts and can cause legionellosis. Legionellae can grow intracellularly in protozoa like *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella* species or *Naegleria* species. At least 61 different *Legionella* species have been described. In 26 of these species, some strains infecting humans have been reported. *Legionella pneumophila* can be subtyped into at least 15 different serogroups; nine other species also can be subtyped into at least two separate serogroups. Monitoring for legionellae is important for public health reasons to identify environmental sources which can pose a risk of legionellosis, such as evaporative cooling towers, hot- and cold-water distribution systems in buildings and associated equipment such as spa pools, dental units, air conditioning units, etc. Monitoring is also important for validation of control measures and ongoing verification that controls remain effective.

Cópia de Trabalho

Water quality — Enumeration of *Legionella*

WARNING — Persons using this document should be familiar with normal laboratory practice. This document does not purport to address all of the safety problems, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this document to establish appropriate safety and health practices and to ensure compliance with any national regulatory conditions.

IMPORTANT — It is absolutely essential that tests conducted in accordance with this document be carried out by suitably qualified and competent staff.

1 Scope

This document specifies culture methods for the isolation of *Legionella* and estimation of their numbers in water samples.

These methods are applicable to all kinds of water samples including potable, industrial, waste and natural waters. These methods can be used for water related matrices, e.g. biofilms, sediments, etc.

Not all *Legionella* species are culturable; therefore, the methods described in this document do not recover all species of *Legionella*.

2 Normative references

The following documents are referred to in the text in such a way that some or all of their content constitutes requirements of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 7704, *Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*

ISO 8199, *Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 19458, *Water quality — Sampling for microbiological analysis*

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

ISO and IEC maintain terminological databases for use in standardization at the following addresses:

- IEC Electropedia: available at <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: available at <http://www.iso.org/obp>

3.1

Legionella

genus of microorganisms normally capable of growth on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar containing L-cysteine and iron(III) salts

Note 1 to entry: For a more detailed description of *Legionella* species, see [Annex A](#).

ISO 11731:2017(E)

4 Principle**4.1 General**

Legionellae in the water sample are concentrated by membrane filtration, diluted or directly plated depending on the origin/characteristics of the sample. The desired level of detection can vary depending on (inter)national legislation and the reason for sampling or investigation. Samples expected to contain high numbers of legionellae, such as those obtained during outbreak investigations, can be processed with and/or without the concentration steps. To reduce the growth of the concentrated non-target bacteria, which can interfere with the recovery of the target legionellae, portions of the water samples are also subjected to heat treatment, acid treatment or a combination of both treatments.

Dilution is necessary when high concentrations of *Legionella* and/or other bacteria are expected. Separate portions of the diluted sample should be pre-treated; one with heat and a second with acid solution or, in case of extremely contaminated samples, with a combination of acid solution and heat before culturing on selective media.

Treated and/or untreated portions of the sample are transferred onto plates of the chosen culture medium selective for *Legionella* and incubated.

NOTE Mechanical treatment of the sample can enhance the recovery of *Legionella*.

4.2 Examination

After incubation, morphologically characteristic colonies on the selective culture media are regarded as presumptive *Legionella*.

4.3 Confirmation

Presumptive colonies are confirmed as *Legionella* by subculture to demonstrate their growth requirement for L-cysteine and iron(III).

NOTE If species and serotype identification are requested, further tests are needed (see [Annex G](#)). These tests are not part of the standardized methods described in this document.

5 Apparatus and glassware

Usual laboratory equipment and in particular:

5.1 Sterile Petri dishes.

5.2 Incubator, capable of being maintained at (36 ± 2) °C.

5.3 Ultraviolet lamp, emitting light of wavelength (360 ± 20) nm.

5.4 Membrane filtration equipment, suitable for filtering water volumes of 10 ml up to 1 000 ml.

5.5 Membrane filter.

5.5.1 Membrane filter for concentration and elution, polycarbonate or polyethersulfone membrane filters, diameter 47 mm to 142 mm with rated pore sizes of 0,2 µm; see Reference [6]. These types of membrane filters are used for concentration followed by a washing procedure.

5.5.2 Membrane filter for direct placing on culture media, membrane filters from cellulose nitrate or mixed cellulose esters, diameter 47 mm to 50 mm with rated pore sizes of 0,2 µm or 0,45 µm. These

ISO 11731:2017(E)

types of membrane filters are used for direct placing onto the culture media after filtration. Filters shall be evaluated prior to use in accordance with ISO 7704.

NOTE Black membrane filters contrast better with the white *Legionella* colonies than light-coloured membrane filters.

5.6 pH meter, with an accuracy of $\pm 0,1$ at 20 °C to 25 °C.

5.7 Vortex mixer.

5.8 Ultrasonic water bath, suitable for ensuring that the level of diluent covering the membrane filter is below the level of water in the water bath.

5.9 Water bath, capable of being maintained at (50 ± 1) °C.

5.10 Glassware, sterilized according to ISO 8199.

5.11 Dissection microscope, stereoscopic, with magnification of at least 4× and with oblique incident illumination.

NOTE Also, a hand lens (magnification at least 4×) can be used.

5.12 Disinfected forceps, for handling of membrane filters.

NOTE Forceps with round ends are generally used in order not to damage the membrane during handling.

5.13 Screw cap sterile container, with or without sterile glass beads. To ensure maximum removal of the legionellae from the membrane filter, sterile glass beads (diameter 2 mm to 3 mm) can be added to the sterile container. Add sufficient glass beads to the sterile container just enough to cover the bottom of the container.

6 Culture media and reagents

Use chemicals of analytical grade in the preparation of culture media and reagents unless otherwise stated (see the Note). Prepare the culture media and reagents according to the instructions given in [Annexes B, C and D](#). Prepare culture media using distilled or demineralized water, which is free from substances that might affect growth of microorganisms under the test conditions. The water shall comply with the requirements of ISO 3696, grade 3.

Alternatively, use commercially available culture media and reagents prepared and used according to the manufacturer's instructions.

NOTE Chemicals of other grades can be used, providing they are shown to be of equal performance in the test.

6.1 Culture media.

See [Annex B](#).

6.1.1 Buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar.

See [B.1](#).

ISO 11731:2017(E)

6.1.2 Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys).

See [B.2](#).

NOTE Blood agar (see [B.6](#)), nutrient agar (see [B.7](#)) or tryptone soy agar (see [B.8](#)) can be used instead of BCYE-cys agar.

6.1.3 Buffered charcoal yeast extract agar with selective supplements (BCYE+AB).

See [B.3](#).

6.1.4 Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide (GVPC) agar.

See [B.4](#).

6.1.5 Modified Wadowsky Yee (MWY) agar.

See [B.5](#).

6.2 Diluents.

See [Annex C](#).

6.2.1 Page's saline.

See [C.1](#).

6.2.2 Diluted Ringer's solution.

See [C.2](#).

6.3 Acid solution.

See [Annex D](#).

7 Sampling

Carry out sampling, transport and storage of the samples in accordance with ISO 19458. Take care not to expose the samples to adverse temperature conditions (e.g. freezing or overheating).

NOTE The use of insulated containers is helpful in this regard.

8 Procedure

8.1 Samples

Due to the complex nature of different sample matrices, the laboratory shall determine the appropriate method for each sample type. The decision matrix is provided in [Annex J](#) to determine which appropriate method shall be undertaken. [Annex J](#) describes the requirements and provides additional options.

In order to ensure the detection of legionellae from water samples, a concentration technique by membrane filtration (see [8.2.2](#) or [8.2.3](#)) will be required in most cases. Where the concentration of legionellae is expected to be greater than 10^4 colony forming units per litre (cfu/l), direct plating of the unconcentrated sample can also be carried out. For highly contaminated samples, dilute (refer to [Annex C](#) for suitable diluents) and use direct plating before and after the pre-treatment (see [8.3](#)). Record volumes of sample diluted or processed and which pre-treatment(s) has (have) been applied.

ISO 11731:2017(E)

When the number of legionellae in any given sample is not known, concentration techniques are usually performed. Therefore, follow the procedure described in 8.2.2 or 8.2.3.

8.2 Concentration of water samples

8.2.1 General

For a general description of the membrane filtration technique, see ISO 8199. Filtration can be done by vacuum filtration or positive pressure filtration.

The flow rate should be adjusted so as not to exceed the maximum specified by the manufacturer for the filter size or type.

NOTE The procedure for water related matrices (swabs, sediment, etc.) is described in Annex I.

8.2.2 Membrane filtration and direct placing of the membrane filter on culture media

Filter the water sample (without treatment, after acid treatment and, if required, after heat treatment) through a cellulose nitrate or mixed cellulose esters membrane filter (5.5.2). The acid treatment can also be done directly on the membrane filter in the funnel (see 8.3.2). The volume filtered depends on the particulate content of the water or the desired detection level. The filtered volume of the sample shall be recorded. Carefully remove the membrane filter from the stand with disinfected forceps (5.12) and place it (right-side up) directly on the culture media, ensuring that no air bubble is trapped underneath.

NOTE Where concentration by filtration is not possible (e.g. due to a high level of deposit), the sample can be concentrated by centrifugation (see Annex F).

8.2.3 Membrane filtration followed by a washing procedure

Filter the water sample through a polycarbonate or polyethersulfone membrane filter (5.5.1). The volume filtered depends on the particulate content of the water or the desired detection level. The filtered volume of the sample shall be recorded. Remove the membrane filter from the stand with disinfected forceps (5.12). Work carefully to avoid loss of residual deposit. Place the membrane filter (right-side down) in a screw cap sterile container with or without sterile glass beads (5.13). To wash the microorganisms from the membrane filter, add 5 ml to 10 ml of sterile diluent (see Annex C) or sample, and shake vigorously using a vortex mixer (5.7) for at least 2 min. Alternatively, place the container (5.13) in an ultrasonic water bath (5.8) for a time interval that has been verified to determine the optimum time interval for maximum recovery. Ensure that the level of diluent covering the membrane is below the level of water in the ultrasonic water bath.

This concentrate represents the prepared sample. Record the volume of the concentrate. Membrane filters may be cut into pieces using sterile scissors to aid elution.

Divide the concentrate into three portions. Use one portion untreated, one portion for treatment with heat (see 8.3.1) and one portion for treatment with acid solution (see 8.3.2).

NOTE 1 Alternatively, the scraping or rubbing technique can be used for removal of the bacteria from the membrane filter (see Annex E).

NOTE 2 Where concentration by filtration is not possible (e.g. due to a high level of deposit), the sample can be concentrated by centrifugation (see Annex F).

NOTE 3 An additional membrane filtration can be used for the acid pre-treatment directly on the membrane filter in the funnel.

ISO 11731:2017(E)**8.3 Sample pre-treatment****8.3.1 Heat treatment**

Add the sample (concentrated or unconcentrated) to a sterile container and place it in a water bath (5.9) at (50 ± 1) °C for (30 ± 2) min. Small volumes (≤ 5 ml) should be used to ensure a short period until the desired temperature is reached. If many samples are treated together or large sample volumes are treated or thick-walled containers are used, monitor the temperature in a separate container similar to that used for the sample. The time starts when the required temperature is reached. Large sample volumes or thick-walled containers should be cooled to avoid overheating after being removed from the water bath.

8.3.2 Acid treatment

Dilute one volume of the sample (concentrated or unconcentrated) with nine volumes of the acid solution (see Annex D), mix well and leave it for $(5,0 \pm 0,5)$ min. If the diluted acid treated sample is used for the calculation of the final concentration of *Legionella* species in the sample, the dilution should be factored. Volumes greater than 0,1 ml can be plated to decrease the limit of detection.

Acid treatment can also be done directly on the membrane filter in the funnel. Transfer around 30 ml acid solution (see Annex D) onto the membrane filter. Leave it for $(5 \pm 0,5)$ min and remove the acid solution by filtration. Wash the membrane filter with at least 20 ml of the diluent (see Annex C). It is important that the diluent does not rinse the surface of the funnel that had not been in contact with the acid solution.

8.4 Culture**8.4.1 General**

The choice of the method used for the enumeration of *Legionella* species depends on the origin/characteristics of the sample and the reason of sampling or investigation. An assumption shall be made about the expected concentration of interfering microorganisms based on experience or origin of the sample. Also, the desired lower limit of detection level needs to be considered. A decision matrix for choosing an appropriate method is described in detail in Annex J.

Depending on the desired detection level, it is possible to use more than one plate of the different culture media mentioned in the following subclauses.

8.4.2 Samples with a high concentration of *Legionella* species and a low concentration of interfering microorganisms

Plate the sample directly if the number of *Legionella* is expected to exceed 10^4 cfu/l. Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of the sample on one plate of BCYE agar (see B.1) and one plate of BCYE+AB agar (see B.3). Record the inoculated volume.

8.4.3 Samples with a low concentration of *Legionella* species and a low concentration of interfering microorganisms**8.4.3.1 Direct placing of membrane filter on culture media after membrane filtration**

Filter the sample (see 8.2.2) and place the untreated membrane filter directly on one plate of BCYE agar (see B.1). The membrane filters treated with acid solution according to 8.3.2 are placed on one or more of the selective or highly selective plates of BCYE+AB agar (see B.3) or GVPC agar (see B.4) or MWY agar (see B.5).

ISO 11731:2017(E)

8.4.3.2 Plating after membrane filtration with washing procedure

Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of each concentrated portion of the sample (untreated, heat treated and acid treated) from the membrane filtration with washing procedure (see 8.2.3) on one plate of BCYE agar (see B.1) and on one or more of the selective or highly selective plates of BCYE+AB agar (see B.3) or GVPC agar (see B.4) or MWY agar (see B.5). Record the inoculated volume.

8.4.4 Samples with a high concentration of interfering microorganisms

Culture samples with a high concentration of interfering microorganisms unconcentrated (direct), concentrated (see 8.2) or diluted (1:10). Divide each subsample into three portions. Use one portion untreated, the second portion for treatment with heat (see 8.3.1) and the third portion for treatment with acid solution (see 8.3.2). Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of each portion of the subsamples on one plate of GVPC agar (see B.4) or one plate of MWY agar (see B.5). Record the inoculated volume.

8.4.5 Samples with an extremely high concentration of interfering microorganisms

Culture samples with an extremely high concentration of interfering microorganisms unconcentrated and diluted (1:10 and 1:100) after a pre-treatment with a combination of heat and acid. For the combined treatment first, the heat treatment (see 8.3.1) is done followed by the acid treatment (see 8.3.2). It is important to cool the heat-treated sample to room temperature before the acid treatment is done. Prepare dilutions directly after the acid treatment in sterile diluent (see Annex C).

Mix well by shaking, using a vortex mixer (5.7) or an ultrasonic water bath (5.8). If necessary, add a layer (just enough to cover the bottom of the container) of sterile glass beads to the sample to aid disaggregation of the material. Inoculate and spread 0,1 ml to 0,5 ml of each portion on one plate of GVPC agar (see B.4) or one plate of MWY agar (see B.5). Record the inoculated volume.

8.4.6 Incubation

Allow the inoculated plates to stand until the inoculated volume has been absorbed, then invert the plates and incubate at (36 ± 2) °C for 7 d to 10 d. Create a humid atmosphere to prevent desiccation of the plates, for example, by placing in an enclosed container.

NOTE Validation data using artificially spiked samples have demonstrated no difference in counts between incubation for 7 d and 10 d. Natural samples containing wild strains of *Legionella* can, however, require the full incubation period of 10 d to present growth.

8.4.7 Examination of the plates

Inspect the plates for the first time either on day 2, 3, 4 or 5 followed by a final inspection at the end of the incubation period. This is to identify samples where overgrowth has occurred. The final quantitative result is not available until the end of the incubation period. For the range of quantitative determination, see Table H.1. As *Legionella* grows slowly and can be masked by the growth of other microorganisms, it is also recommended to use the dissection microscope with oblique incident illumination (5.11). Record the number of each type of presumptive *Legionella* colony present.

In case of outbreak investigations, it is advisable for samples expected to have a high concentration of interfering microorganisms to check the plates on day 2 to determine if dilutions are needed. Be aware of the potentially negative impact of the conservation of the concentrate or sample for a period of two additional days.

Colonies of *Legionella* are white-grey in general but can also appear in other colours. They are smooth with an entire edge and exhibit a characteristic ground-glass appearance. Under an ultraviolet lamp (5.3), colonies of several species (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* and *L. tucsonensis*) autofluoresce brilliant white; *L. erythra* and *L. rubrilucens* appear red. Colonies of *L. pneumophila* appear dull green often tinged with yellow. The colour of fluorescence can help to differentiate colonies in samples containing different species of *Legionella*. To avoid the possibility that *Legionella* cells could be killed or damaged so that they are not recoverable,

ISO 11731:2017(E)

plates should not be exposed to ultraviolet light for a longer time than is necessary. It should be noted that new species of *Legionella* might possess characteristics different to those described above.

8.5 Confirmation of presumptive *Legionella* colonies on culture media: BCYE agar and BCYE-cys agar

Subculture from the plate(s) showing the highest counts of presumptive colonies of *Legionella* (see 8.4.7) per water volume. When there is only one colony type, pick three presumptive colonies. If more morphological different types of presumptive colonies of *Legionella* are growing on the plate, take at least one colony from each type. Subculture onto a plate of BCYE agar (see B.1) and a plate of BCYE-cys agar (see B.2 or alternative media as described in the Note in 6.1.2). Be careful not to carry over any culture media with the colony and first inoculate a plate of BCYE-cys agar and then a plate of BCYE agar. Incubate at (36 ± 2) °C for 2 d to 5 d. Regard as *Legionella* those colonies which grow on the plate of BCYE agar (see B.1) but fail to grow on the plate of BCYE-cys agar (see B.2). Record the results for each plate. If the initial subcultures do not confirm as *Legionella*, analyse further subcultures of presumptive *Legionella* colonies from another type of plate (culture media or sample treatments).

L. oakridgensis and *L. spiritensis* require L-cysteine and iron(III) for primary isolation but sometimes grow weakly in the absence of added L-cysteine thereafter. Accordingly, careful comparison needs to be made of the differences in growth between supplemented and unsupplemented culture media.

NOTE Alternative procedures can be used to confirm the isolate as *Legionella* species providing the suitability of the alternative procedure is verified.

For special situations like outbreak investigations, at least five presumptive colonies if only one morphology is present, or two presumptive colonies for each type of morphology shall be confirmed. If identification of the *Legionella* colonies is to be carried out (see Annex G) and included on the test report, all typical morphologies present on any of the plates should be confirmed and the identifications reported.

9 Expression of results

To estimate the number of colony forming units of *Legionella* in the original water sample, select the plate or set of plates (from the same culture medium) showing the maximum number of confirmed colonies per water volume. Take the dilution into account. Do not average the counts from different methods, treatments or culture media, as these are not replicates.

Calculate the number of *Legionella* colony forming units in the original sample (see examples shown below) per litre, in accordance with ISO 8199, as follows.

— Direct plating: $C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$

— Membrane filter on plate: $C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$

— Filtration with washing procedure (indirect filtration): $C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{\text{tot}}} \times V_s$

— Plating after dilution: $C_s = \frac{a \times V_s}{V_{\text{dil}}} \times Df$

ISO 11731:2017(E)

where

C_s is the number of *Legionella* in cfu/l;

a is the number of calculated confirmed *Legionella* colonies

$$a = \frac{\text{fraction positive confirmed}}{\text{fraction total confirmed}} \times \text{total count}$$

V_c is the (concentrated) sample volume in millilitres, ml;

V is the sample volume inoculated per plate or set of plates (from the same culture medium) in millilitres, ml;

V_{tot} is the total tested sample volume in millilitres, ml;

V_s is the reference volume chosen to express the concentration of the microorganisms in the sample (normally 1 000 ml);

V_{dil} is the diluted sample volume inoculated per plate or set of plates (from the same culture medium) in millilitres, ml;

Df is the dilution factor.

The purpose of this document is to demonstrate the number of confirmed *Legionella* in a sample. Report the confirmed number of *Legionella* colony forming units in accordance with ISO 8199. Report absence as “not detected” in the volume examined and indicate the detection limit calculated according to the procedure used (see [Table J.1](#)).

10 Test report

The test report shall contain at least the following information:

- the test method used (in conjunction with [Annex J](#)), together with a reference to this document, i.e. ISO 11731;
EXAMPLE Further specification, in conjunction with [Annex J](#), can be done as follows: [Matrix A; Procedure 8, 9, 10; Medium A and Medium C — GVPC].
- all details necessary for complete identification of the sample, such as the sample site with a unique identifier, so that, if necessary, a repeat sample can be taken from the exact location and sample point [e.g. building location (address and postcode), floor and room number, exact location of outlet (wash hand basin in room)], the sampling technique, the nature of the sample, the kind of water system or plant, the temperature and the biocide concentration;
- the date and time of collection of the sample, the date of receipt of the sample, and start and end of the examination, any particular occurrence(s) observed during transport, storage and the course of analysis which might have influenced the result (e.g. particulates in the sample);
- the maximum volume used in the analysis;
- the results expressed in accordance with [Clause 9](#).

ISO 11731:2017(E)**11 Quality assurance****11.1 General**

The laboratory shall have a clearly defined quality control system to ensure that the apparatus, reagents and techniques are suitable for the test. The use of positive controls, negative controls and blanks is part of the test.

11.2 Performance testing of *Legionella* culture media

For the definition of productivity, selectivity and specificity, refer to ISO 11133. The performance of the different *Legionella* culture media shall be tested according to the methods and criteria described in ISO 11133. Preparation of the working cultures and test suspensions is described in 11.3. For plates of BCYE agar (see B.1), only productivity can be tested. For plates of BCYE-cys agar (see B.2 or alternative media as described in the Note of 6.1.2), only test for its inability to support growth with one of the *L. pneumophila* strains is mentioned in Table 1.

11.3 Preparing working culture and test suspension for performance testing

Working cultures shall be prepared from a reference stock or stock culture of a *Legionella* strain. Reconstitute and recover as recommended, and subculture onto one or several plates of BCYE agar (see B.1) for purity. After incubation, make a suspension in sterile glycerol broth (see G.2.4) from the resulting growth so that it is just visible to the naked eye. Dispense in 1 ml volumes for storage at $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$.

Alternatively, use Page's saline (see C.1) or distilled water for storage at $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$ or other appropriate freezing culture media and store at $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ or $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$ as appropriate. Plate out one suspension of each isolate onto *Legionella* culture medium for subsequent identification and recording of the *Legionella* species. For use, allow a working culture of one (or more) isolates to thaw at room temperature. Shake thoroughly, wait 5 min to 10 min to allow aerosols to settle. If necessary, dilute to achieve a test suspension with the desired number of microorganisms in a specified volume in accordance with ISO 11133.

ISO 11731:2017(E)

Table 1 — Control strains and performance criteria

| Culture media | Function | Incubation | Control strains | WDCM numbers ^a | Reference media | Method of control | Criteria | Characteristic reactions |
|---|--------------|-----------------------------|---|-----------------------------|---|-------------------|---|---|
| BCYE-cys agar, nutrient agar, blood agar, tryptone soy agar | Confirmation | 2 d to 5 d/ (36 ± 2) °C | <i>Legionella pneumophila</i> | 00107 ^b 00180 | BCYE agar | Qualitative | No growth | |
| GVPC agar, BCYE+AB agar, MWY agar | Productivity | 2 d to 5 d/ (36 ± 2) °C | <i>Legionella pneumophila</i> | 00107 ^b 00180 | BCYE agar | Quantitative | P _R ≥ 0,5 | White-grey-blue-purple colonies with an entire edge and exhibiting a characteristic ground-glass appearance |
| | | 5 d to 10 d/ (36 ± 2) °C | <i>Legionella anisa</i> | 00106 | | | | |
| | Selectivity | 3 d/ (36 ± 2) °C | <i>Enterococcus faecalis</i> ^c | 00009 or 00087 | — | Qualitative | Total inhibition | — |
| | | | <i>Escherichia coli</i> ^c | 00012 or 00013 | — | Qualitative | Total or partial inhibition (0 to 1) ^d | — |
| BCYE agar | Productivity | 2 d to 5 d/ (36 ± 2) °C | <i>Legionella pneumophila</i> | 00107 ^b | Media batch BCYE agar already validated | Quantitative | P _R ≥ 0,7 | White-grey-blue-purple colonies with an entire edge and exhibiting a characteristic ground-glass appearance |

^a Make reference to the reference strain catalogue available on <http://www.wfcc.info> for information on culture collection strain numbers and contact details.

^b Strains to be used as a minimum.

^c At least one strain of *Enterococcus faecalis* (WDCM 00009 or WDCM 00087) and at least one strain of *Escherichia coli* (WDCM 00012 or WDCM 00013) have to be used.

^d "0" means "no growth" and "1" means "weak growth".

ISO 11731:2017(E)

Annex A (informative)

Legionella species

The genus *Legionella* belongs to the taxonomic order *Legionellales*, which includes the families *Coxiellaceae* and *Legionellaceae*. Three different genera have been proposed for the *Legionellaceae*: *Legionella*, *Fluoribacter*, and *Tatlockia*. However, the latter two generic names have never been widely used or accepted, and the single genus *Legionella* is almost universally used to describe all species.

Legionellae are small Gram-negative bacilli with fastidious growth requirements. Proteins rather than carbohydrates are used as an energy source. *Legionellae* are obligate aerobes and grow at temperatures ranging from 20 °C to 42 °C.

The amino acid L-cysteine is required for the (initial) growth of *Legionella* species from environmental and clinical sources. In addition, *L. oakridgensis* and *L. spiritensis* require L-cysteine and iron(III) for primary isolation but can grow weakly in the absence of added L-cysteine thereafter. Soluble iron(III) is required for optimal growth and for the initial isolation of the bacterium from both clinical and environmental sources. Iron(III), L-cysteine, α -ketoglutarate, and charcoal-containing yeast extract agar buffered with an organic buffer (BCYE agar) is the preferred growth culture medium for clinical isolation. Clinically important, *Legionella* species grow best at 35 °C in humidified air on plates of BCYE agar, usually in 2 d to 5 d after inoculation of plates. Of the *Legionella* species, *L. lytica* is not able to grow on BCYE agar, but it can be cultivated using co-cultivation with amoeba.

At least 61 different *Legionella* species have been described. In 26 of these species, some strains infecting humans have been reported. *L. pneumophila* contains at least 15 different serogroups; nine other species contain two different serogroups, with the remaining species containing only one serogroup each. *L. pneumophila* serogroup 1 caused the 1976 Philadelphia outbreak and is the cause of 70 % to 90 % of all cases of Legionnaires' disease for which there has been a bacterial isolate. Like *L. pneumophila*, other *Legionella* species are widely distributed in aquatic habitats and soil. Recovery of these species is generally less frequent and technically more demanding than recovery of *L. pneumophila*. 25 *Legionella* species other than *L. pneumophila* have been documented to cause human infection (see Table A.1) based on isolation from clinical material. Isolates of the other species are limited to water and soil, although several of them have been implicated in human infection based on seroconversion in the absence of isolation.

When grown on charcoal-yeast extract agar, *Legionella* species produce a water-soluble, extracellular compound that fluoresces yellow-green on exposure to long-wave ultraviolet light (360 ± 20) nm. Several species exhibit blue-white or red autofluorescence under long-wave ultraviolet light. Differentiation of the common species is most conveniently made in the laboratory by direct fluorescent antibody staining of the isolates. Identification of *L. pneumophila* serogroups, and other *Legionella* species, is often much more difficult and is best conducted by specialized reference laboratories. Determination by using molecular techniques is the definitive method, especially for the less common strains.

ISO 11731:2017(E)

Table A.1 — *Legionella* species associated with disease

| | | | |
|---------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>L. anisa</i> | <i>L. erythra</i> | <i>L. longbeachae</i> | <i>L. pneumophila</i> |
| <i>L. birminghamensis</i> | <i>L. feeleeii</i> | <i>L. lytica</i> | <i>L. sainthelensi</i> |
| <i>L. bozemanii</i> | <i>L. gormanii</i> | <i>L. maceachernii</i> | <i>L. steelei</i> |
| <i>L. cardiaca</i> | <i>L. hackeliae</i> | <i>L. micdadei</i> | <i>L. tusconensis</i> |
| <i>L. cincinnatiensis</i> | <i>L. jordani</i> | <i>L. nagasakiensis</i> | <i>L. wadsworthii</i> |
| <i>L. clemensonensis</i> | <i>L. lansingensis</i> | <i>L. oakridgensis</i> | |
| <i>L. dumoffii</i> | <i>L. londiniensis</i> | <i>L. parisiensis</i> | |

NOTE In addition, *L. waltersii* has been detected by polymerase chain reaction (PCR) from a clinical sample.

Cópia de Trabalho

ISO 11731:2017(E)

Annex B (normative)

Culture media

B.1 Buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar

B.1.1 Composition

| | | |
|--|----------------------|-------------|
| Yeast extract (bacteriological grade) | | 10,0 g |
| Agar | | 12,0 g |
| Activated charcoal | | 2,0 g |
| α -ketoglutarate, monopotassium salt | (CAS No. 58485-42-0) | 1,0 g |
| ACES buffer (N-2-acetamido-2-aminoethanesulfonic acid) | (CAS No. 7365-82-4) | 10,0 g |
| Potassium hydroxide (KOH) (pellets) | (CAS No. 1310-58-3) | 2,8 g |
| L-cysteine hydrochloride monohydrate | (CAS No. 7048-04-6) | 0,4 g |
| Iron(III) pyrophosphate [Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃] | (CAS No. 10058-44-3) | 0,25 g |
| Water (see Clause 6) | | to 1 000 ml |

Check manufacturer's recommendations for concentration of agar to be added to provide adequate gelling strength. All the water used for the preparation of culture media and supplements shall comply with the requirements of ISO 3696, grade 3 (see [Clause 6](#)).

B.1.2 Preparation

a) Cysteine and iron(III) solutions

Prepare fresh solutions of L-cysteine hydrochloride and iron(III) pyrophosphate by adding 0,4 g and 0,25 g, respectively, to 10 ml volumes of water. Sterilize each solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 μ m or lower pore size rating. Store in clean sterile containers at (-20 ± 3) °C for not more than 3 months.

b) ACES buffer

Add the ACES granules to 500 ml of water and dissolve by standing in a water bath at 45 °C to 50 °C. To a separate 480 ml of water, add all the potassium hydroxide pellets and dissolve with gentle shaking. To prepare the ACES buffer, mix the two solutions.

c) Final culture medium

Add sequentially to the 980 ml of ACES buffer the charcoal, yeast extract and α -ketoglutarate.

NOTE ACES buffer can cause denaturation of the yeast extract if the described sequence is not followed.

Prepare a 0,1 mol/l solution of potassium hydroxide (KOH) by dissolving 5,6 g in 1 l of water. Prepare a 0,1 mol/l solution of sulfuric acid (H₂SO₄) by carefully adding 5,5 ml of H₂SO₄ (95 % to 98 %) to 1 l of water. Use the solutions of 0,1 mol/l potassium hydroxide or 0,1 mol/l sulfuric acid as appropriate

ISO 11731:2017(E)

to adjust the pH to $6,8 \pm 0,2$. Add the agar, mix and autoclave at $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ for (15 ± 1) min. After autoclaving, allow to cool to $(48 \pm 3) ^\circ\text{C}$ in a water bath.

Add the L-cysteine and the iron(III) pyrophosphate solutions aseptically, mixing well between additions.

Dispense in 20 ml volumes into Petri dishes of 90 mm to 100 mm diameter. The pH of the final culture medium is $6,8 \pm 0,2$ at $25 ^\circ\text{C}$. Allow excess moisture on the plates to dry and store at $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ in airtight containers in the dark for up to 3 months.

B.2 Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)

Prepare this culture medium in an identical manner to BCYE agar (see B.1) but omit the L-cysteine.

Allow excess moisture on the plates to dry and store at $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ in airtight containers in the dark for up to 3 months.

B.3 Selective culture medium: Buffered charcoal yeast extract agar with selective supplements (BCYE+AB)**B.3.1 Selective supplements**

The final concentrations of the selective supplements in BCYE+AB agar shall be the following:

| | | |
|---------------------------|----------------------|-------------|
| Polymyxin B sulfate | (CAS No. 1405-20-5) | 80 000 IU/l |
| Sodium cefazolin | (CAS No. 27164-46-1) | 0,009 g/l |
| Pimaricin (syn Natamycin) | (CAS No. 7681-93-8) | 0,07 g/l |

NOTE This culture medium is identical to BCYE agar (see B.1) except that three antibiotic supplements are added to the BCYE agar.

B.3.2 Preparation of antibiotic supplements

Add the appropriate amount of polymyxin B sulfate to 100 ml of water to achieve a concentration of 14 545 IU/ml. Sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of $0,2 \mu\text{m}$ or lower pore size rating. Dispense in 5,5 ml volumes into sterile containers and store at $(-20 \pm 3) ^\circ\text{C}$ for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

Add 180 mg of sodium cefazolin to 20 ml of water and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of $0,2 \mu\text{m}$ or lower pore size rating. Dispense in 1 ml volumes into sterile containers and store at $(-20 \pm 3) ^\circ\text{C}$ for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

Add 1,75 g of pimaricin to 100 ml of water and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of $0,2 \mu\text{m}$ or lower pore size rating. Dispense in 4 ml volumes into sterile containers and store at $(-20 \pm 3) ^\circ\text{C}$ for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

B.3.3 Preparation of BCYE+AB agar

After the addition of the L-cysteine and iron(III) pyrophosphate solutions, add one volume of each of the above three antibiotic supplements (see B.3.2) to the final culture medium. Mix well.

Dispense in 20 ml volumes into Petri dishes of 90 mm to 100 mm diameter. The pH of the final culture medium is $6,8 \pm 0,2$ at $25 ^\circ\text{C}$. Allow excess moisture on the plates to dry and store at $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ in airtight containers in the dark for up to 3 months.

ISO 11731:2017(E)

B.4 Highly selective culture medium: Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide (GVPC) agar**B.4.1 Selective supplements**

The final concentrations of selective supplements in the GVPC agar shall be the following:

| | | |
|--------------------------|---------------------|-------------|
| Ammonium-free glycine | (CAS No. 56-40-6) | 3 g/l |
| Polymyxin B sulfate | (CAS No. 1405-20-5) | 80 000 IU/l |
| Vancomycin hydrochloride | (CAS No. 1404-93-9) | 0,001 g/l |
| Cycloheximide | (CAS No. 66-81-9) | 0,08 g/l |

NOTE This culture medium is identical to BCYE agar (see B.1) except that three antibiotic supplements and glycine are added to the BCYE agar.

B.4.2 Preparation of antibiotic supplements

Add the appropriate amount of polymyxin B sulfate to 100 ml of water to achieve a concentration of 14 545 IU/ml. Sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 5,5 ml volumes into sterile containers and store at (-20 ± 3) °C for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

Add 20 mg of vancomycin hydrochloride to 20 ml of water and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 1 ml volumes into sterile containers and store at (-20 ± 3) °C for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

Add 2 g of cycloheximide to 100 ml of water and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 4 ml volumes into sterile containers and store at (-20 ± 3) °C for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

WARNING — Cycloheximide is hepatotoxic. Wear gloves and dust mask when handling this chemical in powder form.

B.4.3 Preparation of GVPC agar

Follow the instructions for preparation of BCYE agar given in B.1, but add 3 g of ammonium-free glycine after the addition of the α-ketoglutarate and then adjust the pH to 6,8 ± 0,2.

After the addition of the L-cysteine and iron(III) pyrophosphate solutions, add one volume of each of the above three antibiotic supplements (see B.4.2) to the final culture medium. Mix well.

Dispense in 20 ml volumes into Petri dishes of 90 mm to 100 mm diameter. The pH of the final culture medium is 6,8 ± 0,2 at 25 °C. Allow excess moisture on the plates to dry and store at (5 ± 3) °C in airtight containers in the dark for up to 4 weeks.

ISO 11731:2017(E)

B.5 Highly selective culture medium: Modified Wadowsky Yee (MWY) agar**B.5.1 Selective supplements**

The final concentrations of selective supplements in the MWY agar shall be the following:

| | | |
|--------------------------|----------------------|-------------|
| Ammonium-free glycine | (CAS No. 56-40-6) | 3 g/l |
| Polymyxin B sulfate | (CAS No. 1405-20-5) | 50 000 IU/l |
| Vancomycin hydrochloride | (CAS No. 1404-93-9) | 0,001 g/l |
| Anisomycin | (CAS No. 22862-76-6) | 0,08 g/l |
| Bromothymol blue | (CAS No. 76-59-5) | 0,01 g/l |
| Bromocresol purple | (CAS No. 115-40-2) | 0,01 g/l |

NOTE This culture medium is identical to BCYE agar (see [B.1](#)) except that three antibiotic supplements, two indicators and glycine are added to the BCYE agar.

B.5.2 Preparation of antibiotic supplements

Add the appropriate amount of polymyxin B sulfate to 100 ml of water to achieve a concentration of 10 000 IU/ml. Sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 5 ml volumes into sterile containers and store at (-20 ± 3) °C for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

Add 20 mg of vancomycin hydrochloride to 20 ml of water and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 1 ml volumes into sterile containers and store at (-20 ± 3) °C for not more than 3 months. For use, thaw at room temperature.

Add 0,1 g of anisomycin to 10 ml of ethanol (see [Clause 6](#)) and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 0,8 ml into sterile containers. Use a fresh solution of anisomycin.

Add 100 mg of bromothymol blue to 100 ml of water and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 10 ml volumes into sterile containers and store at (5 ± 3) °C for a maximum of 1 year.

Add 100 mg of bromocresol purple to 100 ml of water and sterilize the solution by filtration through a sterile membrane filter with an average pore size of 0,2 µm or lower pore size rating. Dispense in 10 ml volumes in sterile containers and store at (5 ± 3) °C for a maximum of 1 year.

B.5.3 Preparation of MWY agar

Follow the instructions for preparation of BCYE agar given in [B.1](#), but add 3 g of ammonium-free glycine after the addition of the α-ketoglutarate and then adjust the pH to 6,8 ± 0,2.

After the addition of the L-cysteine and iron(III) pyrophosphate solutions, add 5 ml of the polymyxin B sulfate, 1 ml of the vancomycin hydrochloride, 0,8 ml of the anisomycin solutions and 10 ml of both indicators (see [B.5.2](#)) to the final culture medium. Mix well.

Dispense in 20 ml volumes into Petri dishes of 90 mm to 100 mm diameter. The pH of the final culture medium is 6,8 ± 0,2 at 25 °C. Allow excess moisture on the plates to dry and store at (5 ± 3) °C in airtight containers in the dark for up to 4 weeks.

ISO 11731:2017(E)**B.6 Blood agar****B.6.1 Composition**

| | | |
|---|---------------------|-------------|
| Agar | | 15,0 g |
| Nutrient substrate (heart extract and peptones) | | 20,0 g |
| Sodium chloride | (CAS No. 7647-14-5) | 5,0 g |
| Blood (e.g. horse or sheep blood) | | 50 ml |
| Water | | to 1 000 ml |

Check manufacturer's recommendations for concentration of agar to be added to provide adequate gelling strength. All the water used for the preparation of culture media and supplements shall comply with the requirements of ISO 3696, grade 3 (see [Clause 6](#)).

B.6.2 Preparation

Suspend the ingredients, with exception of the blood, in water and mix well. If necessary, adjust the pH so that, after autoclaving, it has a value corresponding to $6,8 \pm 0,2$ at 25 °C. Autoclave at (121 ± 3) °C for (15 ± 1) min. After autoclaving, allow to cool to (48 ± 3) °C in a water bath. Add 50 ml blood, mix well and pour into Petri dishes to a depth of at least 4 mm. If not for immediate use, the plates can be stored at (5 ± 3) °C in the dark and protected against evaporation for up to 4 weeks.

B.7 Nutrient agar**B.7.1 Composition**

| | | |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| Agar | | 15,0 g |
| Meat extract | | 1,0 g |
| Enzymatic digest of peptone | | 5,0 g |
| Sodium chloride | (CAS No. 7647-14-5) | 5,0 g |
| Water | | to 1 000 ml |

Check manufacturer's recommendations for concentration of agar to be added to provide adequate gelling strength. All the water used for the preparation of culture media and supplements shall comply with the requirements of ISO 3696, grade 3 (see [Clause 6](#)).

B.7.2 Preparation

Suspend the ingredients in water and mix well. If necessary, adjust the pH so that after autoclaving, it has a value corresponding to $6,8 \pm 0,2$ at 25 °C. Autoclave at (121 ± 3) °C for (15 ± 1) min. After autoclaving, allow to cool to (48 ± 3) °C and pour into Petri dishes to a depth of at least 4 mm. If not for immediate use, the plates can be stored at (5 ± 3) °C in the dark and protected against evaporation for at least 8 weeks.

ISO 11731:2017(E)

B.8 Tryptone soy agar (TSA)**B.8.1 Composition**

| | | |
|---|---------------------|-------------|
| Enzymatic digest of casein | | 15,0 g |
| Enzymatic digest of soy or soybean meal | | 5,0 g |
| Sodium chloride | (CAS No. 7647-14-5) | 5,0 g |
| Agar | | 15,0 g |
| Water | | to 1 000 ml |

Check manufacturer's recommendations for concentration of agar to be added to provide adequate gelling strength. All the water used for the preparation of culture media and supplements shall comply with the requirements of ISO 3696, grade 3 ([Clause 6](#)).

B.8.2 Preparation

Suspend the ingredients in water and mix well. If necessary, adjust the pH so that after autoclaving, it has a value corresponding to $6,8 \pm 0,2$ at 25 °C. Autoclave at (121 ± 3) °C for (15 ± 1) min. After autoclaving, allow to cool to (48 ± 3) °C and pour into Petri dishes to a depth of at least 4 mm. If not for immediate use, the plates can be stored at (5 ± 3) °C in the dark and protected against evaporation for at least 8 weeks.

ISO 11731:2017(E)

Annex C (normative)

Diluents

C.1 Page's saline

C.1.1 Composition

| | | |
|--|----------------------|----------|
| Sodium chloride (NaCl) | (CAS No. 7647-14-5) | 0,120 g |
| Magnesium sulfate (-heptahydrate) [MgSO ₄ ·7H ₂ O] | (CAS No. 10034-99-8) | 0,004 g |
| Calcium chloride (-dihydrate) [CaCl ₂ ·2H ₂ O] | (CAS No. 233-140-8) | 0,004 g |
| Disodium hydrogen phosphate [Na ₂ HPO ₄] | (CAS No. 7558-79-4) | 0,142 g |
| Potassium dihydrogen phosphate [KH ₂ PO ₄] | (CAS No. 7778-77-0) | 0,136 g |
| Water (see Clause 6) | | 1 000 ml |

Add the chemicals to the water. Allow to dissolve, mix well and autoclave at (121 ± 3) °C for (15 ± 1) min.

NOTE To aid accurate preparation, a 10 l volume of Page's saline can be prepared and dispensed in smaller volumes as required for autoclaving at (121 ± 3) °C for (20 ± 1) min.

C.2 Diluted Ringer's solution

Use a 1 in 10 dilution of ¼ strength Ringer's solution as described in ISO 8199.

C.3 Phosphate-buffered saline (PBS) [pH 7,5]

Use a commercially available preparation and reconstitute according to the manufacturer's instructions.

C.4 Sterile tap water

Use sterile tap water that has shown not to have an effect on the recovery of *Legionella*.

ISO 11731:2017(E)

Annex D (normative)

Acid solution

Prepare a 0,2 mol/l solution of hydrochloric acid (HCl) by adding 17,4 ml concentrated HCl ($\rho = 1,184$, minimum assay 37 %) or 20 ml concentrated HCl ($\rho = 1,16$, minimum assay 31,5 %) to 1 l of water (solution A).

Prepare a 0,2 mol/l solution of potassium chloride (KCl) by dissolving 14,9 g of KCl in 1 l of water (solution B).

To prepare the acid solution, mix 3,9 ml of solution A and 25 ml of solution B. Adjust to pH $2,2 \pm 0,2$ by addition of a solution of 1 mol/l potassium hydroxide (KOH). Store in a suitable glass container in the dark at room temperature for not more than 1 month.

Cópia de Trabalho

ISO 11731:2017(E)

Annex E
(informative)

Scraping or rubbing the bacteria from membrane filters

A scraping method to remove *Legionella* from the membrane filters can also be used.

The membrane filter is removed from the stand with disinfected forceps and placed in a sterile Petri dish of a suitable size (usually a Petri dish of 60 mm in diameter for a membrane of 47 mm) containing 5 ml to 10 ml of sterile diluent or filtrate from the original sample. Record the used volume. The membrane is then scraped a few times with a sterile cell scraper (commercially available).

Cópia de Trabalho

Annex F **(informative)**

Centrifugation technique

If there is so much deposit in the sample that concentration by filtration is not possible, the centrifugation technique can be used. Recovery rates for this method are usually much lower than in the other techniques described in this document. Recovery rates are the best with swing out rotors as the deposit is restricted to the bottom of the tube, making it easier to remove the supernatant without disturbing the deposit. Recovery with angle rotors is erratic and lower than in the other techniques in this document.

After shaking to re-suspend any deposit that possibly has settled, pour (200 ± 5) ml of each sample into sterile screw capped centrifuge bottles of between 300 ml and 500 ml capacity. Centrifuge the bottles at 6 000 g for 10 min or 3 000 g for 30 min, maintaining the temperature at 15 °C to 25 °C. Remove the sealed centrifuge head with the bottles contained inside to a safety cabinet before opening the rotor. This avoids exposure to aerosols if a bottle has broken during centrifugation. Remove the supernatant aseptically and discard. Re-suspend the deposit in 2 ml to 10 ml of the diluent (see [Annex C](#)). Ensure that the volume of diluent added is recorded. This concentrate represents the prepared sample. It is recommended that the supernatant is removed by vacuum, rather than decanting, to avoid disturbance and consequent loss of the deposit. If necessary, less sample volume may be used with adjustment to volume of diluent for re-suspension.

Cópia de Trabalho

ISO 11731:2017(E)

Annex G (informative)

Indirect immunofluorescent antibody assay for the identification of *Legionella* species

G.1 General

Legionella species can be identified by a variety of methods. These include gas-liquid chromatography of cellular fatty acids and isoprenozel quinones, indirect immunofluorescent antibody assay, direct fluorescent antibody assay, slide agglutination, latex bead agglutination, colony blot assay based on a genus-specific monoclonal antibody, enzyme-linked immunosorbent assay procedures with appropriate diagnostic reagents, matrix assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF), polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. In this annex, the immunofluorescence method is described as an example of serological method, which can be used to identify *Legionella* species.

G.2 (Serological) reagents

Use diagnostic serological reagents of known specificity from a known source. Do not use a reagent for which this information is not available.

NOTE Serological cross reactions with other microorganisms in environmental samples can sometimes occur.

G.2.1 Antisera to *L. pneumophila* and other *Legionella* species

To identify *L. pneumophila*, use polyclonal or monoclonal antibody preparations capable of reacting with all known serogroups of *L. pneumophila*. Use specific antisera, if it is necessary, to identify species other than *L. pneumophila* or serogroups of *L. pneumophila*.

G.2.2 Fluorescein isothiocyanate anti-rabbit conjugate (FITC)

Use FITC raised against rabbit serum proteins that are available commercially. Different conjugates are required for use with antisera raised in other animals.

G.2.3 Glycerol-mounting medium

Use a commercially available glycerol-mounting medium, or prepare by adding 1 ml of potassium phosphate-buffered saline (pH 8,5) to 9 ml of glycerol (neutral).

G.2.4 Glycerol broth

Dissolve 5 g of a commercially available dehydrated nutrient broth in 170 ml of water (see [Clause 6](#)) and add 30 ml of glycerol. Mix well and dispense in clean, dry silica-glass bottles in volumes of 2 ml. Sterilize by autoclaving at $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ for (20 ± 1) min. Store at room temperature until required.

G.2.5 Formol saline

Prepare by adding 20 ml of a volume fraction of 37 % aqueous solution of formaldehyde to 980 ml of phosphate-buffered saline (see [C.3](#)).

G.3 Preparation of antigens

Using pure growth of the *Legionella* isolate onto plates of BCYE agar (see 8.5), prepare a test antigen (sample) by emulsifying several colonies in formol saline (see G.2.5).

For some reagents, the use of formol saline may not be appropriate, in which case, the colonies can be emulsified in water (see Clause 6) and the suspension inactivated at 60 °C for (60 ± 5) min. It is essential to verify which method of preparation is applicable.

Dilute the test antigen in phosphate-buffered saline (PBS) (see C.3) to give a suspension, which is faintly turbid when viewed with the naked eye.

This corresponds to approximately 1×10^5 cells/ml to 1×10^6 cells/ml and to an optical density of 0,1 using a spectro-photometer at a wavelength of 395 nm with a cuvette of 10 mm optical path length or McFarland nephelometer standard 0,5 diluted 1:100.

Prepare a *Legionella* control antigen in the same way from a reference strain obtained from a recognized culture collection (e.g. National Collection of Type Cultures) cultured on BCYE agar. Store the reference strains frozen as described in ISO 11133.

G.4 Preparation of slides

Use polytetrafluoroethylene-coated slides with multiple wells of diameter 3 mm. Add 5 µl of each antigen (see G.3) to separate wells and allow to dry. Fix either by gentle heating in a Bunsen flame or by immersion in acetone for 10 min.

G.5 Preparation of antiserum (antibody)

Dilute the *Legionella* antiserum (see G.2.1) to the recommended working titre according to the supplier's instructions. Add sufficient diluted antiserum to cover each well containing antigen. Place the slides in a plastic or glass box containing damp tissue or blotting paper to prevent drying.

Cover the box with a lid and incubate at (36 ± 2) °C for (30 ± 1) min.

NOTE Replicates of the same test antigen (sample) can be examined on one slide, but to avoid risk of cross-contamination by reagents or samples, it is advisable to use separate slides for different test antigens (samples).

G.6 Rinsing of slides

Immerse the slides in phosphate-buffered saline (see C.3) in a rotary mixer and wash gently for (5 ± 1) min; replace with fresh phosphate-buffered saline and wash again for (5 ± 1) min; repeat wash once more for (5 ± 1) min.

G.7 Application of conjugate

Dilute the fluorescein isothiocyanate anti-rabbit conjugate (FITC) (see G.2.2) to the working titre, following the supplier's instructions. Add 5 µl of the diluted FITC to each well and incubate in the moist box at (36 ± 2) °C for (30 ± 1) min. Rinse the slides as described in G.6.

G.8 Mounting the slides

Add to each slide sufficient (usually two to three drops) glycerol-mounting medium (see G.2.3) to spread under a clean cover slip big enough to cover all the wells. Ensure that no air bubbles are trapped between the slide and the cover slip.

ISO 11731:2017(E)

G.9 Examination of slides

Examine the slides using an epifluorescent microscope. Regard cells which fluoresce bright green with the species-specific antiserum as confirmed *Legionella* species. Repeat the test with fresh reagents if no fluorescence occurs with the control antigen.

If control antigens do not fluoresce, check the working strength of the antisera by preparing two-fold serial dilutions and titrating these against the control antigen(s).

If cross-reactions or inconclusive results occur, isolates can be sent to a reference laboratory for further examination. The method of packaging for transport should conform to relevant safety regulations.

Cópia de Trabalho

ISO 11731:2017(E)

Annex H (informative)

Performance data

Several trials were undertaken to determine the performance characteristics of this procedure (see [Clause 8](#)). Results from an intralaboratory trial and three interlaboratory studies are summarized in [Table H.1](#) and [Table H.2](#). In the intralaboratory trial, which took place at Vitens Laboratory in Leeuwarden (the Netherlands), the performance parameters such as range of quantitative determination, robustness of incubation time, counting uncertainty, precision, identification (categorical performance characteristics) and recovery have been determined. The data are summarized in [Table H.1](#).

The samples used for the determination of the performance characteristics are mainly potable water and water derived from cooling towers. Data for the determination of the performance characteristics were collected in accordance with ISO 13843[1]. The identification procedures show a high sensitivity, specificity, selectivity and efficiency, with low false-positive and false-negative rates. These performance characteristics were derived in a laboratory, which has a high level of experience in determining *Legionella* species in water samples. It may be necessary for laboratories to carry out their own secondary validation to determine their own performance characteristics.

The robustness of the incubation time was assessed using 147 counts obtained, after 7 d and 10 d of incubation, from three different laboratories. As the robustness determination is based on data from the interlaboratory trial, they may not be representative for non-spiked natural samples.

Three different *Legionella* species (*L. anisa*, *L. gormanii*, and *L. pneumophila*) and four different culture media were used for the calculation of the recovery. BCYE agar was used as the non-selective culture medium and BCYE+AB agar, GVPC agar and MWY agar were used as the selective culture media. The lowest average recovery was found for *L. gormanii* on GVPC agar (64 %).

In March 2015, an interlaboratory study with 27 laboratories from 10 countries was performed (Austria, Cyprus, Finland, Germany, Italy, Netherlands, Spain, Switzerland, United Kingdom, United States) to investigate the precision of the method. Samples used in the interlaboratory trial were spiked with different *Legionella* species and different concentrations of interfering microorganisms. Samples were analysed using direct plating, membrane filtration with direct placing of the membrane filter on the culture media, membrane filtration followed by a washing procedure and plating after dilution of the sample. The different pre-treatments of the sample were also carried out where applicable. Culture media were provided to all participants, therefore the participants used the same batches of culture media.

Due to a change in the acid treatment used as a pre-treatment step for the analyses for *Legionella*, a second interlaboratory study was carried out in June 2015. In this interlaboratory study, 8 laboratories from 3 countries participated (Austria, Germany, the Netherlands). Samples used in the interlaboratory trial were spiked with different *Legionella* species and different concentrations of interfering microorganisms. Samples were analysed using membrane filtration with direct placing of the membrane filter on the culture media, membrane filtration followed by a washing procedure and plating after dilution of the sample. The different pre-treatments of the sample were also carried out where applicable.

The repeatability of the second interlaboratory study varied in a range of 18,0 % to 29,5 % compared to a range of 30,1 % to 35,3 % obtained in the first study. The performance of the reproducibility was better in the second interlaboratory study. The reproducibility in the second study varied from 46,0 % to 54,0 % compared to 56,4 % to 78,5 % in the first interlaboratory study. This may be due to the lower number of participants and shorter sample transport distances in the second study.

A third interlaboratory study was necessary to calculate the performance characteristics of the method using membrane filtration with direct placing of the membrane filter on the culture media. In this interlaboratory study that was carried out in June 2016, 10 laboratories from 4 countries participated

ISO 11731:2017(E)

(Austria, Germany, Netherlands, United Kingdom). The two samples used in this interlaboratory trial were spiked with different *Legionella* species. Samples were analysed using membrane filtration with direct placing of the membrane filter on the culture media. The pre-treatment of the sample with acid solution was also carried out where applicable.

In the third interlaboratory study, of the sample spiked with *L. pneumophila*, the repeatability was 51,1 % and the reproducibility was 65,9 %. The other sample containing *L. anisa* did not show growth on the membrane filter at seven laboratories. There was growth observed at three laboratories with a maximum concentration of 900 cfu/l. One of the laboratories also carried out the direct plating method for this sample. The concentration found with the direct plating method was 36 000 cfu/l. This shows that, in this case, the membrane filter strongly influenced the growth of *L. anisa* on the membrane filter.

The data are summarized in [Table H.1](#) and [Table H.2](#).

Cópia de Trabalho

Table H.1 — Parameters for performance characteristics of the intralaboratory trial

| Intralaboratory trial | | |
|---|--|----------------------------|
| Range of quantitative determination | <ul style="list-style-type: none"> — Single strain without interfering microorganisms between 10 cfu/plate and 300 cfu/plate. — Counts including interfering microorganisms 10 cfu/plate to 150 cfu/plate. — For the membrane filter technique with direct placing of the membrane filter on the plate 10 cfu/plate to 80 cfu/filter. — Always take into account that the growth of other microorganisms on <i>Legionella</i> culture media can strongly influence the growth of <i>Legionella</i> and that the range of quantitative determination has to be adapted to the specific situation. | |
| Robustness of incubation time^a | No significant difference in counts between 7 d and 10 d of incubation ($n = 147$). | |
| Robustness of the method using direct membrane filtration technique | Membrane filters, used for the method of placing the membrane filter directly onto the culture media, have a significant influence on the recovery of <i>Legionella</i> . | |
| Counting uncertainty [relative standard deviation (RSD)] | | |
| <i>Repeatability (within laboratory)</i> | 4,10 % | |
| <i>Reproducibility (within laboratory)</i> | 5,40 % | |
| Precision (RSD) — direct plating | | |
| <i>Repeatability (within laboratory)</i> | 4,15 % | |
| <i>Reproducibility (within laboratory)</i> | 8,23 % | |
| Precision (RSD) — membrane filter on plate | | |
| <i>Repeatability (within laboratory)</i> | 5,09 % | |
| <i>Reproducibility (within laboratory)</i> | 11,86 % | |
| Precision (RSD) — filtration with washing procedure | | |
| <i>Repeatability (within laboratory)</i> | 6,04 % | |
| <i>Reproducibility (within laboratory)</i> | b | |
| Identification (categorical performance characteristics) ($n = 1\ 067$)^c | <i>Confirmation by subculturing on BCYE agar and BCYE-cys agar</i> | <i>Confirmation by PCR</i> |
| <i>Sensitivity</i> | 99,0 % | 98,6 % |
| <i>Specificity</i> | 95,3 % | 97,5 % |
| <i>False-positive rate</i> | 3,3 % | 1,8 % |
| <i>False-negative rate</i> | 1,4 % | 2,1 % |
| <i>Selectivity</i> | 57,2 % | 58,1 % |
| <i>Efficiency</i> | 97,5 % | 98,1 % |
| <i>Recovery</i> | > 64 % | |
| <p>^a From interlaboratory trial.</p> <p>^b The average relative operational standard deviation in intralaboratory reproducibility conditions observed during the characterization process was not significantly different from zero (ideal case).</p> <p>^c The performance characteristics of the identification were also calculated based on the confirmation by PCR. Besides the confirmation of suspicious colonies by subculturing on BCYE agar and BCYE-cys agar, these colonies were also confirmed by an ISO/IEC 17025[2] accredited in-house PCR method. The small differences of the identification were caused by target and non-target colonies that were overgrowing each other.</p> | | |

ISO 11731:2017(E)

Table H.2 — Parameters for performance characteristics of the interlaboratory trial

| Interlaboratory trial | | |
|--|-----------------|--------|
| Precision (RSD) — direct plating, low concentration of interfering microorganisms (see 8.4.2) (n = 24) | Repeatability | 35,3 % |
| | Reproducibility | 56,4 % |
| Precision (RSD) — membrane filter on plate, low concentration of interfering microorganisms (see 8.4.3.1) (n = 10) | Repeatability | 51,1 % |
| | Reproducibility | 65,9 % |
| Precision (RSD) — filtration with washing procedure, low concentration of interfering microorganisms (see 8.4.3.2) (n = 14) | Repeatability | 22,5 % |
| | Reproducibility | 49,5 % |
| Precision (RSD) — direct plating and plating after dilution, high concentration of interfering microorganisms (see 8.4.4) (n = 16) | Repeatability | 29,5 % |
| | Reproducibility | 54,0 % |
| Precision (RSD) — filtration with washing procedure, high concentration of interfering microorganisms (see 8.4.4) (n = 74) | Repeatability | 30,1 % |
| | Reproducibility | 78,5 % |
| Precision (RSD) — direct plating and plating after dilution, extremely high concentration of interfering microorganisms (see 8.4.5) (n = 8) | Repeatability | 18,0 % |
| | Reproducibility | 46,0 % |

ISO 11731:2017(E)

Annex I (informative)

Pre-treatment of water related matrices

Water related matrices include, for example, swabs, sediments, biofilms, filter material from water treatment filters (sand, granular activated carbon, etc.).

Pre-treatment of the water related sample depends on the type of sample. In this annex, examples are described of commonly used water related matrices.

EXAMPLE 1 Swab: For a semiquantitative analysis, swab a certain area (e.g. approximately $10\text{ cm} \times 10\text{ cm} = 100\text{ cm}^2$). The swab will be transferred into a tube with an appropriate diluent. Be sure that the cotton of the swab is completely immersed in the diluent. Mix thoroughly with the help of a vortex mixer or by means of an ultrasonic water bath for 2 min. The suspension is then further used in the procedure for water related matrices. Results can be expressed as number per 100 cm^2 . If the area swabbed is not known, e.g. in case of irregular surface, record the number per swab.

EXAMPLE 2 Sediments or other solid material: Aseptically transfer from 0,1 g to 10,0 g of material into a tube with a volume of the appropriate diluent in millilitres nine times the value number of the weight in grams (e.g. from 0,9 ml to 90,0 ml). Mix thoroughly with the help of a vortex mixer or by means of an ultrasonic water bath for 2 min. The suspension is then further used in the procedure for water related matrices.

Cópia de Trabalho

ISO 11731:2017(E)

Annex J (normative)

Decision matrix

The choice of the method used for the enumeration of *Legionella* species depends on the origin/characteristics of the sample and the reason of sampling or investigation. Once the desired lower limit of detection level for a sample is known, this will play an important role in the selection of the most appropriate method.

The decision matrix (see [Figure J.1](#)) summarizes all possible types of water (samples), methods, treatments and culture media. [Clause 8](#) and the text of this annex give more background information. The following steps shall be followed ([Table J.3](#) shows examples).

The **first step** is to determine the origin and characteristics of the sample. In most cases, this information can be derived from the customer. Choose at least one of the different possibilities which are the following:

- Water with an expected low concentration of interfering microorganisms, e.g. potable water:
 - **and** an expected high concentration of *Legionella* species → the sample shall be analysed by the procedure described in [8.4.2](#);
 - **and** an expected low concentration of *Legionella* species → the sample shall be analysed by one of the procedures described in [8.4.3](#).
- Water with an expected high concentration of interfering microorganisms, e.g. evaporative cooling tower, process water, water from air washers chambers, water from dental units → the sample shall be analysed by the procedure described in [8.4.4](#).
- Water with an expected extremely high concentration of interfering microorganisms or microorganisms that only will be removed from the samples with a combined heat/acid treatment, e.g. waste water, surface water → the sample shall be analysed by the procedure described in [8.4.5](#).

The **second step** is to determine the desired lower limit of detection level and to select one or more method(s). Examples of the lower limit of detection level per method are shown in [Table J.1](#). Be aware that different methods have advantages and disadvantages (see [Table J.2](#)).

The **third step** is the selection of the required treatment(s). Besides the required treatment(s), optional treatment(s) can be carried out.

The **fourth step** is the selection of the required culture media. Besides the required culture media, optional culture media can be used.

ISO 11731:2017(E)

Table J.1 — Lower limit of detection level per method

| Direct plating (see 8.4.2) | Membrane filter on plate (see 8.4.3.1) |
|---|--|
| $C_s = \frac{a}{V_{tot}} \times V_s$ <p>where C_s is the number of <i>Legionella</i> in cfu/l; a is the number of calculated confirmed <i>Legionella</i> colonies $a = \frac{\text{fraction positive confirmed}}{\text{fraction total confirmed}} \times \text{total count}$; V_{tot} is the total tested sample volume in millilitres, ml; V_s is the reference volume chosen to express the concentration of the microorganisms in the sample (normally 1 000 ml).</p> <p>Example detection limit: in case of 0,1 ml sample inoculation, the detection limit is 10 000 cfu/l.</p> | $C_s = \frac{a}{V_{tot}} \times V_s$ <p>where C_s is the number of <i>Legionella</i> in cfu/l; a is the number of calculated confirmed <i>Legionella</i> colonies $a = \frac{\text{fraction positive confirmed}}{\text{fraction total confirmed}} \times \text{total count}$; V_{tot} is the total tested sample volume in millilitres, ml; V_s is the reference volume chosen to express the concentration of the microorganisms in the sample (normally 1 000 ml).</p> <p>Example detection limit: in case of 10 ml filtered sample, the detection limit is 100 cfu/l.</p> |
| Filtration with washing procedure (see 8.4.3.2) | Plating after dilution (see 8.4.4 and 8.4.5) |
| $C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{tot}} \times V_s$ <p>where C_s is the number of <i>Legionella</i> in cfu/l; a is the number of calculated confirmed <i>Legionella</i> colonies $a = \frac{\text{fraction positive confirmed}}{\text{fraction total confirmed}} \times \text{total count}$; V_c is the (concentrated) sample volume in millilitres, ml; V is the sample volume inoculated per plate or set of plates (from the same culture medium) in millilitres, ml; V_{tot} is the total tested sample volume in millilitres, ml; V_s is the reference volume chosen to express the concentration of the microorganisms in the sample (normally 1 000 ml).</p> <p>Example detection limit: in case of 500 ml filtered sample washed in 5 ml water and 0,1 ml inoculation, the detection limit is 100 cfu/l.</p> <p>If there is overgrowth on the “heat treated” and “untreated” plates and no detectable <i>Legionella</i> on the “acid treated” plate, the example detection limit is increased by a factor of 10.</p> | $C_s = \frac{a \times V_s}{V_{dil}} \times Df$ <p>where C_s is the number of <i>Legionella</i> in cfu/l; a is the number of calculated confirmed <i>Legionella</i> colonies $a = \frac{\text{fraction positive confirmed}}{\text{fraction total confirmed}} \times \text{total count}$; V_s is the reference volume chosen to express the concentration of the microorganisms in the sample (normally 1 000 ml); V_{dil} is the diluted sample volume inoculated per plate or set of plates (from the same culture medium) in millilitres, ml; Df is the dilution factor.</p> <p>Example detection limit: 1 ml heated sample treated with 9 ml acid. In case of 10 times dilution and 0,1 ml treated sample inoculation, the detection limit is 1 000 000 cfu/l.</p> <p>If there is overgrowth on the “heat treated” and “untreated” plates and no detectable <i>Legionella</i> on the “acid treated” plate, the example detection limit is increased by a factor of 10.</p> |

ISO 11731:2017(E)

Table J.2 — Advantages and disadvantages of the different methods

| Method | Advantages | Disadvantages |
|-----------------------------------|---|--|
| Direct plating | Easy to count Good recovery | High limit of detection |
| Membrane filter on plate | Easy method Low limit of detection | Difficult to count (due to overgrowth of interfering microorganisms) Influence of the membrane filter |
| Filtration with washing procedure | Easy to count Low limit of detection | Lower recovery (compared with direct plating method and membrane filter on plate method) Time-consuming |
| Plating after dilution | Easy to count Good recovery | High limit of detection Time-consuming |

Cópia de Trabalho

ISO 11731:2017(E)

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

Figure J.1 — Decision matrix

ISO 11731:2017(E)

Table J.3 — Four examples for illustration of the decision matrix

| Example 1 | |
|--|--|
| Step 1: Determine the origin and expected characteristics of the sample and choose one of the water types from the two top rows in the decision matrix. | Sample 1: Water with a low concentration of interfering microorganisms and a high concentration of <i>Legionella</i> species |
| Step 2: Choose one of the methods from the first column, based on the desired lower limit of detection and on what is shown as required in the decision matrix. | Method: Direct plating |
| Step 3: Select the treatment(s), based on what is shown as required in the decision matrix. | Treatment: Without treatment Optional treatment (additional, if desired): Heat treatment and/or acid treatment |
| Step 4: Select the culture media, based on what is shown as required in the decision matrix. | Required media: BCYE agar and BCYE+AB agar Optional medium (additional, if desired): GVPC agar or MWY agar |
| Detailed reporting in case of Example 1 | <i>Reference to this document (ISO 11731)</i> <i>[Matrix A; Procedure 1; Media A and B]</i> |
| Example 2 | |
| Step 1: Determine the origin and expected characteristics of the sample and choose one of the water types from the two top rows in the decision matrix. | Sample 2: Water with a low concentration of interfering microorganisms and a low concentration of <i>Legionella</i> species |
| Step 2: Choose one of the methods from the first column, based on the desired lower limit of detection and on what is shown as required in the decision matrix. | Method: Membrane filter on plate |
| Step 3: Select the treatment(s), based on what is shown as required in the decision matrix. | Treatment: Without treatment and acid treatment |
| Step 4: Select the culture media, based on what is shown as required in the decision matrix. | Required media: BCYE agar for the sample without treatment and a choice between either "BCYE+AB agar" or "GVPC agar or MWY agar" for the acid-treated filtered sample |
| Detailed reporting in case of Example 2 | <i>Reference to this document (ISO 11731)</i> <i>[Matrix A; Procedure 5 (Medium A) and Procedure 7 (Medium C — MWY)]</i> |
| Example 3 | |
| Step 1: Determine the origin and expected characteristics of the sample and choose one of the water types from the two top rows in the decision matrix. | Sample 3: Water with a high concentration of interfering microorganisms |
| Step 2: Choose one of the methods from the first column, based on the desired lower limit of detection and on what is shown as required in the decision matrix. | Method: Filtration with washing procedure |
| Step 3: Select the treatment(s), based on what is shown as required in the decision matrix. | Treatment: Without treatment, heat treatment and acid treatment |
| Step 4: Select the culture medium, based on what is shown as required in the decision matrix. | Required medium: GVPC agar or MWY agar Optional medium (additional, if desired): BCYE+AB agar |
| Detailed reporting in case of Example 3 | <i>Reference to this document (ISO 11731)</i> <i>[Matrix B; Procedure 8, 9 and 10; Medium C — GVPC]</i> |

ISO 11731:2017(E)

Table J.3 (continued)

| Example 4 | |
|--|--|
| Step 1: Determine the origin and expected characteristics of the sample and choose one of the water types from the two top rows in the decision matrix. | Sample 4: Water with an extremely high concentration of interfering microorganisms |
| Step 2: Choose the two required methods from the first column, based on the desired lower limit of detection and on what is shown as required in the decision matrix. | Method: Direct plating and plating after dilution |
| Step 3: Select the treatment(s), based on what is shown as required in the decision matrix. | Treatment: Combination of heat and acid treatment |
| Step 4: Select the culture medium, based on what is shown as required in the decision matrix. | Required medium: GVPC agar or MWY agar Optional medium (additional, if desired): BCYE+AB agar |
| Detailed reporting in case of Example 4 | <i>Reference to this document (ISO 11731)</i> <i>[Matrix C; Procedures 4 and 14; Medium C — MWY]</i> |

Cópia de Trabalho


ISO 11731:2017(E)

Bibliography

- [1] ISO 13843, *Water quality — Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods*
- [2] ISO/IEC 17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*
- [3] BOPP C.A. et al. Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. *J. Clin. Microbiol.* April 1981, **13** (4), pp. 714–719
- [4] DENNIS P.J. et al. *Comparison of isolation methods for Legionella spp. Legionella, Proceedings of the 2nd International Symposium.* American Society for Microbiology, 1984. pp. 294–296
- [5] DITOMMASO S. Recovery of *Legionella* species from water samples using an internal method based on ISO 11731: suggestions for revision and implementation. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, **70** pp. 200–206
- [6] SMITH L. Comparison of membrane filters for recovery of legionellae from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* January 1993, **59** (1), pp. 344–346
- [7] WADOWSKY R.M., & YEE R.B. Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens. *Appl. Environ. Microbiol.* November 1981, **42** (5), pp. 768–772

Cópia de Trabalho

B ■ Procedimento Técnico de Microbiologia: PT mic – Detecção e enumeração de *Legionella*

| | | | | |
|--|--|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PTMic – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 1/11 | |
| | Ed. 01 | Rev. 02 | | |

Mimic10, Baseado na ISO 11731

ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este procedimento destina-se a descrever o método de cultura e isolamento para estimativa do número de *Legionella* presente em amostras de água. Pode ser aplicado a amostras de águas de consumo, naturais doces, piscinas, de processo e residuais, bem como outras matrizes relacionadas, como por exemplo biofilmes e sedimentos.

Uma vez que nem todas as espécies de *Legionella* são cultiváveis, a metodologia descrita neste procedimento não permite recuperar todas as espécies de *Legionella*.

DEFINIÇÃO

Legionella é o género de microrganismo normalmente capaz de crescer em meio BCYE, meio de cultura de extrato de levedura e carvão tamponado, que contenha L-cisteína e sais de ferro (III).

O género *Legionella* pertence à ordem taxonómica *Legionellales*, esta ordem inclui as famílias *Coxiellaceae* e *Legionellaceae*, dentro da família *Legionellaceae* estão propostos os géneros *Legionella*, *Fluoribacter* e *Tatlockia*, sendo o género *Legionella* usado universalmente para descrever todas as espécies.

Legionellae são pequenos bacilos, Gram negativos, com requisitos de crescimento exigentes (fastidiosos), utilizam as proteínas em vez de hidratos de carbono como fonte de energia. O aminoácido L-cisteína é necessário para o crescimento inicial das espécies de *Legionella* de origem ambiental ou clínica. São aeróbios obrigatórios e crescem numa gama de temperatura entre os 20°C e os 42°C.

Estão descritas pelo menos 61 espécies diferentes de *Legionella*, das quais 26 têm estirpes que causaram infecção nos humanos. A *Legionella pneumophila* tem pelos menos 15 serogrupos diferentes.

PROCEDIMENTO

AMOSTRAGEM


A colheita da amostra deve ser realizada de acordo com o Procedimento Interno de colheita para análise de *Legionella*.

As amostras devem ser transportadas protegidas de calor e da luz solar e a menos de 18°C, mas a uma temperatura superior a 6°C. As amostras devem ser entregues no laboratório tão rápido quanto possível, o que não deve exceder os dois dias.

Preparação de amostras de matrizes relacionadas, por exemplos zaragatoas, sedimentos, biofilmes, ou material filtrado de sistemas de tratamento de água, por exemplo areias ou carvão ativado:

Zaragatoas: após efetuar a zaragatoa, preferencialmente numa superfície de área conhecida, por exemplo 10 cm x 10 cm = 100 cm², colocar num tubo contendo diluente suficiente para cobrir o algodão e colocar no

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | | |
|--|---|--|-----------|---------|
|  SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PT_{Mic} – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 2/11 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 02 |

Vortex ou em banho de ultrassom durante 2 minutos. Tratar o diluente como amostra de água e apresentar o resultado em ufc/XX cm² ou caso a área não seja conhecida em ufc/zaragatoa.

Sedimentos e material sólido: transferir 0.1g a 10 g para um tubo/frasco e adicionar 9 vezes, 0.9mL a 90 mL, de diluente ou água, colocar no Vortex ou em banho de ultrassom durante 2 minutos. Tratar o diluente como amostra de água e apresentar o resultado em ufc/g.

Cópia Não Controlada

DECISÃO DO MÉTODO A APLICAR

Devido à natureza complexa das diferentes matrizes de amostras, o laboratório deve determinar o método apropriado a cada tipo de amostra. (Anexo I e Anexo II)

Se for expectável que o número de *Legionella* seja superior a 10⁴ ufc/L pode proceder-se à sementeira diretamente com a amostra sem ser concentrada (**Método Directo**). As amostras extremamente contaminadas devem ser diluídas e inoculadas com e sem tratamento (**Método Diluído**).

Para garantir a deteção de *Legionella* em amostras de água será necessário na maioria dos casos concentrar a amostra por filtração em membrana, e quando não é conhecido o grau de contaminação da amostra, em geral, deve aplicar-se a técnica de concentração da amostra por filtração em membrana.

A técnica de filtração em membrana pode ser seguida de colocação direta do filtro em placa contendo meio de cultura ou pode ser seguida de Eluição.

MÉTODO DE FILTRAÇÃO EM MEMBRANA (FM) E COLOCAÇÃO DIRETA DO FILTRO EM PLACA:

Filtrar um volume de amostra (sem tratamento, depois de tratamento ácido, e se necessário, depois de tratamento térmico) através da membrana de nitrato de celulose ou de mistura de esteres de celulose (0,2 µm ou 0,45 µm). O tratamento ácido também pode ser aplicado diretamente na membrana. Remover cuidadosamente a membrana e colocar na placa de meio de cultura, com a face virada para cima e sem deixar bolhas de ar entre a membrana e o meio.


MÉTODO DE FILTRAÇÃO EM MEMBRANA E ELUIÇÃO (FME) - CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA:

Filtrar um volume de amostra através da membrana de policarbonato ou PES (polyethersulfone) (0,2 µm). Remover a membrana cuidadosamente, evitar perder o eventual depósito de resíduo, e colocar a membrana com a face virada para baixo num frasco estéril com ou sem esferas de vidro e adicionar 5 a 10 mL de diluente ou amostra, agitar vigorosamente, pelo menos durante dois minutos.

Para aumentar a eluição, a membrana pode ser cortada em pedaços ou pode ser colocada numa placa de 60 mm que contenha 5 a 10 mL de diluente e raspada algumas vezes com raspador estéril.

Este concentrado representa a amostra preparada. Dividir em três porções o concentrado e inocular, sem tratamento, com tratamento ácido e com tratamento térmico.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | |
|--|---|-----------|---------|
|  Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PT_{Mic} – Detecção e Enumeração de Legionella | Pág. 3/11 | |
| | | Ed. 01 | Rev. 02 |

PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA**Tratamento térmico:**

Colocar um volume de amostra num tubo esterilizado, preferencialmente um volume inferior a 5 mL e colocar no banho de 50±1°C durante 30±2 minutos.

Tratamento ácido:

Diluir um volume de amostra em nove de solução ácida, agitar bem e deixar em repouso 5±0,5 minutos.

O tratamento ácido pode ser aplicado diretamente na membrana de filtração, para tal, adicionar cerca de 30 mL de solução ácida na rampa de filtração e deixar durante 5±0,5 minutos, remover o ácido por filtração e lavar a membrana com pelo menos 20 mL de diluente.

CULTURA

A escolha do método de cultura utilizado para enumeração de *Legionella* depende da origem e das características da amostra, bem como do motivo da análise e do limite de detecção pretendido (Anexo I e II).

a) Cultura para amostras com elevada concentração de Legionella (>10⁴ ufc/L) e baixa concentração de microrganismos interferentes:

Inocular por espalhamento nas placas de meio BCYE e GVPC 0,1 a 0,5 mL de amostra direta.

b) Cultura para amostras com baixa concentração de Legionella e baixa concentração de microrganismos interferentes:

b.1) Cultura do filtro de membrana em placa:

Filtrar a amostra e colocar a membrana diretamente em placa de meio BCYE.

Quando aplicado tratamento ácido no filtro de membrana este deve ser colocada em placa de meio GVPC.

b.2) Cultura do filtrado em membrana com eluição:

Inocular por espalhamento 0,1 mL a 0,5 mL de cada porção do concentrado da amostra, sem tratamento, com tratamento ácido e com tratamento térmico, em placa de BCYE e GVPC.

c) Cultura para amostras com elevada concentração de microrganismos interferentes:


Separar a amostra, direta, concentrada ou diluída (1:10), em três porções uma sem tratamento, outra com tratamento térmico e outra com tratamento ácido e inocular por espalhamento 0,1 mL a 0,5 mL em placa de meio GVPC.

d) Cultura para amostras com extremamente elevada concentração de microrganismos interferentes:

Semear a amostra direta e diluída (1:10 e 1:100) após o pré-tratamento térmico e ácido combinados, isto é, efetuar primeiro o tratamento térmico tal como descrito anteriormente, arrefecer até à temperatura ambiente e efetuar o tratamento ácido. Preparar as diluições após o tratamento ácido com o diluente. Inocular por espalhamento 0,1 mL a 0,5 mL de cada porção (100, 10-1 e 10-2) em placa de meio GVPC.

Nota: Registrar todos os volumes tratados, quer de amostra, de diluente e de inóculo em sementeira.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | | |
|--|--|--|-----------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PTMic – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 4/11 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 02 |

INCUBAÇÃO

Deixar as placas em repouso até à absorção completa do inóculo. Inverter as placas e incubar na estufa de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 a 10 dias. Prevenir a desidratação das placas criando uma atmosfera húmida, por exemplo, colocando as placas a incubar em recipiente fechado.

Cópia Não Controlada

LEITURA DAS PLACAS

Analisar as placas pela primeira vez no dia 2, 3, 4 ou 5, e posteriormente no fim do período de incubação. O resultado final só pode ser determinado findo o período de incubação. Como o crescimento de *Legionella* é lento é recomendável analisar as placas á lupa. Registrar o número de cada tipo de colónia característica de *Legionella*.

As colónias características de *Legionella* são geralmente brancas acinzentadas, mas podem aparecer de outras cores. São lisas, de bordos inteiros e têm a característica de aparência de "vidro-moído". Quando observadas sob lâmpada de luz ultravioleta algumas espécies de *Legionella* apresentam autofluorescência, *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* e *L. tucsonensis*, e apresentam fluorescência branca, enquanto *L. erythra* e *L. rubrilucens* e aparecem vermelhas. As colónias de *L. pneumophila* são esverdeadas por vezes tingidas de amarelo. A cor da fluorescência pode ajudar a distinguir colónias de diferentes espécies de *Legionella* que possam estar presentes. As placas devem ser observadas à lâmpada UV pelo tempo mínimo possível. É importante salientar que novas espécies de *Legionella* podem apresentar características diferentes das descritas anteriormente.

CONFIRMAÇÃO DAS COLÓNIAS PRESUNTIVAS EM PLACAS DE MEIO BCYE E MEIO SEM CISTEÍNA

Repicar as colónias características da placa que apresentar maior contagem de colónias presuntivas por volume de água. Quando só existir um tipo de colónias presuntivas repicar três colónias. Se existirem mais que um tipo diferente de colónias, retirar pelo menos uma colónia de cada tipo.


Repicar as colónias presuntivas, tendo o cuidado de não arrastar meio de cultura da placa inicial e inocular primeiro em placa de meio sem cisteína (TSA, NA ou BCYE-cis) e de seguida em placa de BCYE.

Incubar na estufa de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 a 5 dias. Considerar como *Legionella* spp as colónias que crescerem em BCYE mas que não apresentem crescimento no meio sem cisteína.

Se as colónias iniciais não confirmarem como *Legionella*, analisar as colónias de outras placas, de diferente meio de cultura ou de outro pré-tratamento.

A *L. oakridgensis* e *L. spiritensis* necessitam de L-cisteína e sais de ferro (III) para o isolamento primário, contudo, conseguem apresentar algum crescimento na ausência de L-cisteína, como tal é importante comparar cuidadosamente as diferenças no crescimento entre os meios com e sem este aminoácido.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | | |
|--|--|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PTMic – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 5/11 | |
| | Ed. 01 | Rev. 02 | | |

CONFIRMAÇÃO DAS COLÓNIAS DE LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Nas colónias identificadas como *Legionella* spp realiza-se o teste serológico de aglutinação para identificação de *Legionella pneumophila* e serogrupo (1 ou outro).

EXPRESSÃO DE RESULTADOS

Para apresentar o resultado de ufc de *Legionella* estimado na amostra, escolher a placa ou placas (desde que do mesmo meio de cultura) que apresentam o maior número de colónias confirmadas por volume de água. Ter em consideração a diluição em causa.

Não considerar como réplicas os resultados obtidos por diferentes métodos, tratamentos ou meios de cultura.

Para calcular o número de ufc de *Legionella* por Litro escolher a fórmula adequada disponível no anexo I.

Se não existirem colónias confirmadas o resultado é expresso como Não detectado/Volume examinado, o LD é determinado em função da técnica usada.

O Relatório de Ensaio deve explicitar a(s) técnica aplicada, o(s) tratamento, o(s) meio de cultura e o volume máximo usado na análise.

O Relatório de ensaio deve apresentar a identificação da amostra para que não suscite dúvidas: morada, local exacto da colheita, técnica de amostragem usada, tipo de amostra, temperatura da colheita e concentração do biocida na amostra.

CONTROLO DE QUALIDADE

Efetuar o Controlo de Qualidade definido em PAM11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia.


Para além do controlo de qualidade definido no PAM11 incluir um controlo positivo de *L. pneumophila* e outra espécie de *Legionella*.

MEIOS DE CULTURA

Preparar os meios de cultura conforme indicação do fabricante e efetuar o controlo definido em PAM09 – Controlo de Meios de Cultura.


Secar antecipadamente as placas dos meios a usar. (De acordo com a norma ISO 11133 podem deixar-se as placas a secar meia abertas na estufa entre 25-50°C, apenas o tempo necessário para secar todas as gotículas, pode também deixar-se na camara de fluxo laminar 30-60 min, ou deixar-se as placas fora do frigorífico, invertidas, de um dia para o outro.)

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | | |
|--|--|--|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PTMic – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 6/11 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 02 |

| Meio de Cultura | Conservação (após preparação) | Observações |
|--|--------------------------------------|-------------|
| SOLUÇÃO DILUIÇÃO Diluente: Sol. Page's Saline MODO DE AÇÃO: A solução salina de Page é recomendada para a concentração de bactérias por filtração, incluindo Legionella. Para o processamento de amostras adiciona-se a membrana num balão com 5-25 ml de solução salina de Page, e em seguida agita-se vigorosamente durante pelo menos 2 minutos. Como o crescimento de Legionella pode ser inibido por supercrescimento de outras bactérias na membrana, o método só é adequado para águas com baixas contagens bacterianas. | (5 ± 3) °C, no escuro 6 meses | |
| SOLUÇÃO DE TRATAMENTO ÁCIDO Sol. Tampão Ácido MODO DE AÇÃO: solução acida preparada com 3.9 mL de solução A (sol. HCl 0.2M) + 25 mL de solução B (sol. KCl 0.2M), acerto de pH com solução KOH 1M. Solução A: HCl 0.2 M – 17.4 mL HCL (ρ=1.184, 37%) ou 20 mL HCl (ρ=1.16, 31.5%) em 1000 mL água Solução B: KCl 0.2M – 14.9 g KCl em 1000 mL água. | Temp. ambiente, 1 mês | pH 2,2±0.2 |
| MEIO DE CRESCIMENTO Meio BCYE MODO DE AÇÃO: O meio de BCYE é baseado na fórmula de Edelstein e está em conformidade com a norma ISO 11731. O carvão ativado decompõe o peróxido de hidrogénio, liga o dióxido de carbono, altera a tensão superficial e remove os produtos metabólicos tóxicos. O extrato de levedura fornece proteínas e vitaminas para o crescimento bacteriano. O tampão ACES/hidróxido de Potássio estabiliza o pH do meio e a presença de L-cisteína, de pirofosfato de ferro (III) e o alfa-cetoglutarato favorecem o crescimento de espécies de Legionella e fornecem factores de crescimento essenciais. | (5 ± 3) °C, no escuro 3 meses | |
| MEIO DE CRESCIMENTO SELECTIVO Meio BCYE+AB MODO DE AÇÃO: O meio de BCYE+AB é preparado como o meio BCYE mas com a adição de antibióticos (agentes seletivos e inibidores). Nomeadamente o sulfato de Polimixina B e a Cefazolina sódica para inibição da flora secundária como bactérias Gram positivas e a Piramicina (ou Natamycina) que é um agente antifúngico. | (5 ± 3) °C, no escuro 3 meses | |
| MEIO DE CRESCIMENTO SELECTIVO Meio GVPC MODO DE AÇÃO: O meio de GVPC é preparado como o meio BCYE mas com a adição de antibióticos (agentes seletivos e inibidores). Nomeadamente a Glicina, a Vacomicina, a Polimixina B para inibição da flora secundária como bactérias Gram positivas e a Cicloheximida para inibição de fungos. | (5 ± 3) °C, no escuro 1 mês | |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | | |
|---|---|--|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PT_{Mic} – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 7/11 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 02 |
| MEIO DE CONFIRMAÇÃO | | | | |
| Meio BCYE-cis - | | (5 ± 3) °C, no escuro 3 meses | | |
| MODO DE AÇÃO: O meio de BCYE-cis é preparado como o meio BCYE, mas sem L-cisteína, pelo que este meio, combinado com BCYE é utilizado para confirmação de <i>Legionella</i> spp. presuntiva, uma vez que as espécies de <i>Legionella</i> crescem em meio de BCYE mas não conseguem crescer na ausência de L-cisteína. | | | | |
| MEIO DE CONFIRMAÇÃO ALTERNATIVO | | | | |
| Meio TSA ou NA | | (5 ± 3) °C, no escuro 6 meses frasco, 1 mês em placa | | |
| MODO DE AÇÃO: Uma vez que as espécies de <i>Legionella</i> não conseguem crescer na ausência de L-cisteína, os meios TSA e NA não contendo este aminoácido permitem proceder à confirmação desta espécie. | | | | |
| TESTE DE CONFIRMAÇÃO-REAGENTE SEROLÓGICO | | | | |
| Aglutinação Legionella Latex Testa | | (5 ± 3) °C, | | |
| MODO DE AÇÃO: O <i>Legionella</i> Latex Testa utiliza partículas de látex azul com anticorpos que aglutinam na presença de antígenos específicos da parede celular de <i>Legionella</i> e formam aglomerados visíveis. Existem 14 serotipos diferentes de <i>Legionella pneumophila</i> , dos quais o serogrupo 1 é responsável por 90% dos casos. Este teste permite identificar <i>L. pneumophila</i> serogrupo 1, serogrupo 2 a 14 e outras espécies de <i>Legionella</i> . | | | | |

ACÇÕES PREVENTIVAS E CORRECTIVAS

Sempre que o procedimento ou parte dele não seja integralmente cumprido, deverá ser accionado o procedimento definido para o trabalho não conforme, bem como accionadas acções correctivas caso sejam necessárias.

IMPRESSOS ASSOCIADOS

Im32 – Legionella – Registo de Resultados


DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

PA_m11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia

PA_m09 – Preparação e controlo dos meios de cultura

Documento digital - Calculo Legionella

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | |
|--|---|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PT_{Mic} – Detecção e Enumeração de Legionella | Pág. 8/11 | |
| | | Ed. 01 | Rev. 02 |

REFERÊNCIAS NORMATIVAS

ISO 11731 – Water quality – Enumeration of Legionella

Guia Relacre nº28 – Guia de Amostragem de Águas, Janeiro 2017

Cópia Não Controlada


MODIFICAÇÕES À NORMA DE REFERÊNCIA

| Modificações Introduzidas | ISO 11731:2017 | PT _{Mic} |
|---|----------------|--------------------|
| Colheita de amostras | - | PA _M 19 |
| Meio de crescimento selectivo para cultura directa de amostras com baixa concentração de interferentes e elevada concentração de Legionella | BCYE+AB | GVPC |

HISTORIAL DE EDIÇÕES / REVISÕES

| Edição/Revisão | Alterações Introduzidas | Entrada em vigor |
|----------------|--|------------------|
| 01/00 | Documento Novo | 30-05-2017 |
| 01/01 | Reestruturação para adaptação à ISO 11731:2017 | 09-04-2018 |
| 01/02 | Amostras com baixa concentração de interferentes, substituição de BCYE+AB por GVPC | 17-09-2018 |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |


| | | | | |
|---|--|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PTMic – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 9/11 | |
| | Ed. 01 | Rev. 02 | | |

ANEXO I

Tabela resumo dos métodos de cultura, com respetiva fórmula de cálculo, Limite de deteção e vantagens (↗) e desvantagens (↘).

| | | |
|--|--|---|
| Cultura direta da amostra (Método Directo): | | |
| $N_{ufc} = \frac{n}{V_t} \times V_r$ | Ex. volume inoculado 0.1 mL: LD: 10000 ufc/L | ↗ Contagem fácil ↗ Elevada recuperação ↘ Elevado LD |
| Cultura do filtro de membrana em placa (Método FM): | | |
| $N_{ufc} = \frac{n}{V_t} \times V_r$ | Ex. volume filtrado 10 mL: LD: 100 ufc/L | ↗ Método fácil ↗ Baixo LD ↘ Influência da membrana ↘ Contagem difícil devido a interferentes |
| Cultura do filtro de membrana e eluição (Método FME): | | |
| $N_{ufc} = \frac{n \times V_c}{V \times V_t} \times V_r$ | Ex. volume filtrado 500 mL, concentrado preparado com 5 mL de diluente e volume inoculado 0.1 mL: DL: 100 ufc/L (caso não ocorra crescimento ou confirmação de colónias no tratamento ácido o LD aumenta 10x, LD: 1000ufc/L) | ↗ Contagem fácil ↗ Baixo LD ↘ Baixa recuperação ↘ Processo demorado |
| Cultura após diluição da amostra (Método Diluído): | | |
| $N_{ufc} = \frac{n \times V_r}{V_{dil}} \times F$ | Ex. tratamento ácido de 1mL amostra diluída de 1/10 com 9 mL de ácido, e volume inoculado 0.1 mL: LD: 1000000 ufc/L | ↗ Contagem fácil ↗ Elevada recuperação ↘ Elevado LD ↘ Processo demorado |
| <p>Onde: N_{ufc} = número de Legionella em ufc/L n = número de colónias = $\frac{\text{colónias positivas}}{\text{colónias confirmadas}} \times \text{total de colónias contadas na placa}$ V_t = Volume total analisado, mL V_r = Volume de referência (normalmente 1000 mL) V_c = Volume final de concentrado, mL V = Volume inoculado na placa ou placas do mesmo meio de cultura, mL V_{dil} = Volume da diluição inoculado na placa ou placas do mesmo meio de cultura, mL F = Factor de Diluição</p> | | |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

| | | | | |
|---|---|--|------------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PT_{Mic} – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 10/11 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 02 |

ANEXO II

Matriz de Decisão

1º Passo: Tipo de amostra

Determinar a origem e as características da amostra (normalmente o cliente pode dar esta informação) e enquadrar numa das 4 opções:

-Amostra com baixa concentração de interferentes, por exemplo água de abastecimento:

- é expectável elevada concentração de Legionella – proceder ao método de cultura descrito em a);
- é expectável baixa concentração de Legionella – proceder ao método de cultura descrito em b);

-Amostra com elevada concentração de interferentes, pe água de torres de refrigeração, camaras de lavagem de ar, águas de processo – proceder ao método de cultura descrito em c);

-Amostra com extremamente elevada concentração de interferentes ou microrganismos que só sejam removidos por tratamento ácido e térmico combinado, por exemplo agua residual – proceder ao método de cultura descrito em d);


2º Passo: Determinar o Limite Detecção pretendido.

Determinar o Limite de Detecção pretendido e seleccionar um ou mais métodos adequados (ver Anexo I).

3º Passo: Escolher o Pré-tratamento, além do tratamento indicado em cada método de cultura pode ser aplicado outro opcional que se considere adequado.

4º Passo: Escolher o meio de cultura, além do meio de cultura indicado em cada método de cultura pode ser aplicado outro opcional que se considere adequado.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |


| | | | | |
|--|---|--|------------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Procedimentos Técnicos de Microbiologia PT_{Mic} – Detecção e Enumeração de Legionella | | Pág. 11/11 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 02 |

| | | 1º Passo: Matriz/Amostra | | | | | | | | |
|---|--------------------------|--|----------------|----------------|---|----------------|----------------|---|----------------|----------------|
| | | Amostra com baixa concentração de interferentes pe abastecimento Método de Cultura: a) e b) | | | Amostra com elevada concentração de interferentes pe água de torres de refrigeração, camaras de lavagem de ar, águas de processo Método de Cultura: c) | | | Amostra com extremamente elevada concentração de interferentes ^a pe agua residual Método de Cultura: d) | | |
| | | 4º Passo: Meio de Cultura | | | | | | | | |
| 2º Passo: LD | 3º Passo Pré- tratamento | BCYE | BCYE+AB | GVPC | BCYE | BCYE+AB | GVPC | BCYE | BCYE+AB | GVPC |
| Método Directo LD: Elevado | Sem tratamento | √ | ○ | √ | | ○ | √ | | | |
| | Trat térmico | ○ | ○ | ○ | | ○ | √ | | | |
| | Trat ácido | ○ | ○ | ○ | | ○ | √ | | | |
| | Térmico+ácido combinado | | | | | ○ | ○ | | ○ | √ |
| Método Filtração por Membrana (FM) LD: Baixo | Sem tratamento | √ | ○ | ○ | | | | | | |
| | Trat térmico | ○ | ○ | ○ | | ○ | ○ | | | |
| | Trat ácido | ○ | √ ^b | | | ○ | ○ | | | |
| Método Filtração por Membrana e Eluição (FME) LD: Baixo | Sem tratamento | √ | √ ^b | | | ○ | √ | | | |
| | Trat térmico | √ | √ ^b | | | ○ | √ | | | |
| | Trat ácido | √ | √ ^b | | | ○ | √ | | | |
| Método Diluído LD: Muito Elevado | Sem tratamento | ○ ^c | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^c | √ ^c | | | |
| | Trat térmico | ○ ^c | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^c | √ ^c | | | |
| | Trat ácido | ○ ^c | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^c | √ ^c | | | |
| | Térmico+ácido combinado | | | | | ○ ^c | ○ ^c | | ○ ^d | √ ^d |
| √ – Obrigatório; ○ – opcional; | | | | | | | | | | |
| a- Para este tipo de amostras é obrigatório proceder à cultura direta e com diluição; | | | | | c- Diluição 1:10 | | | | | |
| b- Escolher entre os meios BCYE+AB ou GVPC | | | | | d- Diluição 1:10 e 1:100 | | | | | |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CR | CL | 17-09-2018 |

C ■ Procedimentos Auxiliares de Microbiologia

C.1 PAm 19 - Colheita para *Legionella*

| | | | | |
|---|---|--|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | | Pág. 1/10 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 00 |

ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este procedimento destina-se a descrever a colheita de amostras de água, biofilme ou sedimentos para a análise microbiológica de *Legionella*.

DESCRIÇÃO

Cópia Não Controlada

O ponto de amostragem é indicado pelo Cliente ou seleccionado pelo Laboratório com o acordo do Cliente. A avaliação prévia do local de colheita pode ser dispensado nos casos em que o Cliente indica claramente qual o ponto de colheita pretendido e este permite a colheita com segurança. O tipo de colheita é seleccionado de acordo com os protocolos de acordo com o ponto de amostragem e tipo de amostra. A colheita é realizada de acordo com as boas práticas de uma colheita para análise microbiológica, de forma a evitar contaminar a amostra ou a envolvente, e a amostra é preservada e transportada para o laboratório.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Seleção do ponto de amostragem

A seleção dos pontos de amostragem depende do objectivo:

1.1 - Controlo e prevenção de rotina:


Na avaliação do risco do sistema de água e no plano de controlo a longo prazo, deve considerar-se os pontos mais afastados possível do doseamento do biocida ou da central de produção de calor e no retorno. Devem ser identificados os locais críticos, como pontos terminais que possam não ser utilizados, que apresentem problemas, ou que existem resultados positivos em colheitas anteriores. Preferencialmente efectuar as colheitas em duchas em vez de torneiras, por serem locais de maior exposição.

As colheitas devem incluir sempre os principais locais de risco:

- Sistemas de água quente sanitária (AQS), onde a temperatura de armazenamento seja inferior a 60° C (chuveiros, depósitos); na rede predial de água quente sanitária recirculante, deverão ser sempre considerados pontos de colheita que incluam o dreno de fundo de depósitos de aquecimento, o percurso de retorno nomeadamente o dreno de colectores de retorno, e pontos de consumo quer rotativamente quer em função de risco particular no qual podem relevar a menor frequência de utilização e a maior distância ao depósito de aquecimento.

- Torres de arrefecimento: na entrada do fornecimento de água, (para pesquisa e determinação de outros parâmetros); no interior do tanque (no seu em ponto mais distante da entrada da água de compensação), no dreno de fundo do tanque ou no tubo de descarga; no circuito próprio da torre (num ponto ligado à canalização da água de retorno ao topo da torre); no bloco evaporativo (biofilme); no tanque (biofilme, depósitos ou sedimentos) e em qualquer reservatório de água existente no sistema.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | | |
|--|---|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA.M19 – Colheita para análise de Legionella | | Pág. 2/10 | |
| | Ed. 01 | Rev. 00 | | |

- Tanques dos humidificadores por pulverização (lavadores de ar) em unidades de tratamento de ar;

- Equipamentos de climatização do ar em que haja produção de aerossóis: água de condensação com ou sem acumulação, nos tabuleiros de condensados; biofilme ou depósito, nos tabuleiros de condensados ou nos seus drenos; água em circuito fechado, arrefecida (gelada), para climatização de ar em ventiloconvectores, unidades de tratamento de ar e unidades de tratamento de ar novo; água em circuito fechado, moderadamente aquecida, para climatização de ar em ventiloconvectores, unidades de tratamento de ar e unidades de tratamento de ar novo.

Outros locais mais associados ao desenvolvimento de *Legionella* são:

- Redes prediais de água quente e de água fria; Os pontos de colheita de amostras serão os definidos tendo como base o estudo do diagrama esquemático dos serviços de água e a observação das redes. Nos sistemas de água fria: Tanque de armazenamento. Saída mais afastada do tanque de armazenamento. Outras saídas em zonas consideradas como representando risco particular, por ex. hospitais. Sistemas de água quente: Saída da caldeira ou torneira mais próxima. Água de retorno na torneira mais próxima. Base da caldeira onde existam válvulas de drenagem. Saída mais afastada da caldeira. Outros pontos em áreas que apresentem um risco particular, por ex. hospitais.

- Sistemas de água climatizada de uso recreativo ou terapêutico, como piscinas climatizadas ou jacuzzis, instalações termas, e equipamentos usados na terapia respiratória (nebulizadores ou humidificadores de sistema de ventilação assistida).

1.2 – Após limpeza e desinfecção ou para comprovar a eficácia do tratamento:


Incluir, se possível, os pontos onde anteriormente tenham existido resultados positivos para *Legionella*, ou que tenham estado relacionados com casos para além dos pontos habituais. As amostras devem ser colhidas 15 a 30 dias após a realização do tratamento de limpeza e desinfecção, cumprindo com os tempos referidos na legislação em vigor.

1.3 – Associação a casos ou surtos:

Avaliar os elementos de risco relacionados, de acordo com a autoridade de saúde, legislação ou investigação epidemiológica e/ou ambiental.

Em caso de surto, a informação epidemiológica disponível no momento determina os locais onde realizar as colheitas. Dependendo da natureza e dimensão do surto, a investigação pode centrar-se e envolver um único local ou vários numa determinada região. Devem ser identificadas todas as fontes potenciais de contaminação e efetuada a colheita de amostras nesses locais. Durante um processo de investigação de um surto, todo o pessoal que realize colheitas estará potencialmente exposto a aerossóis infecciosos. Devem ser adotadas medidas de prevenção durante os procedimentos de colheita de forma a minimizar a produção e exposição a aerossóis. Todas as pessoas que apresentem maior risco de desenvolver infeção não devem ser envolvidas em colheitas associadas a investigação de surtos. Em algumas situações poderá existir a necessidade suplementar de utilização de proteção respiratória com isolamento total.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | | |
|---|---|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | | Pág. 3/10 | |
| | Ed. 01 | Rev. 00 | | |

2. Segurança

As amostras ambientais destinadas à análise de *Legionella* devem ser colhidas por técnicos com conhecimento da ecologia da bactéria e avaliação geral de risco. As pessoas que colhem amostras ambientais necessitam de treino de forma a garantir que seleccionem as amostras que contêm o maior número possível de bactérias e que estão cientes do risco para si e para os outros em locais potencialmente positivos. Com base numa avaliação de risco, em algumas circunstâncias, pode ser necessária a utilização de equipamento de protecção respiratória (máscara descartável com filtro FFP3).

As tarefas devem ser planeadas para que os riscos sejam mínimos para o Técnico. Pode ser necessário nas Torres de arrefecimento desligar as ventoinhas e deixar assentar os aerossóis antes da colheita.

Indivíduos que possam ser particularmente propensos a um maior risco de infecção por *Legionella* devido a condições subjacentes a imunossupressão não devem ser envolvidos nestas operações de colheita.

3. Avaliação prévia do local de colheita

Antes de efectuar qualquer colheita é essencial uma avaliação prévia do local. Deve considerar-se a origem e qualidade da água, e identificada a localização de todos os sistemas que utilizam essa água.


Determinar os sistemas que contêm água a temperaturas susceptíveis de suportar o crescimento de bactéria *Legionella* (20°C a 50°C).

Adicionalmente, devem ser considerados locais onde seja expectável um crescimento elevado de *Legionella*, onde potencialmente a água contaminada possa produzir aerossóis ou onde estes possam ser libertados para o meio ambiente.

Um esquema do sistema de água deve indicar os locais:

- Abastecimento de água, quer seja da rede pública ou fonte privada;
- Tanques de armazenamento, vasos de expansão ou de pressão, filtros e bombas;
- Filtros de amaciamento de água, outras instalações de armazenagem, de tratamento ou de aquecimento de água;
- Tipo e natureza dos materiais e acessórios, por exemplo, torneiras, chuveiros, cisternas, válvulas, radiadores e toalheiros de casa de banho ligados ao abastecimento doméstico de água e a presença de metais e plásticos;
- Torres de arrefecimento e condensadores evaporativos ou circuitos de aquecimento arrefecimento;
- Sistemas de ar condicionado ou humidificadores situados dentro do edifício que são fornecidos e armazenam água e que podem produzir aerossóis;
- Outro equipamento que contém água e que pode apresentar um risco potencial, tais como piscinas de hidromassagem, humidificadores de exibição, máquinas e ferramentas, fontes ornamentais, etc;
- Equipamento que é utilizado com pouca frequência ou normalmente não é motivo de preocupação, mas apresenta apenas um risco quando o sistema é submetido a manutenção ou reparação;
- Presença de zonas mortas.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | | |
|---|---|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | | Pág. 4/10 | |
| | Ed. 01 | Rev. 00 | | |

4. Tipos de amostras

Dois tipos de amostras primárias devem ser colhidas para *Legionella* - amostras de água e zaragatoas de biofilme. As amostras de água capturam as formas planctónicas de *Legionella* e biofilme que tenha sido libertado. As zaragatoas capturam as formas sésseis de *Legionella* que estão associadas com biofilmes.

As zaragatoas devem ser feitas antes das amostras de água, caso seja efectuada colheita de ambos os tipos de amostras no mesmo local (exceto no caso mencionado no Protocolo B adiante descrito). As zaragatoas devem ser mantidas humedecidas com diluente (água estéril ou soluto de Ringer ou solução de Page). Várias amostras podem ser colhidas a partir do mesmo local.

5. Recipientes

O volume da amostra a ser colhida depende da natureza do sistema de água e do objetivo da avaliação. Geralmente é colhido 1 L de amostra de água, exceto se destinada a um inquérito epidemiológico em que devem ser colhidos 3 L de amostra.

As amostras de água devem ser colhidas em recipientes estéreis, de vidro, polietileno ou outro material similar, apropriados para uso em contacto com água potável. No caso de acesso difícil a pontos de colheita, é permitida a utilização de recipientes de vidro com revestimento plástico exterior.

Recipientes estéreis de menor dimensão podem ser utilizados para colheita de lama, depósitos, sedimentos ou biofilme, incluindo zaragatoas.

6. Precauções na colheita

A medição de temperatura deve ser efectuada de acordo com o PT respectivo, com termómetro calibrado, quando o sistema se encontra a funcionar normalmente, devendo o termómetro ser colocado diretamente na água corrente.

A presença de qualquer biocida deve ser registada e segue-se o indicado no ponto 7.

A medição de Cloro residual deve ser efectuada de acordo com o PT respectivo.


A colheita deverá ser efectuada de acordo com as boas práticas associadas à colheita de amostras para análise microbiológica, de forma a garantir a integridade da amostra e para eliminar qualquer possibilidade de ocorrência de contaminação cruzada entre diferentes locais e amostras. Deverá sempre ser deixando espaço de ar no recipiente, uma vez que se trata de bactérias aeróbias, e também para facilitar a homogeneização da amostra com o agente neutralizante.

7. Colheitas na presença de biocidas

Se a água da amostra tem, ou se suspeita que tenha, um biocida oxidante, deve ser adicionado no recipiente de recolha um agente neutralizante apropriado em excesso, antes ou na altura da colheita, e ser bem homogeneizado.

Cloro, bromo e dióxido de cloro são inativados pela adição de tiosulfato de sódio. Na maior parte dos casos, 18 mg de tiosulfato de sódio pentahidratado neutraliza 1 000 mL de água contendo até 5 mg de cloro.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | | |
|--|---|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | | Pág. 5/10 | |
| | Ed. 01 | Rev. 00 | | |

No caso de a concentração de cloro residual ser superior a 5 mg/L, a amostra deve ser colhida para o frasco estéril, homogeneizada com o tiosulfato existente nesse frasco e passada de imediato para outro frasco estéril com tiosulfato. Esse procedimento repete-se até ser necessário, considerando que cada frasco de 1 L com tiosulfato pode neutralizar 5 mg de cloro. Este procedimento deverá ficar registado.

O Cliente deverá informar se estiver a ser usado qualquer outro biocida. Para neutralizar outros desinfetantes é necessário seguir as indicações do fabricante, registadas na autorização do produto e ficha técnica (Consultar DGS, por exemplo). Para biocidas que contenham prata ou cobre pode ser utilizado o agente quelante EDTA numa concentração de 10 mg/L. Nesta concentração o EDTA pode ser menos eficaz ou até ineficaz em água dura. No caso de impossibilidade em efectuar a neutralização, esta informação deve constar no registo da colheita.

Deverá ser garantido que o agente neutralizante não se perde quando a colheita é feita por imersão do recipiente. Alternativamente poderá ser utilizado um recipiente de colheita estéril e posteriormente proceder-se à transferência da amostra para o recipiente que contém o neutralizante. Após a colheita a amostra deverá ser agitada de forma a garantir que o agente neutralizante fica bem misturado com a água.

PROCEDIMENTO


Protocolo A - colheita de rotina, em sistemas de água quente e fria, para consumo humano

A metodologia deve ser igual à descrita para as amostras de consumo humano colhidas em torneiras com o objetivo 3 da Norma ISO 19458, água conforme é consumida.

1. Sem desmontar acessórios da torneira e sem desinfetar a torneira e antes de deixar correr, abrir o frasco tendo o cuidado de não tocar no gargalo e no interior da tampa;
2. Manter a tampa virada para baixo sem a pousar (se necessário, pousar a tampa em local limpo virada para cima);
3. Colher cerca de 1 L de água, mantendo o frasco inclinado e sem contacto com a torneira. No caso em que o ponto de colheita é um chuveiro, para minimizar a formação de aerossóis, e garantir que é colhida a maior quantidade possível de água introduzir a cabeça do chuveiro, sem retirar o crivo, dentro de um saco de plástico estéril (poderá ser utilizado um saco de plástico novo), ao qual foi previamente cortado um dos cantos. Antes de efectuar o corte, passar as lâminas da tesoura por algodão embebido em álcool a 70%. Com o canto cortado do saco no bocal do frasco de colheita, colher a amostra;
4. Fechar o recipiente;
5. Efectuar a determinação do desinfetante residual e a temperatura da água.

Nota 1 -Se o local de colheita for misto (água quente e fria) iniciar a colheita pela água quente, no passo 3 colher a água até ao meio do frasco com o fluxo inicial, deixar a água correr até ficar tépida e completar o litro de amostra com essa água. Efectuar de seguida a colheita de água fria.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | | |
|--|---|--|-----------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 6/10 | |
| | PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | | Ed. 01 | Rev. 00 |

Protocolo B - Colheita de água e biofilme - em sistemas sujeitos a medidas de controlo ou intervenção
Em locais específicos (ex. torneiras, mangueiras e chuveiros), adicionalmente pode ser colhida uma amostra de biofilme.


1. Abrir o frasco tendo o cuidado de não tocar no gargalo e no interior da tampa;
2. Manter a tampa virada para baixo sem a pousar (se necessário, pousar a tampa em local limpo virada para cima);
3. Colher a água até ao meio do frasco com o fluxo inicial.
4. Realizar a colheita de biofilme com zaragatoa estéril no interior da torneira ou chuveiro;
5. Depois da zaragatoa efetuada inserir no frasco sem introduzir a extremidade que esteve em contacto com as mãos.
6. Perfezer o volume de amostra, enchendo o resto do frasco com a amostra de água, o qual receberá o raspado trazido pela água;
7. Fechar o frasco;
8. Efetuar a determinação do desinfetante residual e a temperatura da água.

Protocolo C – Colheitas de água climatizada de uso recreativo e tanques e cisternas (ex. Piscinas, Jacuzzi, banhos turcos, saunas e banheiras de hidromassagem, Tratamentos com jactos a pressão)

C.1 – Sem frasco de mergulho

1. Desinfetar as mãos e antebraço com álcool etílico a 70% ou utilizar luvas esterilizadas e de cano alto;
2. As amostras devem ser colhidas junto do rebordo interno, no ponto mais afastado da entrada de água na piscina (o local mais afastado possível da válvula de flutuação onde a água entra no sistema). Selecionar um local do tanque numa zona afastada da entrada de água, de preferência a partir do fundo do tanque e se possível incluindo os detritos nele existentes.
3. Abrir o recipiente junto à água tendo o cuidado de não tocar no gargalo ou no interior da tampa;
4. Manter a tampa virada para baixo sem a pousar (se necessário, pousar a tampa em local limpo virada para cima);
5. Mergulhar o recipiente com uma inclinação de cerca de 45° (boca virada para cima) a cerca de 30 cm, endireitá-lo e deixar entrar a água até encher. Para colheitas à superfície encher o recipiente fazendo movimentos circulares lentos, mantendo-o virado para a frente. Não enxaguar e não encher completamente;
6. Retirar o recipiente da água e fechá-lo de imediato ou tapar ainda debaixo de água;
7. Efetuar a determinação do desinfetante residual e a temperatura da água.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | | |
|---|---|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | | Pág. 7/10 | |
| | Ed. 01 | Rev. 00 | | |

C.2 – Com frasco de mergulho

1. Prender as cordas aos dispositivos da armação do frasco, mantendo-o dentro da caixa de protecção.
2. Retirar, caso exista, a tira de papel que impede a tampa de colar ao gargalo, sem tocar neste;
3. Submergir o frasco, até cerca de 30 cm ou o mais abaixo possível, até ao limite das cordas mas sem tocar no fundo, no caso de depósitos sem torneira de azenha;
4. Accionar a corda de abertura do frasco;
5. Depois de cheio, fechar o frasco e retirá-lo da água;
6. Efetuar a determinação do desinfetante residual e a temperatura da água.

Protocolo D – Colheita em torres de arrefecimento

A bactéria *Legionella* desenvolve-se na parte mais quente do sistema, usualmente localizada na zona do refrigerador ou outro equipamento similar utilizado para arrefecer a água. Idealmente deverá ser criado um ponto de colheita na água de retorno à torre de arrefecimento, localizado próximo da fonte de calor. Caso este local não esteja disponível, deverá ser colhida uma amostra da água do tanque, num local o mais afastado possível da entrada de água nova. Alternativamente, pode ser utilizada a válvula de descarga. Se ocorrer uma acumulação elevada de sedimentos e aconselhável que estes sejam também recolhidos.

As amostras devem ser colhidas num momento adequado relativamente à adição de biocidas, de forma a garantir que a recuperação da bactéria seja maximizada, tendo também em consideração que os valores mais elevados de *Legionella* ocorrem na água de circulação, imediatamente após as bombas terem sido ligadas.

D.1 – Local com torneira


1. Abrir o recipiente tendo o cuidado de não tocar no gargalo e no interior da tampa;
2. Manter a tampa virada para baixo sem a pousar (se necessário, pousar a tampa em local limpo virada para cima);
3. Sem fazer purga colher cerca de 1 L e fechar o frasco
4. Efetuar a determinação do desinfetante residual e a temperatura da água.

D.2 – Depósitos de pouca profundidade (por exemplo, um tanque de uma torre de Refrigeração)

1. Destapar o frasco na proximidade da água, conservando a tampa virada para baixo e sem a pousar. (se necessário, pousar a tampa em local limpo virada para cima);
2. Mergulhar o frasco virado para baixo, em posição próxima da horizontal (para evitar a perda do tiosulfato), inclinando-o para cima para o encher. Recolher possíveis restos de sujidade e incrustações;
3. Retirar o frasco e fechá-lo;
4. Efetuar a determinação do desinfetante residual e a temperatura da água.

Nota 2: Nos tanques das torres de Refrigeração, as amostras poderão ser colhidas aspirando a água com o auxílio de uma seringa esterilizada.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | |
|---|---|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | Pág. 8/10 | |
| | | Ed. 01 | Rev. 00 |

Protocolo E - Colheita de água de condensação, de biofilme ou de sedimentos com zaragatoa

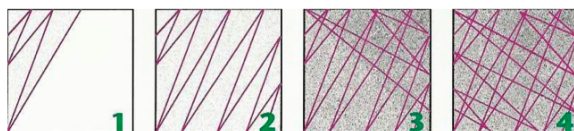
As amostras de biofilme podem ser colhidas com zaragatoas estéreis ou outros dispositivos que contenham uma extremidade absorvente (ex. esponjas). Se a superfície a examinar não se encontrar húmida, não se deverá efetuar a colheita uma vez que a bactéria é aquática e não sobrevive sem água.

E.1 – Locais sem área demarcada

Nas colheitas em cisternas ou tanques, o biofilme deverá ser colhido a partir da superfície interfacial entre a água e a atmosfera, ou após abaixamento do nível da água na zona logo abaixo da linha de água, uma vez que o desenvolvimento máximo do biofilme normalmente ocorre nesta faixa estreita.

O biofilme também pode ser colhido na superfície interior de tubagens e chuveiros recorrendo a uma zaragatoa. Em alguns casos poderá surgir a necessidade de desmontar partes do sistema de forma a permitir a realização da colheita.

1. Retirar a zaragatoa da manga ou do tubo, tocando-lhe só na extremidade da pega;
2. Humedecer previamente a zaragatoa com diluente (água estéril ou solução de Page ou de Ringer); mas remover o excesso de líquido, pressionando a zaragatoa contra a parede interna do tubo da zaragatoa.
3. Esfregar as superfícies pretendidas com a zaragatoa. A superfície a amostrar deverá ser raspada uniformemente fazendo rodar a zaragatoa para que seja utilizada toda a superfície da mesma, como mostra a figura seguinte.




4. De seguida, a zaragatoa deverá ser colocada no tubo de transporte com flossulfato sódio e com 10 ml de diluente. Agitar.

E.2 – colheita com área demarcada (ex. Pavimentos de acesso a piscinas)

De forma a facilitar a quantificação da *Legionella*, deverá ser utilizado um modelo de delimitação de superfície estéril para que seja colhida amostra numa área conhecida.

1. Retirar a zaragatoa da manga ou do tubo, tocando-lhe só na extremidade da pega;
2. Humedecer previamente a zaragatoa com diluente (água estéril ou solução de Page ou de Ringer); mas remover o excesso de líquido, pressionando a zaragatoa contra a parede do tubo;
3. Colocar a ponta da zaragatoa na superfície a analisar com uma área estimada (por ex de 100 cm²), utilizando se possível uma moldura estéril com área definida.
4. Executam-se movimentos paralelos e com ligeira rotação na área pretendida, seguindo-se movimentos perpendiculares aos iniciais, como mostrado na figura em E.1;
5. Coloca-se a zaragatoa no tubo de transporte com diluente e agita-se.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | | |
|--|---|---------|-----------|--|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | | Pág. 9/10 | |
| | Ed. 01 | Rev. 00 | | |

Transporte e armazenamento de amostras

Todas as amostras devem ser transportadas para o laboratório ao abrigo da luz, isoladas e protegidas contra temperaturas extremas. Amostras de diferentes temperaturas, devem ser transportadas de forma independente. A análise deve começar o mais rapidamente possível, de preferência no mesmo dia. Se a análise for adiada, as amostras devem ser armazenadas para que os procedimentos de concentração e de incubação sejam iniciados dentro de 48 horas após a colheita, de acordo com a norma ISO 11731. As amostras devem ser transportadas e armazenadas a menos de 18 °C, mas não inferior a 6 °C. O armazenamento da amostra num frigorífico a temperaturas abaixo de 6 °C pode reduzir a subsequente recuperação de bactérias *Legionella*, uma vez que as bactérias podem ser induzidas em um estado não cultivável. Embora a *Legionella* não se multiplique de forma significativa durante este período, o organismo pode ser adversamente afetado pela presença de biocidas remanescentes na amostra. Se os biocidas são suscetíveis de estar presentes na amostra e não poderem ser neutralizados antes do armazenamento, esta informação deverá ser registada, e os tempos de transporte e de armazenamento mantidos num mínimo.

Em circunstâncias excecionais é recomendado (ISO 11731:1998) que o intervalo entre a colheita da amostra e a sua concentração seja de 2 dias, e não exceda os 5 dias. O tempo máximo entre a colheita da amostra e a cultura do concentrado, biofilme ou sedimento é de 14 dias, se armazenada ao abrigo da luz e a (6 ± 2) °C.

Em inquéritos epidemiológicos a amostra deverá ser guardada até 12 meses.


Controlo de qualidade

A grande variedade de metodologias de colheita, definidas em função da tipologia e condicionantes do sistema a caracterizar, obriga a que a metodologia de colheita de duplicados de amostragem seja definida de modo a que as várias variáveis sejam contempladas nas duas amostras.

Apresenta-se como exemplo de Duplicado de Colheita de amostra de água em torneiras e em chuveiros:

1. Levar para campo 3 frascos de 1 L estéreis e com tiosulfato (A, B e C). O Frasco A é um frasco de apoio que permite reunir no Frasco B e no Frasco C dois duplicados de colheita.
2. Não desmontar acessórios da torneira/chuveiro, caso existam;
3. Não deixar correr a água;
4. Não flamejar nem desinfetar a torneira/chuveiro;
5. Destapar o frasco A (1L) na proximidade da torneira, conservando a tampa virada para baixo;
6. Encher o frasco, sempre que possível numa torneira/chuveiro com água quente, com o fluxo inicial de água, mantendo-o inclinado e sem contacto com a torneira/chuveiro. O frasco deve ser cheio até 2-3 centímetros do topo. Fechar o frasco;
7. Homogeneizar a amostra contida no frasco A e dividir esta amostra pelos frascos B e C, mantendo sempre as boas práticas para evitar contaminações acidentais.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

| | | | |
|--|---|------------|---------|
|  SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M19 – Colheita para análise de Legionella | Pág. 10/10 | |
| | | Ed. 01 | Rev. 00 |

8. Etapa facultativa e a discutir com o responsável da instalação - Com a parte de dentro do invólucro esterilizado que protegia o frasco A, raspar a superfície da torneira/chuveiro; Abrir o fluxo da torneira/chuveiro e encher o frasco A até 2-3 centímetros do topo. Se se tratar de um chuveiro, colocar a manga estéril. Fechar o frasco, agitar e repartir esta nova amostra pelos frascos B e C. As tampas não devem tocar em qualquer parte.

9. Em alternativa do ponto 8, abrir a torneira e aguardar que a água fique tépida e, em seguida, encher o frasco A até 2-3 centímetros do topo. Fechar o frasco, agitar e repartir esta nova amostra pelos frascos B e C. As tampas não devem tocar em qualquer parte.

10. Colocar os frascos B e C na mala de transporte, ao abrigo da luz.

ACÇÕES PREVENTIVAS E CORRECTIVAS

Sempre que o procedimento ou parte dele não seja integralmente cumprido, deverá ser accionado o procedimento definido para o trabalho não conforme, bem como accionadas acções correctivas caso sejam necessárias.

IMPRESSOS ASSOCIADOS

Is021 – Relatório de colheita ou registo informático

DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

NOTA TÉCNICA NT-SCE-02E, Metodologia para auditorias periódicas de Qualidade do Ar Interior em edifícios de serviços existentes no âmbito do Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios – Decreto-Lei n.º 79/2006, de 4 Abril

Prevenção e controlo de *Legionella* nos sistemas de água, Comissão sectorial para a água (SC/04), IPQ, 2014
 Guia Relacre 28, Amostragem de águas, 2017

REFERÊNCIAS NORMATIVAS

ISO 11731 – Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*

ISO 19458 - Water quality – Sampling for microbiological analysis

HISTORIAL DE EDIÇÕES / REVISÕES

| Edição/Revisão | Alterações Introduzidas | Entrada em vigor |
|----------------|-------------------------|------------------|
| 01/00 | Documento novo | 05-09-2018 |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 05-09-2018 |

C.2

IM 032 – Legionella – Registo de Resultados


| | | | | |
|---|---|--|--|----------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Im032 – Legionella – Registo de Resultados | | Data de entrada em vigor 01-06-2018 | |
| | | | Rev. 01 | Pág. 1/1 |

| Amostra | | | | | | | | | | Data /Rubrica | | | | | |
|--|--|--|--|-------------------|--|------------------|--|--------------|---|---------------|--|--------------|--|----------|--|
| <input type="checkbox"/> Amostra direta <input type="checkbox"/> Amostra filtrada, volume filtrado: _____ <input type="checkbox"/> Volume de concentrado: _____ <input type="checkbox"/> Amostra diluída | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tratamento | | <input type="checkbox"/> Sem tratamento <input type="checkbox"/> Térmico <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Combinado | | | Volume inóculo: _____ | | | | | | | | | | |
| Meio de cultura | | <input type="checkbox"/> BCYE <input type="checkbox"/> BCYE+AB <input type="checkbox"/> GVPC | | | <input type="checkbox"/> BCYE <input type="checkbox"/> BCYE+AB <input type="checkbox"/> GVPC | | | + | - | ∞ | | | | | |
| Contagem | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE-cis | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sorologia | | | | | | | | | | | | | | | |
| Contagem | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE-cis | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sorologia | | | | | | | | | | | | | | | |
| Contagem | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE-cis | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sorologia | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resultado | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tratamento | | <input type="checkbox"/> Sem tratamento <input type="checkbox"/> Térmico <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Combinado | | | Volume inóculo: _____ | | | | | | | | | | |
| Meio de cultura | | <input type="checkbox"/> BCYE <input type="checkbox"/> BCYE+AB <input type="checkbox"/> GVPC | | | <input type="checkbox"/> BCYE <input type="checkbox"/> BCYE+AB <input type="checkbox"/> GVPC | | | + | - | ∞ | | | | | |
| Contagem | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE-cis | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sorologia | | | | | | | | | | | | | | | |
| Contagem | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE-cis | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sorologia | | | | | | | | | | | | | | | |
| Contagem | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE-cis | | | | | | | | | | | | | | | |
| BCYE | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sorologia | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resultado | | | | | | | | | | | | | | | |
| H ₂ O: | | Page's: | | GVPC: | | BCYE: | | Micropipeta: | | Pontas: | | Tamp. Ácido: | | Copos: | |
| Membranas (PES): | | Membranas (NC): | | Esferas de vidro: | | Frascos: Tampas: | | T. Falcon: | | T. Eppendorf: | | Semeadores: | | Pipetas: | |

Observações:

C.3

PAm 11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia

| | | | | |
|--|---|--|----------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 1/7 | |
| | <u>PAm11</u> – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia | | Ed. 02 | Rev. 10 |

ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este procedimento destina-se a descrever o controlo de qualidade interno a ser efectuado na área microbiológica, no controlo do método, e faz a síntese do restante controlo de qualidade, sendo da responsabilidade de cada um dos analistas o seu cumprimento.

DESCRIÇÃO

O controlo de qualidade encontra-se dividido consoante se trata de um método qualitativo, por exemplo a detecção, um método de Número Mais Provável (NMP), como a pesquisa e quantificação de *E. coli* por substrato enzimático Colilert, e um método quantitativo, como a pesquisa e quantificação de enterococos por membrana filtrante (UFC) ou a pesquisa e quantificação de colónias viáveis a 22°C por incorporação (UFC).

O controlo da qualidade interno baseia-se essencialmente em ensaios em branco, análise de duplicados, análise de materiais de referência (lentículas e pastilhas) de acordo com o estabelecido em diante.

Paralelamente é também efectuado o controlo dos meios de cultura utilizados e dos meios de confirmação (PAm09), o controlo da água de diluição (PAm07) e o controlo ambiental (PAm04).

Na generalidade e caso não esteja definido no próprio método de análise ou em algum procedimento complementar, estabeleceram-se os seguintes critérios de aceitação/rejeição:

- Brancos – 0 u.f.c.
- Duplicados
gama baixa – valores médios entre 0 a 10 UFC – de acordo com a tabela de Lightfoot
gama alta – valores médios >10 – de acordo com o critério de precisão

O laboratório recorre igualmente ao controlo de exactidão dos seus resultados através da participação em ensaios interlaboratoriais. Estes ensaios são esquemas de garantia externa de qualidade – EQA (External Quality Assurance), que não têm como finalidade a comparação de métodos, mas sim a comparação do desempenho de laboratórios participantes com base nos relatórios finais emitidos pelos mesmos. Aceita-se a avaliação de desempenho feita pelo fornecedor, salvo justificação apropriada.

PROCEDIMENTO

Método qualitativo


ENSAIO BRANCO

Usa água esterilizada e acompanha a análise e são feitas passagens para os meios de crescimento seguintes.

CONTROLO POSITIVO

Acompanha a análise com estirpe conhecida (ex: culti-loop) do microrganismo a pesquisar.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 02-01-2018 |

| | | | |
|--|---|----------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | <p>Procedimentos Auxiliares de Microbiologia</p> <p>PAm11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia</p> | Pág. 2/7 | |
| | | Ed. 02 | Rev. 10 |

CONTROLO NEGATIVO

Acompanha a análise com estirpe conhecida (ex: culti-loop) de um microrganismo com crescimento diferente ou sem crescimento.

QUADRO RESUMO DO CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO EFECTUADO E PERIODICIDADE NO CONTROLO DO MÉTODO

| Controlo Efectuado | Periodicidade |
|-------------------------------|---------------------------|
| Branco (ver PAm09) | Por série de análise |
| Controlo positivo (ver PAm09) | Por serie de confirmações |
| Controlo negativo (ver PAm09) | Por serie de confirmações |

Método NMP**BRANCO**

Usa um volume de referência de água desmineralizada esterilizada e segue o respectivo procedimento técnico.

CONTROLO POSITIVO

Acompanha a análise com estirpe conhecida (ex: culti-loop) do microrganismo a pesquisar.

A análise com Colliert (bactérias coliformes, Coliformes termotolerantes e E. coli) faz o controlo positivo com E. coli e outro coliforme, combinados.

DUPLICADOS

Utiliza-se uma amostra que apresente crescimento previsível contaminada artificialmente ou não, fazendo pelo menos duas tomas dos volumes que se achem apropriados. Pode ser também efetuado com material de referência.

ENSAIO EM PARALELO

Uma amostra é analisada nas mesmas condições por Analistas qualificadas. Preferencialmente será realizado com uma água natural contaminada, embora também possa ser uma amostra contaminada artificialmente ou material de referência.


MATERIAL DE REFERENCIA

Analisa-se material de referência (lentícula ou comprimido).

QUADRO RESUMO DO CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO EFECTUADO E PERIODICIDADE NO CONTROLO DO MÉTODO

| Controlo Efectuado | Periodicidade |
|-------------------------------|---|
| Branco | Quinzenal com a amostra |
| Controlo positivo (ver PAm09) | Per-série |
| Controlo negativo (ver PAm09) | Quinzenal com a amostra Por lote do |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 02-01-2018 |

| | | | |
|---|--|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PAm11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia | Pág. 3/7 | |
| | | Ed. 02 | Rev. 10 |

| | |
|------------------------|-------------------------|
| Ensaio em paralelo | meio |
| Ensaio quantitativo MR | Por lote do meio Mensal |
| Duplicado | Trimestral |
| | Quinzenal |
| | Mensal |

Cópia Não Controlada

Método quantitativo (UFC)

BRANCO

Para todos os parâmetros que seguem a técnica de filtração por membrana filtra-se solução de diluição seguindo-se o respectivo procedimento técnico.

No caso dos parâmetros que seguem a técnica de incorporação incorpora-se o volume indicado de água desmineralizada esterilizada ou solução de diluição seguindo-se o respetivo procedimento técnico.

CONTROLO POSITIVO E NEGATIVO

Todas as confirmações são acompanhadas pela análise em paralelo de estirpe conhecida (ex: culti-loop) do microrganismo a pesquisar. Quando a reacção do meio de confirmação ao organismo a pesquisar é negativa, a análise é também acompanhada por outro organismo cuja reacção ao meio seja positiva.

DUPLICADOS

Utiliza-se uma amostra que apresente crescimento previsível contaminada artificialmente ou não, fazendo pelo menos duas tomas dos volumes que se achem apropriados. Para efeitos de confirmação considera-se apenas a amostra cujo número de colónias está compreendido entre 0 e 100. Procede-se a confirmação das colónias de cada tipo de acordo com o respetivo procedimento técnico. Pode também ser efectuado com material de referência, mas nesse caso não se procede a confirmação.

ENSAIO EM PARALELO

Utiliza-se uma amostra contaminada, que é analisada por duas Analistas qualificadas nas mesmas condições. Preferencialmente será realizado com uma água natural contaminada, embora também possa ser uma amostra contaminada artificialmente ou material de referência.

MATERIAIS DE REFERÊNCIA


O laboratório adquire culturas de referência – lentículas ou pastilhas – com o objectivo de estabelecer os critérios de precisão do laboratório através da elaboração de cartas-guia, por parâmetro, método e lote.

O material de referência é preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Antes de colocar em rotina um novo lote de MR, são feitas 20 determinações do material em causa, por diferentes Analistas, para estabelecer os limites da carta. Os limites são validados até duas semanas após a 20ª determinação.

Este material será assim utilizado até que acabe, podendo ser utilizado fora do prazo de validade desde que evidencie estabilidade. No caso de apresentar tendência os seus limites podem ser recalculados. O material será rejeitado no caso de não apresentar estabilidade ou crescimento muito reduzido.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 02-01-2018 |

| | | | | |
|---|--|--|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 4/7 | |
| | PAm11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia | | Ed. 02 | Rev. 10 |

QUADRO RESUMO DO CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO EFECTUADO E PERIODICIDADE NO CONTROLO DO MÉTODO


| Controlo Efectuado | Periodicidade |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| Branco (ver PAm07) | Por série |
| Duplicado | Semanal (mensal com água natural) |
| Controlo positivo (ver PAm09) | Por serie (confirmações) ou quinzenal |
| Controlo negativo (ver PAm09) | Por serie (confirmações +) ou mensal |
| Ensaio em paralelo | Trimestral (Anual para lamas) |
| Análise MR | Quinzenal |

QUADRO RESUMO DO CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO COMPLEMENTAR E PERIODICIDADE

| Controlo Efectuado | Periodicidade |
|--|-------------------------|
| Verificação temperatura estufas (ver PAm05) | Diário ou mensal |
| Controlo ambiental Ar (ver PAm04) | Mensal |
| Controlo ambiental Superfície (ver PAm04) | Mensal |
| Controlo água tipo II colónias 22 e 37 (ver PAm07) | Semanal |
| Controlo água tipo II colónias caract. (ver PAm07) | Mensal |
| Controlo de membranas filtrantes (ver PAm) | Por lote |
| Meios de cultura (ver PAm09) | Diário ou semanal |
| Produtividade de meios específicos (ver PAm09) | Mensal |
| Verificação temperaturas equipamentos | Diário |
| Verificação intermédia equipamentos | Trimestral ou semestral |

Em síntese:

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 02-01-2018 |

| | | | | |
|---|---|--|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 5/7 | |
| | PA_M11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia | | Ed. 02 | Rev. 10 |

| DIARIAMENTE | SEMANALMENTE |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Brancos (água esterilizada) • Verificação da temperatura das estufas, banhos e frigoríficos • Positivo, negativo e esterilidade dos meios de confirmação e soluções de diluição | <ul style="list-style-type: none"> • Duplicado para UFC • Esterilidade de soluções em uso (ex peptona, ATP) • Determinação de colónias a 22°C e a 37°C na água tipo II |
| QUINZENALMENTE | MENSALMENTE |
| <ul style="list-style-type: none"> • Análise de material de referência • Controlo positivo para NMP com a amostra | <ul style="list-style-type: none"> • Determinação das bactérias características na água tipo II • Controlo negativo • Duplicados NMP e de amostra natural UFC • Avaliação da temperatura nas estufas (sondas) • Controlo ambiental (ar e superfície) nas bancadas e nas CFL • Produtividade de meios de cultura específicos |
| TRIMESTRALMENTE | SEMESTRALMENTE OU POR LOTE DE FABRICANTE |
| <ul style="list-style-type: none"> • Ensaio em paralelo (anual para lamias) • Verificação de micropipetas | <ul style="list-style-type: none"> • Verificação de banhos • Controlo de membranas filtrantes • Análise de material de referência (20 determinações) |

ACÇÕES PREVENTIVAS E CORRECTIVAS

Sempre que o procedimento ou parte dele não seja integralmente cumprido, deverá ser accionado o procedimento definido para o trabalho não conforme, bem como accionadas acções correctivas caso sejam necessárias.


IMPRESSOS ASSOCIADOS

- Im001 – Resultados de Microbiologia (Registo de Brancos)
- Im006 – Controlo Ambiental – Ar e superfícies
- Im010 – Salmonella – Registo de Resultados (Registo de Brancos)
- Im011 – Utilização e Controlo de Meios de Cultura e Soluções de Diluição
- Im012 – Controlo de Qualidade na Análise Microbiológica – Registo de Resultados
- Im013 – Análise Microbiológica – ETAR – Registo de resultados
- Im022 – Análise Microbiológica – Registo de Resultados - Métodos Enzimáticos
- Im023 – Análise Microbiológica – Registo de Resultados - Lamas

DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

PA_M04 – Controlo Ambiental

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 02-01-2018 |

| | | | |
|---|---|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | Pág. 6/7 | |
| | PA_M11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia | Ed. 02 | Rev. 10 |

PA_M05 – Controlo da Temperatura das Estufas de Incubação

PA_M07 – Produção e Esterilização da água utilizada em microbiologia

PA_M09 – Controlo dos meios de cultura

Cópia Não Controlada


REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Lightfoot, N. F. & Maier, E. A. Análise Microbiológica de Alimentos e Água, Guia para a Garantia da Qualidade. Fundação Calouste Gulbenkian

SMEWW 22Ed, 9020 Quality Assurance / Quality Control

HISTORIAL DE EDIÇÕES / REVISÕES


| Edição/Revisão | Alterações Introduzidas | Entrada em vigor |
|------------------|---|-------------------------|
| 01/01 | Alteração do critério de aceitação de duplicados tendo em conta 2 gamas de trabalho (gama baixa e gama alta) Inclusão do controlo dos lotes de fabricante dos meios de cultura de crescimento (recuperação do meio) – Quadro I e Síntese – de acordo com o definido no PA _M 09. | 28/11/2006 |
| 01/02 | Inclusão do controlo dos lotes de MR aquando da sua recepção e inclusão da possibilidade de utilização dos MR após expirar o prazo de validade definido pelo fabricante. | 12/02/2007 |
| 01/03 | Alteração do nº de colónias a confirmar nos duplicados de Coliformes Termotolerantes e <i>Escherichia Coli</i> (5 colónias). | 08/05/2007 |
| 01/04 | Retirada a monitorização das temperaturas em contínuo com sondas. | 12/11/2007 |
| 01/05 | Passagem do controlo de qualidade de soluções de diluição em utilização para semanal | 26/11/2007 |
| 01/06 | Clarificação do número mínimo de colónias a confirmar e introdução da análise semestral da recuperação dos meios de cultura específicos de crescimento | 23/01/2009 |
| 01/07 | Actualização do logótipo. Alteração do CQ: lentículas semanais →quinzenais; duplicados diário → 2xsemana; controlo ambiental 2xsemana → 1xsemana; controlo negativo semanal → diário se a reacção for positiva; ensaio em paralelo trimestralmente | 09/07/2010 |
| 01/08 | Não se efectua duplicados para NMP (Collert e Enterolert) | 19-09-2011 |
| 02/00 | Reestruturação do documento, por tipo de método | 05-12-2011 |
| 02/01 | Ensaio em paralelo com lamas apenas anual | 25-06-2012 |
| 02/02 | Esclarecimento que a periodicidade do material de referência é após a construção da carta | 20-12-2012 |
| 02/03 | Critério aceitação EIL | 07-06-2013 |
| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
| CL | CL | 02-01-2018 |

| | | | | |
|--|--|------------|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 7/7 | |
| | PA_M11 – Controlo de Qualidade Interno – Microbiologia | | Ed. 02 | Rev. 10 |
| 02/04 | Ensaio qualitativo fazem Branco em vez de esterilidade | 18-06-2013 | | |
| 02/05 | Estirpe conhecida em vez de material de referência. | 15-11-2013 | | |
| 02/06 | Alteração do número de colónias nos ensaios em duplicado para os métodos quantitativos. | 23-05-2014 | | |
| 02/07 | Método semiquantitativo alterado para múltiplos. Removida preferência por material de referência sem diluição. Cartas MR elaboradas e validadas até 2 semanas após último dos 20 valores | 30-10-2014 | | |
| 02/08 | Redução do CQ: | 22-06-2015 | | |
| 02/09 | Revisão do CQ | 02-07-2016 | | |
| 02/10 | Alteração do CQ: NMP com branco e MR quinzenal, + e – por lote. UFC: Produtividade em vez de carta guia | 02-01-2018 | | |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 02-01-2018 |

C.4

PAm 09 – Controlo de qualidade de meios de Cultura

| | | | | |
|--|--|--|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 1/13 | |
| | <u>PAm09</u> – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Ed. 02 | Rev. 01 |

ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este procedimento destina-se a descrever a metodologia referente à preparação e ao controlo de qualidade a ser efectuado nos meios de cultura.

Cópia Não Controlada

DESCRIÇÃO

A designação de meios de cultura refere-se aos meios líquidos, semissólidos ou sólidos que suportam a multiplicação, identificação ou preservação da viabilidade de microorganismos, podendo ou não inibir o crescimento de outros microorganismos.

Considera-se um lote de meio de cultura aquele que é preparado em condições idênticas, no mesmo dia, a partir do mesmo lote de meio desidratado, com a possibilidade de adição de suplementos, do mesmo lote. A data de preparação identifica o lote. Em adição pode ter a data de distribuição.

Uma vez que a qualidade do meio de cultura utilizado para determinada pesquisa ou quantificação de um determinado microorganismo constitui um factor crítico à realização do ensaio, o laboratório sempre que prepara um lote de meio de cultura efectua o controlo de qualidade do mesmo baseado na consistência, no aspecto (cor e transparência), no pH, na esterilidade, na produtividade e selectividade (de forma quantitativa ou qualitativa). Nos meios adquiridos prontos apenas é feita uma avaliação qualitativa.

Paralelamente é também efectuado um controlo ao longo da utilização dos meios no sentido de verificar se ocorreu alguma alteração na sua qualidade.

PROCEDIMENTO**PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA**

Sempre que os meios de cultura sejam preparados a partir de meios desidratados, adquiridos comercialmente, devem seguir-se escrupulosamente as indicações do fabricante.


A água usada para a preparação dos meios é controlada regularmente, conforme estabelecido em PAm07.

Com as precauções de segurança normais, deve adicionar-se o meio desidratado progressivamente, agitando, ao volume específico, sem perfazer. Os meios desidratados com agar devem repousar dentro de água algum tempo, para permitir a hidratação, antes de aquecer e agitar para completa dissolução.

Se necessário, os ajustes de pH devem ser feitos antes de esterilizar o meio. São usadas soluções de NaOH ou HCl de concentração de 1 mol/L.

O meio é distribuído por tubos ou frascos, com volumes até 1000 mL, e autoclavados à temperatura e tempo indicada pelo fabricante.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | | |
|---|--|--|-----------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 2/13 | |
| | PA_M09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Ed. 02 | Rev. 01 |

VALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura adquiridos prontos são armazenados de acordo com as indicações do fabricante e a validade é a indicada pelo fabricante.

Os meios de cultura preparados no laboratório, a partir de meios desidratados, são sujeitos ao controlo de qualidade indicado nos Quadros na altura da preparação. Após o controlo efectuado e caso este esteja dentro dos critérios de aceitação definidos, o meio de cultura é então colocado em utilização.

São armazenados refrigerados e ao abrigo da luz e são usados no período de 6 meses se distribuídos em frascos ou tubos de rosca, e 1 mês se distribuídos em placas ou tubos sem tampa selada. Estes períodos podem ser diferentes, se especificado em normas ou se os resultados da avaliação da validade efectuados pelo laboratório indicarem uma validade superior. A verificação da validade é feita por aspecto visual, esterilidade, controlo de produtividade (qualitativo ou quantitativo), na periodicidade definida por ensaio.

As placas de Petri devem ser armazenadas invertidas, identificadas e com a data de preparação/distribuição. Em alternativa a identificação e o lote podem estar no cesto, tabuleiro ou prateleira do frigorífico, desde que a identificação não cause dúvidas. Os tubos têm a identificação e lote no cesto.

Os meios armazenados refrigerados devem ser equilibrados à temperatura ambiente antes da utilização.


PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO

Os meios de cultura podem ser fundidos no banho maria ou no micro-ondas. As tampas devem ser soltas antes do aquecimento e apertadas após remoção do aquecimento. Deve ser evitado o sobreaquecimento. Deve ser retirado do aquecimento logo que fundido e mantido à temperatura ambiente por cerca de 2 minutos antes de ser mergulhado em banho de água para arrefecimento à temperatura especificada. O meio fundido não deve ser mantido no banho mais de 4 horas, nem deixar solidificar para uso posterior.

Para os meios em que é necessário remover o oxigénio antes de usar, devem ser fundidos em banho maria. Após terem fundido, arrefecem rapidamente em banho de gelo e usam-se de seguida.

Os suplementos devem ser adicionados ao meio após o meio ter arrefecido abaixo de 50°C. Se forem adicionados a meios de cultura com agar, o suplemento deve estar pelo menos à temperatura ambiente, para evitar a gelificação. Agitar o meio gentilmente e distribuir em placas ou tubos o mais rápido possível.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | |
|--|---|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PAM09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | Pág. 3/13 | |
| | | Ed. 02 | Rev. 01 |

CONTROLO DE QUALIDADE GERAL

O desempenho de cada lote de meio deve ser testado antes da sua utilização. Quando tal não é possível, o desempenho deve ser testado em paralelo com a análise. Os meios usados para confirmação, tal como os reagentes físico-químicos para confirmação, devem ser verificados com controlo qualitativo antes da utilização, ou em paralelo com a análise.

As características físico-químicas do meio devem ser as especificadas. Deve ser verificada a quantidade/espessura de meio distribuído (tubo ou placa), aparência, cor, homogeneidade, consistência, hidratação, valor de pH. No quadro1 estão definidas as características dos meios.

No controlo microbiológico dos meios, o meio de referência adotado para avaliação de produtividade é o TSA. Os microorganismos usados para o controlo quantitativo ou qualitativo dos meios estão definidos no quadro 2. O controlo de esterilidade é feito com uma placa ou um tubo por lote, consoante o uso do meio.

Os meios adquiridos prontos devem ter um certificado de lote que demonstre que foram testados de acordo com a norma ISO 11133. Devem ser submetidos a teste qualitativo antes da sua utilização, ou em paralelo com a análise.

Os meios preparados a partir de fórmulas desidratadas, adquiridos comercialmente, devem ser submetidos a testes quantitativos se forem meios para enumeração, ou testes qualitativos para outro tipo de meios. Entende-se como meios para enumeração, aqueles que sendo selectivos ou não selectivos, permitem a contagem de microorganismos.

Os meios preparados a partir de ingredientes básicos devem ser submetidos a testes quantitativos.

O meio é avaliado pelas características físico-químicos e pelos testes microbiológicos. É considerado conforme se cumpre todos os critérios.


CONTROLO DE QUALIDADE EM MEIOS SÓLIDOS, LÍQUIDOS OU SOLUÇÕES DE DILUIÇÃO

Efetua-se quando necessários os testes quantitativos de produtividade e de selectividade. Consideram-se controlos positivo e negativo os testes qualitativos de produtividade e selectividade. O teste de selectividade realizado é habitualmente qualitativo.

O teste de especificidade é efectuado apenas em alguns meios, especificados no Quadro 2.

Descrevem-se em seguida os testes efectuados no controlo de qualidade dos meios.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | |
|--|---|-----------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | <p>Procedimentos Auxiliares de Microbiologia</p> <p>PA_M09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura</p> | Pág. 4/13 | |
| | | Ed. 02 | Rev. 01 |

ASPECTO VISUAL (COR E TRANSPARÊNCIA) (VEJA-SE QUADRO 1)

Proceder à observação do meio de cultura.

Alterações anormais no aspecto poderão ser devidas a:

- baixa qualidade da água e/ou do meio desidratado
- pH incorrecto
- contaminação do meio em causa
- sobreaquecimento do meio durante a preparação

PERIODICIDADE – O aspecto visual (cor e transparência) do meio de cultura é verificado diariamente quando se utiliza o meio sendo no entanto apenas registado essa verificação quando o lote interno de meio é preparado ou quando se verifica alguma situação anormal.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – O meio de cultura não deverá apresentar qualquer alteração anormal no seu aspecto, caso contrário o meio deverá ser rejeitado.

CONSISTÊNCIA (RESISTÊNCIA DO MEIO GELOSADO) (VEJA-SE QUADRO 1)

Com a ajuda de uma ansa verificar a consistência do meio de cultura sólido. Testa-se uma placa por lote.

Uma resistência insuficiente poderá ser devida a:

- insuficiência de gelose na solução
- homogeneização insuficiente
- proporção incorrecta de meio desidratado / volume de água
- alteração de pH devida à hidrólise de um ácido
- sobreaquecimento do meio durante a preparação

PERIODICIDADE – A verificação da consistência do meio de cultura é efectuada sempre que se prepare um lote interno de meio de cultura sólido.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – O meio de cultura não deverá apresentar qualquer alteração anormal na sua consistência, caso contrário o meio deverá ser rejeitado.

pH (VEJA-SE QUADRO 1)

Determina-se o pH do meio de cultura de acordo com o respectivo procedimento (PA_M08 – Determinação do pH dos meios de cultura). Testa-se uma placa ou tubo por lote.


PERIODICIDADE – O controlo do pH dos meios de cultura é efectuada sempre que se prepare um lote interno de meio.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – O pH do meio de cultura deverá estar de acordo com as instruções do fabricante.

ESTERILIDADE

Efectua-se o controlo de esterilidade para testar o meio de modo a garantir que este realmente é estéril nas condições em que ele é utilizado para os ensaios. Testa-se uma placa ou tubo por lote.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | |
|---|---|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PAM09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | Pág. 5/13 | |
| | | Ed. 02 | Rev. 01 |

Sempre que um lote interno de meio é preparado, incuba-se uma placa de Petri ou tubo de ensaio, por lote, com o meio em causa à temperatura de referência durante 2 a 5 dias

Sempre que são utilizados meios de confirmação ou soluções de diluição realiza-se um controlo de esterilidade em simultâneo, à mesma temperatura e tempo de incubação (tempo de referência).

PERIODICIDADE – O controlo da esterilidade é efectuado sempre que se prepara um lote interno de meio e diariamente no caso dos meios de confirmação em que é efectuado um ensaio de esterilidade a acompanhar o ensaio.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – O meio de cultura não deverá apresentar qualquer crescimento, caso contrário o meio deverá ser rejeitado.

CONTROLO QUALITATIVO DE PRODUTIVIDADE E SELECTIVIDADE/ESPECIFICIDADE: POSITIVO E NEGATIVO (VEJA-SE QUADROS 2 E3)

Efectua-se o controlo positivo e negativo para testar o meio de modo a garantir que este realmente funciona de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante.

CONTROLO POSITIVO: inocula-se uma cultura pura da bactéria que se pretende pesquisar no meio em questão. Normalmente usa-se uma colónia e o tempo de incubação deve ser o mínimo do ensaio.

PERIODICIDADE – O controlo positivo dos meios de cultura é efectuado quando se prepara um lote interno de meio (ou chega ao laboratório novo lote de meio) e quinzenalmente durante a sua utilização (pode ser o MR quantitativo), excepto no caso dos meios de confirmação em que diariamente é efectuado um positivo.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – Após a incubação à temperatura de referência deverá verificar-se o crescimento da bactéria apresentando características típicas. Caso contrário o meio deverá ser rejeitado.

CONTROLO NEGATIVO: inocula-se uma cultura pura de uma bactéria cujas colónias nesse meio de cultura apresentem características diferentes da cultura usada no controlo positivo ou que não apresente crescimento. Normalmente usa-se uma colónia e o tempo de incubação deve ser o máximo do ensaio.


PERIODICIDADE – O controlo negativo dos meios de cultura é efectuado quando que se prepara um lote interno de meio (ou chega ao laboratório novo lote de meio), e mensalmente durante a sua utilização. No caso dos meios de confirmação, o controlo negativo é efetuado em simultâneo com a análise quando o microorganismo é positivo no meio (ex: teste de ureia com *Proteus hauseri*, para a pesquisa de Salmonella).

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – Após a incubação à temperatura de referência não se deverá verificar qualquer crescimento ou caso ocorra crescimento este deverá ser o típico indicado pelo fabricante. Caso contrário o meio deverá ser rejeitado.

PRODUTIVIDADE QUANTITATIVA (VEJA-SE QUADRO 2)

Efectua-se o controlo de produtividade para testar o desempenho do meio na recuperação do microorganismo alvo, de modo a garantir a sua homogeneidade ao longo do tempo de validade e com diferentes lotes. Testam-se os meios de enumeração e também o meio de referência, TSA. Testam-se, por lote, pelo menos 2 placas do meio. O período de incubação deve ser o mínimo do ensaio.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | |
|--|--|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | Pág. 6/13 | |
| | | Ed. 02 | Rev. 01 |

A partir de material de referência prepara-se a diluição adequada. Inocula-se uma cultura pura da bactéria que se pretende pesquisar no meio em questão. Usando toma igual efectuar o ensaio em duplicado. E em paralelo repetir o ensaio, também em duplicado, no meio de referência (TSA ou lote anterior do meio).

Após filtração ou incorporação, deve obter-se preferencialmente 80 a 120 colónias no meio de referência. Pode ser necessário mais do que uma placa ou filtro por cada meio. Nos meios de enriquecimento e pré-enriquecimento, o valor de colónias obtido deve ser ≤ 100 cfu.

Calcula-se a taxa de produtividade, P_R , como a razão entre o número total de colónias obtidas no meio em avaliação, (N_s), e o número total de colónias obtidas no meio de referencia, (N_0).

$$P_R = \frac{N_s}{N_0}$$

PERIODICIDADE – é efectuado quando se prepare um lote interno de meio e mensalmente durante a validade do mesmo.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – P_R deve ser $\geq 0,50$ na comparação de meio selectivo com não selectivo. Nos casos de comparação de meio não selectivo com outro meio não selectivo, ou quando a comparação é entre diferentes lotes do mesmo meio, P_R deve ser $\geq 0,70$. Quando $P_R > 1,4$ deve ser identificada a razão. Estes valores podem ser mais exigentes quando passam a ser verificados com carta de controlo. O ensaio deve ser repetido e avaliada a sua adequabilidade. Caso a situação persista, o meio deve ser rejeitado e o fornecedor deve ser informado.

NOTA – Pode ser feito em simultâneo com o MR de acordo com o PA_M11.

SELECTIVIDADE QUANTITATIVA (VEJA-SE QUADRO 2)

Efectua-se o controlo de selectividade para determinar o factor de inibição de um meio ao organismo não alvo.

A partir de material de referência preparam-se no mínimo 3 diluições. Inocula-se o meio em questão e em paralelo o meio de referência, TSA. Após filtração ou incorporação, incuba-se e deve obter-se crescimento na maior diluição no meio não selectivo, e na menor diluição do meio selectivo não deverá haver crescimento. O período de incubação deve ser o máximo do ensaio.

Calcula-se S_F como a diferença entre a diluição mais alta que apresenta crescimento no meio de referência não selectivo (D_0), e a diluição mais alta que apresenta crescimento comparável no meio em teste (D_s), em unidades \log_{10} .

$$S_F = D_0 - D_s$$


PERIODICIDADE – é efectuado quando se prepare um lote interno de meio, se especificado quantitativo.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – S_F deve ser pelo menos 2.

TESTE QUANTITATIVO PARA SOLUÇÕES DE DILUIÇÃO (VEJA-SE QUADRO 1)

Efectua-se este controlo para confirmar a estabilidade dos microorganismos no meio.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | | |
|--|--|--|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 7/13 | |
| | PA_{M09} – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Ed. 02 | Rev. 01 |

Inocular uma toma da solução de diluição, por ex. 9mL, com 1mL da suspensão do microorganismo, contendo cerca de 10^4 cfu/ml e agitar.

Remover imediatamente 0,1 mL da solução de diluição inoculada e espalhar na superfície de uma placa de meio não selectivo, ex TSA. Será a leitura T_0 .

A solução de diluição inoculada aguarda à temperatura ambiente cerca de 45 min, agita e novamente remove 0,1 mL. Faz o espalhamento na superfície de uma placa de meio não selectivo, ex TSA. Será a leitura T_1 . Incubação a 30°C por 72 h.

PERIODICIDADE – é efectuado quando se prepare um lote interno de meio, se especificado no quadro 1.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – T_1 deve ser $\pm 30\%$ de T_0 .

ESPECIFICIDADE (VEJA-SE QUADRO 2)

Efectua-se o controlo de especificidade para verificar que microorganismos interferentes (não-alvo) que não são inibidos não produzem colónias características.

A partir de uma cultura pura, quantificável ou não, inocula-se o meio em análise. Incuba-se à temperatura e tempo de referência.


PERIODICIDADE – é efectuado quando se prepare um lote interno de meio, se especificado no quadro 1.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO – As colónias interferentes não devem apresentar características idênticas às do microorganismo alvo.

QUADRO 1

| MEIO DE CULTURA / SOLUÇÃO DILUIÇÃO | TIPO CONTROLO | pH | Cor | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA |
|---|---|---------------|---------------------|--------------|---------------|
| SOLUÇÕES DE DILUIÇÃO | | | | | |
| Água Tamponada Peptonada (ATP) | Qualitativo | 7,0 \pm 0,2 | - | Líquido | ✓ |
| Maximum Recovery Diluent (Peptona Salina) | Quantitativo p/ soluções | 7,0 \pm 0,2 | Amarelado | Líquido | ✓ |
| Triptona Soya Broth (TSB) | Qualitativo | 7,3 \pm 0,2 | Amarelado | Líquido | ✓ |
| MEIOS DE CULTURA NÃO ESPECIFICOS | | | | | |
| Caldo Brain Heart (BH) | Qualitativo | - | Âmbar claro | Líquido | |
| Kingler Iron Agar | Qualitativo | 7,4 \pm 0,2 | Vermelho | Sólido | ✓ |
| Nutrient Broth + Agar (Caldo nutritivo) | Qualitativo | 7,0 \pm 0,2 | Amarelado | Sólido | ✓ |
| Triple sugar iron agar (TSI) | Qualitativo | 7,4 \pm 0,2 | Vermelho alaranjado | Sólido | ✓ |
| Triptone soya agar (TSA) | Produtividade quantitativa | 7,3 \pm 0,2 | Amarelado | Sólido | ✓ |
| Yeast Extract Agar (YEA) | Produtividade quantitativa | 7,2 \pm 0,2 | Amarelado | Sólido | ✓ |
| MEIOS DE CULTURA ESPECIFICOS | | | | | |
| BCYE | Produtividade quantitativa | 6,9 \pm 0,2 | Preto | Sólido | |
| BCYE-Cys | Qualitativo | 6,9 \pm 0,2 | Preto | Sólido | |
| Brilliant Green Agar | Qualitativo | 6,9 \pm 0,2 | Verde | Sólido | ✓ |
| Coliert 18 | Produtividade quantitativa, selectividade qualitativa | - | Amarelado | Líquido | ✓ |

| | | |
|------------------|-----------------|-------------------------|
| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
| CL | CL | 08-06-2017 |


| | | | | |
|---|---|--|-----------|---------|
|  <p>SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas</p> | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 8/13 | |
| | PAM09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Ed. 02 | Rev. 01 |

| MEIO DE CULTURA / SOLUÇÃO DILUIÇÃO | TIPO CONTROLO | PH | COR | CONSISTÊNCIA | TRANSPARÊNCIA |
|--|--|---------|--------------------|--------------|---------------|
| Cromogenic Coliform Agar - CCA | Produtividade quantitativo, selectividade e especificidade qualitativo | 6,8±0,2 | Amarelado | Sólido | ✓ |
| Enterolert | Produtividade quantitativo, selectividade e especificidade qualitativo | 7,2±0,2 | Amarelado | Líquido | ✓ |
| Fluorocult-DEV | Qualitativo | 7,2±0,2 | Roxo | Líquido | ✓ |
| GVPK | Produtividade quantitativo, selectividade qualitativo | 6,9±0,2 | Preto | Sólido | ✓ |
| Gelose Xilose Lisina Desoxilato (XLD) | Qualitativo produt e sel | 7,4±0,2 | Vermelho | Sólido | ✓ |
| Kanamycin | Qualitativo | 7,1±0,2 | Castanho azulado | Sólido | ✓ |
| Lactose Gelatin Medium (LGM) | Qualitativo | 7,5±0,2 | Vermelho | Sólido | ✓ |
| Lisine descarboxilase broth | Qualitativo | 6,8±0,2 | Castanho azulado | Líquido | ✓ |
| Mannitol Salt Agar (MSA) | Produtividade quantitativo, selectividade qualitativo | 7,5±0,2 | Vermelho | Sólido | ✓ |
| mCP Agar | Produtividade quantitativo, selectividade e especificidade qualitativo | 7,6±0,2 | Roxo | Sólido | ✓ |
| Membrane Lauryl Sulphate Agar | Produtividade quantitativo, selectividade qualitativo | 7,4±0,2 | Vermelho | Sólido | ✓ |
| Motility Nitrate Medium (MNM) | Qualitativo | 7,1±0,2 | Alaranjado | Sólido | ✓ |
| MEVAG | Qualitativo | - | Violeta pálido | Sólido | ✓ |
| Pseudomonas Agar Base (PAB) | Produtividade quantitativo, selectividade qualitativo | 7,1±0,2 | Branco amarelado | Sólido | ✓ |
| Rappaport Vassiliadis Soya Broth (RVS) | Ver Quadro 2 | 5,2±0,2 | Azul petróleo | Líquido | ✓ |
| Modified Rappaport Vassiliadis (MSVR) | Ver Quadro 2 | 5,1-5,4 | Azul | Semi-sólido | ✓ |
| Schubert Medium | Qualitativo | 7,4±0,2 | Branco amarelado | Líquido | ✓ |
| Selenite-Cystine Broth | Qualitativo | - | Amarelado | Líquido | ✓ |
| Simmons Citrate Agar | Qualitativo | 6,9±0,2 | Verde | Sólido | ✓ |
| Skim Milk powder + Agar | Qualitativo | 7,4±0,2 | Branco | sólido | opaco |
| Sianetz & Bartley | Produtividade quantitativo, selectividade qualitativo | 6,5±0,5 | Rosa | Sólido | ✓ |
| Tryptone Bile x-glucuronide (TBX) | Produtividade quantitativo, selectividade qualitativo | 7,2±0,2 | Amarelado | Sólido | ✓ |
| Tryptone bile agar (TBA) | Qualitativo | 7,2±0,2 | Amarelado | Sólido | ✓ |
| TSC | Produtividade quantitativo, selectividade qualitativo | 7,6±0,2 | amarelado | sólido | ✓ |
| Ureia Agar + Ureia | Qualitativo | 6,8±0,2 | Amarelo alaranjado | Sólido | ✓ |


QUADRO 2

| MEIO DE CULTURA / SOLUÇÃO DILUIÇÃO | TEMP* (°C) | TEMPO (h) | PRODUTIVIDADE | SELECTIVIDADE | ESPECIFICIDADE |
|------------------------------------|------------|-----------|---|---------------|----------------|
| SOLUÇÕES DE DILUIÇÃO | | | | | |
| Água Tamponada Peptonada (ATP) | 36 | 16-20 | <i>Salmonella enteritidis</i> WDCM00030 | - | |


| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | | |
|--|---|--|-----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PAM09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Pág. 9/13 | |
| | | | Ed. 02 | Rev. 01 |

| MEIO DE CULTURA / SOLUÇÃO DILUIÇÃO | TEMP* (°C) | TEMPO (h) | PRODUTIVIDADE | SELECTIVIDADE | ESPECIFICIDADE |
|---|----------------|-------------------------|---|--|---|
| Maximum Recovery Diluent (Peptona Salina) | 37 | 24 | Staphylococcus aureus WDCM00034 ou 32 Escherichia coli WDCM00013 P ₂ ≥0,70 no TSA | - | |
| Tryptona Soya Broth (TSB) | 37 22 | 24 5d | Staphylococcus aureus WDCM00034 ou 32 Escherichia coli WDCM00013 | | |
| MEIOS DE CULTURA NÃO ESPECÍFICOS | | | | | |
| Caldo Brain Heart (BH) | 37 | 24 | Staphylococcus aureus WDCM00034 ou 32 | - | |
| Nutrient Broth + Agar (Caldo nutritivo) | 37 | 24 | Salmonella enteritidis WDCM00030 | - | |
| Kingler Iron Agar | 36 | 21-27 | Salmonella enteritidis WDCM00030 | - | |
| Triple sugar iron agar (TSI) | 36 | 21-27 | Salmonella enteritidis WDCM00030 | | |
| Tryptone Soya Agar (TSA) | 36 | 24 | Escherichia coli WDCM00013 Clostridium perfringens WDCM00007 Pseudomonas aeruginosa WDCM00024 Enterococcus faecalis WDCM00009 Staphylococcus aureus WDCM00032 ou 34 P ₂ ≥0,70 com lote anterior | | |
| Yeast Extract Agar (YEA) | 36 22 42 | 40-48 62-72 40-48 | Escherichia coli WDCM00013 Bacillus subtilis WDCM00003 P ₂ ≥0,70 com lote anterior | - | |
| MEIOS DE CULTURA ESPECÍFICOS | | | | | |
| BCYE | 36 | 2-5d | Legionella pneumophila WDCM 00107 P ₂ ≥0,70 com lote anterior | | |
| BCYE-Cys | 36 | 2-5d | Escherichia coli WDCM00013 ou | Legionella pneumophila WDCM00107 ou outra Legionella | |
| Brilliant Green Agar | | | Salmonella enteritidis WDCM00030 | Escherichia coli (*) WDCM00013 | |
| Coliert 18 | 36 44 | 18-22 | Escherichia coli WDCM00013 Enterobacter aerogenes WDCM000175 Escherichia coli WDCM00090 P ₂ ≥0,50 com TSA ou 0,7 com lote anterior | Pseudomonas aeruginosa WDCM00024 Qualitativo: (0) | Obs Produtividade: - Substituição de Klebsiella pneumoniae WDCM 00206 por Enterobacter aerogenes |
| Cromogenic Coliform Agar - CCA | 36 | | Escherichia coli WDCM00013 Enterobacter aerogenes WDCM000175 P ₂ ≥0,70 cada com TSA | Enterococcus faecalis WDCM00009 Qualitativo:(0) | Pseudomonas aeruginosa WDCM00024 Qualitativo:(0-1) |
| Enterolert | 41 | 24-28 | Enterococcus faecalis WDCM00009 Enterococcus faecium ATCC 33567 P ₂ ≥0,50 com TSA | Pseudomonas aeruginosa WDCM00024 ou Escherichia coli WDCM00013 Qualitativo: (0) | |
| Elaborado | | Aprovado | | Entrada em Vigor | |
| CL | | CL | | 08-06-2017 | |

| | | | | |
|--|--|--|------------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Pág. 10/13 | |
| | | | Ed. 02 | Rev. 01 |

| MEIO DE CULTURA / SOLUÇÃO DILUIÇÃO | TEMP* (°C) | TEMPO (h) | PRODUTIVIDADE | SELECTIVIDADE | ESPECIFICIDADE |
|--|------------|-----------------|---|--|--|
| Fluorocult-DEV | 36 | 18-24 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | <i>Enterobacter aerogenes</i> WDCM000175 | |
| GVPC | 36 | 2-5 d | <i>Legionella pneumophila</i> WDCM00107 | <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009 ou 00087 Ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00026 ou 25 ou 24 Ou <i>Escherichia coli</i> WDCM 00012 ou 00013 | |
| | | 5-10d | <i>Legionella anisa</i> WDCM00106 | | |
| Gelose Xilose Lisina Desoxilato (XLD) | 37 | 21-27 | <i>Salmonella enteritidis</i> WDCM00030 ou <i>Salmonella typhimurium</i> WDCM00031 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 Ou <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009 | |
| | | | Qualitativo:2 | Qualitativo: 0-1 / 0 | |
| Kanamycin | 44 | 2 | <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | |
| Lactose Gelatin Medium (LGM) | 37 | 48 | <i>Clostridium perfringens</i> WDCM00007 | <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00034 ou 32 | |
| Lisine descarboxilase broth | 36 | 21-27 | <i>Salmonella enteritidis</i> WDCM00030 | <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009 | |
| Mannitol Salt Agar (MSA) | 37 | 40-52 | <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00034 ou 32 OU <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | |
| | | | P ₂ ≥0,50 | Qualitativo: (0) | |
| mCP Agar | 44 | 18-24 | <i>Clostridium perfringens</i> WDCM00007 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | <i>Clostridium bifermentans</i> WDCM00079 |
| | | | P ₂ ≥0,50 ou 0,7 com lote anterior | Qualitativo: (0) | Qualitativo: (0) |
| Membrane Lauryl Sulphate Agar | 36 | 18-24 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | <i>Bacillus subtilis</i> WDCM00003 | |
| | | | P ₂ ≥0,50 | Qualitativo:(0) | |
| MEVAG | 37 | 18-24 | <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00034 ou 32 ou <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00024 | |
| Motility Nitrate Medium (MNM) | 37 | 24 | <i>Clostridium perfringens</i> WDCM00007 | <i>Escherichia coli</i> (+) WDCM00013 | |
| Pseudomonas Agar Base (PAB) | 36 | 40-48 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00024, 25 ou 26 | <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009 Ou <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | |
| | | | P ₂ ≥0,50 ou 0,7 com lote anterior | Qualitativo: (0) | |
| Rappaport Vassiliadis Soya Broth e Modified Rapapport Vassiliadis (MSVR) | 41,5 | 21-27 | <i>Salmonella enteritidis</i> WDCM00030 ou <i>Salmonella typhimurium</i> WDCM00031 + <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00024 ou 25 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 Ou <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009 | |
| | | 44-52 | >10 colónias em XLD | <100 ou <10 colónias em TSA | |
| Schubert Medium | 44 | 18-24 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00034 ou 32 | |
| Selenite-Cystine Broth | 36 | 18-24 | <i>Salmonella typhimurium</i> WDCM00031 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | |
| Elaborado | | Aprovado | | Entrada em Vigor | |
| CL | | CL | | 08-06-2017 | |

| | | | | |
|--|--|--|------------|---------|
|  Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Pág. 11/13 | |
| | | | Ed. 02 | Rev. 01 |

| MEIO DE CULTURA / SOLUÇÃO DILUIÇÃO | TEMP* (-°C) | TEMPO (h) | PRODUTIVIDADE | SELECTIVIDADE | ESPECIFICIDADE |
|------------------------------------|-------------|-----------|--|--|----------------|
| Simmons Citrate Agar | 37 | 48 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | <i>Klebsiella oxitoca</i> (+) ATCC8724 | |
| Skim Milk powder + Agar | 37 | 40-48 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00024 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | |
| Slanetz & Bartley | 36 | 40-48 | <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009 Ou <i>Enterococcus faecium</i> WDCM00177 ou 178 P ₂ ≥0,50 ou 0,7 com lote anterior | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 Ou <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00032 ou 34 Qualitativo: (0) | |
| Tryptone Bile x-glucuronide (TBX) | 44 | 18-24 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | <i>Klebsiella oxitoca</i> ATCC8724 | |
| Tryptone bile agar (TBA) | 44 | 19-20 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | <i>Klebsiella oxitoca</i> ATCC8724 | |
| TSC | 44 | 18-24 | <i>Clostridium perfringens</i> WDCM00007 P ₂ ≥0,50 ou 0,7 com lote anterior | <i>Bacillus subtilis</i> WDCM00003 Qualitativo: (0) | |
| Ureia Agar + Ureia | 36 | 24 | <i>Salmonella enteritidis</i> WDCM00030 | <i>Proteus hauseri</i> (+) ATCC 13315 | |

*1) Apresenta crescimento embora não seja característico da bactéria a pesquisar (+) Reacção positiva do teste

QUADRO 3

| REAGENTES | CONTROLO POSITIVO | CONTROLO NEGATIVO |
|---------------------------------|---|---|
| REAGENTES DE CONFIRMAÇÃO | | |
| Indol | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 | |
| Peroxido de hidrogénio | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00024 <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00034 ou 32 | |
| Reagentes nitrato A e B | <i>Clostridium perfringens</i> WDCM00007 | |
| Kit soluções Gram | <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00034 ou 32 ou <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00024 |
| Teste oxidase | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00024 | <i>Escherichia coli</i> WDCM00013 |
| Teste Fosfatase | <i>Clostridium perfringens</i> WDCM00007 | <i>Clostridium bifermentans</i> WDCM00079 |


Nota- O controlo negativo do Quadro 3 é opcional.

ACÇÕES PREVENTIVAS E CORRECTIVAS

Sempre que o procedimento ou parte dele não seja integralmente cumprido, deverá ser accionado o procedimento definido para o trabalho não conforme, bem como accionadas acções correctivas caso sejam necessárias.

Dever-se-ão rever as instruções de preparação, verificar a qualidade da água utilizada na preparação do meio em causa e, caso aplicável, as condições de esterilização (nomeadamente temperatura e tempo de autoclavagem) e de conservação. A consulta da norma ISO 11133, no anexo H, poderá ajudar a determinar a causa do problema.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | | |
|--|--|--|------------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia | | Pág. 12/13 | |
| | PA_M09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | | Ed. 02 | Rev. 01 |

No caso de a situação persistir dever-se-á rejeitar o lote do meio de cultura (comercialmente adquirido) e averiguar as causas.

Cópia Não Controlada

IMPRESSOS ASSOCIADOS

Im002 – Preparação e Controlo de Meios de Cultura e Soluções de Diluição

Im011 – Utilização e Controlo de Meios de Cultura e Soluções de Diluição

DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

PA_M08 – Determinação do pH dos meios de cultura

REFERÊNCIAS NORMATIVAS

ISO 11133:2014 - Microbiology of food, animal feed and water- preparation, production, storage and performance testing of culture media

NP 4354:1998 – Qualidade da água. Técnicas de avaliação e controlo dos meios de cultura utilizados na contagem de colónias em ensaios de controlo de qualidade da água.


Lightfoot, N. F. & Maier, E. A. Análise Microbiológica de Alimentos e Água, Guia para a Garantia da Qualidade. Fundação Calouste Gulbenkian

SMEWW 22Ed, 9020 Quality Assurance / Quality Control

HISTORIAL DE EDIÇÕES / REVISÕES

| Edição/Revisão | Alterações Introduzidas | Entrada em vigor |
|----------------|---|------------------|
| 01/01 | Clarificação das condições em que é efectuada a esterilidade dos meios em utilização (tempo de incubação) Inclusão do controlo dos lotes de fabricante dos meios de cultura de crescimento (recuperação do meio) | 28/11/2006 |
| 01/02 | Inclusão das condições de conservação e prazos de validade dos meios de cultura | 12/02/2007 |
| 01/03 | Para o caso específico do meio de cultura mCp Agar, foi retirado o controlo do lote de fabricante através de ensaio de recuperação | 08/05/2007 |
| 01/04 | Introdução do meio específico Citrato | 09/12/2008 |
| 01/05 | Introdução dos meios específicos Selenite-Cystine Broth, Collert Test Kit, Collert 18 e Enterolert | 23/04/2010 |
| 01/06 | Retirada excepção da recuperação ao mCP Agar | 09/06/2011 |


| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

| | | | |
|--|---|------------|---------|
|  Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M09 – Preparação e Controlo dos meios de cultura | Pág. 13/13 | |
| | | Ed. 02 | Rev. 01 |
| 01/07 | Clarificação dos controlos positivos e negativo. Indicação de reacção positiva no controlo negativo. Introdução dos meios MSVR, TBX e SK. <i>Proteus vulgaris</i> → <i>Proteus hauseri</i> ; <i>Klebsiella aerogenes</i> → <i>Rautella planticola</i> . | 19-09-2011 | |
| 01/08 | Introdução dos meios: Triple sugar agar, triptone soya agar, triptone bile agar, MNM e LGM. Retirados os meios: PCA, <i>Pseudomonas</i> agar F, <i>Pseudomonas</i> agar P, ColiTest test kit | 25-02-2013 | |
| 01/09 | Introdução de meios: MSA-9H e MEVAG; alteração de controlo negativo de mCP; alteração do controlo negativo de meios sem-primos para mensalmente. Correção de tempos de incubação de controlo de meios. | 26-05-2014 | |
| 01/10 | Redução do CQ: | 22-06-2015 | |
| 02/00 | Reestruturação para adaptação à ISO 11133:2014. Novos meios. | 30-06-2016 | |
| 02/01 | Introdução <i>Legionella</i> | 08/06/2017 | |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 08-06-2017 |

C.5

PAm 15 - Implementação/validação de métodos

| | | | | |
|---|--|--|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia <u>PAM15</u> – Validação / Implementação de métodos | | Pág. 1/3 | |
| | | | Ed. 01 | Rev. 03 |

ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este procedimento destina-se a descrever a forma de validação/ implementação de métodos em análise microbiológica.

Cópia Não Controlada

DESCRIÇÃO

A validação (primária) de um método, refere-se a situações novas, com método desenvolvido pelo laboratório (ou alterações de técnicas, de meios, de confirmações,...) em que é necessário definir características e requisitos e implica normalmente a participação de diversos laboratórios. A implementação (validação secundária) é um processo mais simplificado e é o usado neste Laboratório. Aplica-se quando se segue normas ou equivalentes, publicados por organismos de normalização ou organismos sectoriais credíveis, em que se pretende verificar se o laboratório obtém o desempenho esperado.

PROCEDIMENTO

Procede-se a uma pesquisa bibliográfica, de forma a conhecer o princípio do método. Deve ficar definido nesta fase, se se trata de um método validado, ou se é necessário efectuar um estudo de equivalência de métodos (ISO 17994). Confirma-se estarem reunidas todas as condições necessárias para se proceder ao ensaio no Laboratório.


Iniciar a implementação com a pesquisa do microorganismo em causa usando material de referência, quer para o microorganismo em pesquisa quer para outros. Apenas após os Técnicos estarem experientes na morfologia das colónias e coloração e reacções esperadas passar a usar amostras naturais.

Ensaio qualitativos

O controlo de qualidade interno inclui ensaios em branco, no mínimo 5 ensaios, ensaios em duplicado, no mínimo 5, e também pelo menos 5 ensaios em paralelo. Deve ser demonstrado o controlo positivo e negativo.

Efectuar 20 análises de águas naturais, ou artificialmente contaminadas, englobando as diferentes matrizes habitualmente analisadas no laboratório. Deve haver várias análises de cada tipo de matriz. No mínimo 10 ensaios devem ser positivos.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 27-09-2016 |

| | | | |
|---|--|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PA_M15 – Validação / Implementação de métodos | Pág. 2/3 | |
| | | Ed. 01 | Rev. 03 |

Técnica Multiploços

O controlo de qualidade interno passa pelos ensaios em branco, no mínimo 5 ensaios, e também pelo menos 5 ensaios em paralelo. Deve ser demonstrado o controlo positivo e negativo.

Efectuar 30 análises de águas naturais, ou artificialmente contaminadas, englobando as diferentes matrizes habitualmente analisadas no laboratório. Deve haver várias análises de cada tipo de matriz. No mínimo 10 ensaios devem ser positivos.

Ensaio quantitativo

O controlo de qualidade interno passa pelos ensaios em branco, efectuar no mínimo 5 ensaios, ensaios em duplicado, no mínimo 10, e também 5 ensaios em paralelo. Deve ser demonstrado o controlo positivo e negativo. Deve ser elaborada uma carta guia, inicial, a partir de 10 resultados de material de referência quantitativo (lentículas ou pastilhas), obtidos preferencialmente por Técnicos diferentes.

Efectuar 30 análises de águas naturais, ou artificialmente contaminadas, englobando as diferentes matrizes habitualmente analisadas no laboratório. Deve haver várias análises de cada tipo de matriz. No mínimo 10 ensaios devem ser positivos.

A participação em ensaios interlaboratoriais, com resultados satisfatórios, é indispensável neste processo, embora inicialmente possa não ser efectuado em todas as matrizes.

A qualificação dos Técnicos é feita conforme estabelecido no PQ 5.2.0.03-Qualificação de Pessoal.

Efectuar a avaliação da incerteza sempre que aplicável. [\(GGC005\)](#)

No final da implementação elabora-se um relatório sumário, que refere qual o princípio do método, a experiência obtida pelo laboratório, qual o controlo de qualidade efectuado, interno e externo, com os resultados obtidos e a conclusão final. Explicita também as alterações técnicas efectuadas e os resultados obtidos com as mesmas.


ACÇÕES PREVENTIVAS E CORRECTIVAS

Sempre que o procedimento ou parte dele não seja integralmente cumprido, deverá ser accionado o procedimento definido para o trabalho não conforme, bem como accionadas acções correctivas caso sejam necessárias.

IMPRESSOS ASSOCIADOS

N.A.

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 27-09-2016 |

| | | | |
|--|---|----------|---------|
|  SMAS SINTRA SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO DE SINTRA Laboratório de Análise de Águas | Procedimentos Auxiliares de Microbiologia PAM15 – Validação / Implementação de métodos | Pág. 3/3 | |
| | | Ed. 01 | Rev. 03 |

DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

N.A.

REFERÊNCIAS NORMATIVAS

N.a.

HISTORIAL DE EDIÇÕES / REVISÕES

| Edição/Revisão | Alterações Introduzidas | Entrada em vigor |
|----------------|--|------------------|
| 01/00 | Documento novo | 01-12-2011 |
| 01/01 | Divisão por tipo de ensaio | 20-12-2012 |
| 01/02 | Substituição de ensaios semi-quantitativos por técnica multipoços. Remoção de referência normativa | 15-09-2014 |
| 01/03 | Remoção de OGC005 | 27-09-2016 |

| Elaborado | Aprovado | Entrada em Vigor |
|-----------|----------|------------------|
| CL | CL | 27-09-2016 |

D. ■ 9020 SMEWW 22nd Ed

QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL (9020)/Intralaboratory Quality Control Guidelines

TABLE 9020:VI. SUGGESTED CONTROL CULTURES FOR MICROBIOLOGICAL TESTS*

| Group | Control Culture | |
|-------------------------|--|--|
| | Positive | Negative |
| Total coliforms | <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> ‡ <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATTC 4352) | <i>Staphylococcus aureus</i> † <i>Proteus vulgaris</i> § <i>Pseudomonas aeruginosa</i> † |
| Fecal coliforms | <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (thermotolerant) | <i>Enterobacter aerogenes</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> (MUG-positive s strain) | <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (thermotolerant) |
| Enterococci# | <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> ** <i>Escherichia coli</i> †† |

* Use appropriate ATCC strains.

† *S. aureus*, *P. aeruginosa*—not lactose fermenter.‡ *E. aerogenes*—ferments lactose, but is not typically thermotolerant.§ *P. vulgaris*—not lactose fermenter, uses hydrolyzed lactose, indicating "overcooked" medium.|| *K. pneumoniae*—ferments lactose, but does not hydrolyze MUG.# Do not use closely related strains from genus *Streptococcus* as a positive control.** *S. aureus*—sensitive to sodium nalidixic acid medium.†† *E. coli*—sensitive to sodium azide in medium.

or one sample per week for a laboratory that conducts less than 10 tests/week. A test run is defined as an uninterrupted series of analyses. Evaluate and record results. An adequate sample volume is essential. Balance frequency of replicate analyses against the time, effort, and expense incurred. When the laboratory or analyst is first initiating a method or for a method or matrix in which considerable variability in results is expected, greater effort will need to be expended in performing replicate analyses. Replicate analyses of environmental samples can result in widely different counts and can be considered estimates only.

d. Sterility checks: Test media sterility before first use. Incubate minimally one per lot or a set percentage, e.g., 1 to 4%, of laboratory-prepared and ready-to-use medium, broth, or agar, at an appropriate temperature for the amount of time the test would be performed, e.g., 48 h for coliforms, and observe for growth. For enzyme defined substrate tests, check for sterility by adding media packet to 100 mL sterile deionized water and incubating at 35°C for 18 to 24 h. Certain granulated ready-to-use enzyme-substrate media may not be sterile but only free of coliforms; use of nonselective broth could result in growth and turbidity but should not produce a positive reaction.

Check each new batch (or lot, if commercially prepared) of buffered water for sterility before first use by adding 50 mL of the water to 50 mL of a double-strength broth (e.g., tryptic soy, trypticase soy, or tryptose broth). Alternatively, aseptically pass 100 mL or more dilution water through a membrane filter and place filter on nonselective medium. Incubate at 35 ± 0.5°C for 24 h and observe for growth.

Record results. If any contamination is indicated, discard medium, invalidate any data associated with that batch, and check for contamination source. Request immediate resampling.

For membrane filter tests, check the sterility of the entire process by using sterile reagent or dilution water as the sample at the beginning and end of each filtration series of samples and test for growth. With a processing interruption of more than 30 min use new sterilized funnels and repeat sterility test. Record results. If contamination is indicated, invalidate data associated

with that batch and check for source. Request immediate resampling and reanalyze.

For multiple-tube and presence-absence procedures, check sterility of prepared media and dilution water as outlined above. If any contamination is indicated, determine the cause and reject analytical data from samples tested with these materials. Request immediate resampling and reanalyze.

For pour plate procedures check sterility by pouring at least one uninoculated plate per batch or lot of media and record results. If any contamination is indicated, determine the cause. Document both problem and corrective action and request resampling.

Laboratories interested in contaminant identification can use either standardized phenotypic testing systems or genotypic procedures.

e. Precision of quantitative methods^{33,34}: Calculate precision of replicate analyses for each different type of sample examined, for example, drinking water, ambient water, or wastewater, according to the following procedure and record results:

Perform duplicate analyses on first 15 positive samples of each matrix type, with each set of duplicates analyzed by a single analyst. If there is more than one analyst, include all analysts regularly running the tests, with each analyst performing an approximately equal number of tests. Record duplicate analyses as D_1 and D_2 . Calculate the logarithm of each result. If either of a set of duplicate results is <1, add 1 to both values before calculating the logarithms. Calculate the range (R) for each pair of transformed duplicates as the mean (\bar{R}) of these ranges. See sample calculation in Table 9020:VII.

Thereafter, analyze 10% of routine samples in duplicate or one per test run. Transform the duplicates and calculate their range as above. If the range is greater than $3.27\bar{R}$, there is greater than 99% probability that the laboratory variability is excessive; in such a case, discard all analytical results since the last precision check (see Table 9020:VIII). Identify and resolve the analytical problem before making further analyses.

QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL (9020)/Intralaboratory Quality Control Guidelines

TABLE 9020:VII. CALCULATION OF PRECISION CRITERION

| Sample No. | Duplicate Analyses | | Logarithms of Counts | | Range of Logarithms (R_{log}) ($L_1 - L_2$) |
|------------|--------------------|-------|----------------------|--------|--|
| | D_1 | D_2 | L_1 | L_2 | |
| 1 | 89 | 71 | 1.9494 | 1.8513 | 0.0981 |
| 2 | 38 | 34 | 1.5798 | 1.5315 | 0.0483 |
| 3 | 58 | 67 | 1.7634 | 1.8261 | 0.0627 |
| . | . | . | . | . | . |
| . | . | . | . | . | . |
| . | . | . | . | . | . |
| 14 | 7 | 6 | 0.8451 | 0.7782 | 0.0669 |
| 15 | 110 | 121 | 2.0414 | 2.0828 | 0.0414 |

Calculations:
 Σ of $R_{log} = 0.0981 + 0.0483 + 0.0627 + \dots + 0.0669 + 0.0414 = 0.71889$
 $\bar{R} = \frac{\Sigma R_{log}}{n} = \frac{0.71889}{15} = 0.0479$
 Precision criterion = $3.27 \bar{R} = 3.27 (0.0479) = 0.1566$

Update by periodically repeating the procedures using the most recent sets of 15 duplicate results.

10. Verification

Verification is a general process used to determine whether the microbiological analytical method is performing as expected to provide reliable data. If a laboratory finds a low percentage of verification with a certain water supply or matrix, another test method must be chosen. For the most part, the confirmation/verification procedures for drinking water differ from those for other waters because of specific regulatory requirements. The following is a brief summary; further information may be found in the appropriate discussions of the specific microorganism or microbial group.

- a. Multiple-tube fermentation (MTF) methods:
 - 1) Total coliform procedure (Section 9221B)
 - a) Drinking water—Carry tests through confirmed phase only. The Completed Test is not required.
- For QC purposes, if normally there are no positive results within a quarter, analyze at least one positive source water sample to confirm that the media and laboratory procedures and equipment produce appropriate responses. For samples with a history of heavy growth without gas in presumptive-phase tubes, carry the tubes through the confirmed phase to check for false negative responses for coliform bacteria. Verify any positives for thermotolerant (fecal) coliforms or *E. coli*.

- b) Other water types—Verification can be achieved by performing the completed phase at a frequency established by the laboratory, such as 10% of positive samples, or one sample per test run, or a certain percentage depending on normal laboratory work load. For large laboratories analyzing a significant number of samples daily, 10% of positive samples may result in an unnecessary burden and a lower percentage value may be used.
- 2) Fecal streptococci procedure—Verification can be performed as outlined in Section 9230C.5 at a frequency established by the laboratory. Growth of catalase-negative, gram-positive cocci appearing as brownish-black colonies with brown halos on bile esculin agar at 35°C and in brain-heart infusion broth at 45°C verifies the organisms as fecal streptococci. Growth also in 6.5% NaCl broth and in brain-heart infusion broth at 10°C indicates that the streptococci are members of the *Enterococcus* group.
 - b. Membrane filter methods:
 - 1) Total coliform procedures
 - a) Drinking water—Swab entire membrane or pick up five typical and five atypical (nonsheer) colonies from positive samples on M-Endo or LES-Endo agar medium and verify as in Section 9222B.4f. Also verify any positives for thermotolerant coliforms. If there are no positive samples, test at least one known positive source water sample quarterly.
 - b) Other water types—Verify positives monthly by picking at least 10 typical and atypical colonies from a positive water

TABLE 9020:VIII. DAILY CHECKS ON PRECISION OF DUPLICATE COUNTS*

| Analyses | Duplicate Analyses | | Logarithms of Counts | | Range of Logarithms | Acceptance of Range† |
|----------|--------------------|-------|----------------------|---------|---------------------|----------------------|
| | D_1 | D_2 | L_1 | L_2 † | | |
| 8/29 | 71 | 65 | 1.8513 | 1.8129 | 0.0384 | A |
| 8/30 | 110 | 121 | 2.0414 | 2.0828 | 0.0414 | A |
| 8/31 | 73 | 50 | 1.8633 | 1.6990 | 0.1643 | U |

* Precision criterion = $(3.27 \bar{R}) = 0.1566$
 † A = acceptable; U = unacceptable.

E. ■ Anexo E e F da Norma ISO 29201:2012

Annex E (normative)

Intrinsic variability (standard uncertainty) of confirmed counts

E.1 General

Some selective methods are not as specific as is desirable. When the specificity (confirmation fraction) is suspected to be unsatisfactory (less than about 80 %) the presumptive results should be confirmed by additional tests. In method performance studies and comparative trials, "total confirmation", i.e. confirmation of every presumptive colony, may be imperative. In daily routine work, laboratories no doubt prefer "partial confirmation" which means taking a random pick of a small number of presumptive colonies for confirmatory tests.

Suppose n_z out of a total of n_c presumptive colonies are tested and n_k of them are found to be positive in the confirmation test. The relative number of success n_k/n_z is used as the multiplier to convert the presumptive count n_c into the confirmed count.

E.2 Total confirmation

In total confirmation, the confirmed count is obtained directly

$$x = \frac{n_k}{n_c} n_c = n_k$$

In this situation, the intrinsic variation (distribution uncertainty) of the confirmed count can be calculated as is usual for colony counts that follow the Poisson distribution for infinite populations.

$$u_{\text{rel},x} = \sqrt{\frac{1}{n_k}} \quad (\text{E.1})$$

If the test portion forms a significant proportion of the laboratory sample, the correction for finite populations can be taken into account as described in Annex C.

E.3 Partial confirmation

E.3.1 General

There are different practices and recommendations for the random selection of the subset n_z out of n_c ($n_z < n_c$) colonies when there are too many presumptive colonies for total confirmation. With MPN methods, partial confirmation should be avoided if possible.

E.3.2 Selection of a constant or proportional number

The most common partial confirmation practice is to pick at random a preselected number n_z of colonies for testing ($n_z < n_c$). The practice of selecting a proportion or the square root of the presumptive count cannot be recommended.

ISO 29201:2012(E)

The final result, the estimate of the confirmed count of the target organism per plate, x , is calculated from Equation (E.2):

$$x = \frac{n_k}{n_z} n_c \quad (\text{E.2})$$

where

n_c is the number of presumptive colonies;

n_z is the number picked for confirmation;

n_k is the number confirmed positive.

The number n_c of presumptive colonies is related to the presumptive concentration in the laboratory sample, with uncertainty governed by the Poisson distribution. The confirmation fraction n_k/n_z provides an estimate of the proportion of positives in it, with uncertainty according to the binomial or hypergeometric distribution. The two uncertainties combined provide the uncertainty of the confirmed count of target organisms.

Equation (E.3) shows how the relative Poisson distribution variance of the presumptive count and the relative binomial variance of the confirmation fraction are combined to yield an approximate relative standard uncertainty of the confirmed count.

$$u_{\text{rel},x} = \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{n_z - n_k}{n_k n_z}} \quad (\text{E.3})$$

NOTE More sophisticated statistical theory of the finite confirmation situation gives an improved equation for the relative variance of the binomial proportion n_k/n_z (References [13][15]). With this formula the estimate of the relative standard uncertainty of the confirmed count becomes in most cases somewhat smaller than with the simple approximation in Equation (E.3).

$$u_{\text{rel},x} = \sqrt{\frac{1 + \frac{(n_k + 0,5)(n_z - n_k + 0,5)}{(n_z + 1)^2} + \frac{(n_k + 0,5)(n_z - n_k + 0,5)}{(n_z + 2)n_k^2}}{n_c}} \quad (\text{E.4})$$

E.3.3 Random sector approach

In this alternative confirmation work is reduced by dividing the surface of the plate into n_q equal sectors. All colonies of one or more randomly selected sectors are subjected to confirmatory tests. The number of sectors, n_s , is chosen such that the mean number of presumptive colonies in the n_s sectors together is expected to be reasonable. It is not necessary to make an actual count of the total number of presumptive colonies in the plate. This omission, however, increases the uncertainty of the confirmed count to some extent.

The random sector alternative represents "total confirmation" of colonies in a test portion that is the fraction n_s/n_q of the original test portion. The total number picked (n_z) varies and cannot be decided beforehand. It is a random sample from the final suspension in the same way as n_c , but its origin is a test portion that is n_s/n_q times smaller than with n_c .

The result, an estimate of the confirmed count of the target organism per plate, x , is calculated from

$$x = \frac{n_k}{(n_s V / n_q)} = \frac{n_q n_k}{n_s V} \quad (\text{E.5})$$

where

n_q is the number of sectors the surface is divided into;

n_s is the number of sectors selected;

n_k is the sum of the confirmed numbers of colonies in the n_s sectors;

V is the test portion volume in millilitres.

ISO 29201:2012(E)

The equation for the final result contains neither the original number of presumptive colonies, n_c , nor the number, n_z , isolated for confirmation. All the information concerning the distribution uncertainty of the estimate, is contained in the number of confirmed colonies, n_k . The relative distribution uncertainty is calculated in the same way as for any "totally confirmed" count

$$u_{\text{rel},x} = \sqrt{\frac{1}{n_k}} \quad (\text{E.6})$$

where n_k is the number of confirmed colonies.

If the technician takes the additional trouble of also noting the total number n_c and the sampled number n_z of presumptive colonies, the random sector approach becomes another case of the general random sample approach (E.3.1). In that case, it is appropriate to calculate the confirmed count using all the information in the normal way, $x = n_k n_c / n_z$. The additional information lowers the estimate of uncertainty. Equations (E.3) or (E.4) apply.

E.3.4 Finite sample correction

Should the test portion form more than about 10 % of the laboratory sample, the estimate of $u_{\text{rel},x}^2$ may be multiplied by the finite sample correction factor (see C.2).

E.4 Example

Five colonies, n_z , were randomly selected from a total of $n_c = 50$ presumptive colonies observed. Four of the colonies, n_k , were confirmed positive. The estimated confirmed count is $x = 50(4/5) = 40$.

The relative distribution uncertainty of the confirmed count is

$$u_{\text{rel},x} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{5-4}{5 \times 4}} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{1}{20}} = \sqrt{0,02 + 0,05} = 0,26 \quad (\text{E.7})$$

Using the advanced formula, the relative distribution uncertainty of the confirmed count is

$$u_{\text{rel},x} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{(4+0,5)(5-4+0,5) \times 5^2}{(5+1)^2 (5+2) \times 4^2}} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{168,75}{4032}} = \sqrt{0,02 + 0,0419} = 0,25 \quad (\text{E.8})$$

A marginally smaller value than above.

Most of the uncertainty of 26 % was due to the uncertainty of confirmation. If all colonies had been confirmed with the result $k = 40$, the uncertainty of confirmation would be zero and the relative uncertainty of the confirmed count $\sqrt{(1/40)} = 0,16$.

ISO 29201:2012(E)

Annex F (normative)

Global approach for determining the operational and combined uncertainties

F.1 General

The leading idea of the original global approach according to ISO/TS 19036:2006^[6] is to estimate the combined uncertainty of the final test results by an experiment based on duplication of the whole analytical process. Several samples of the same kind are studied. To obtain a reliable mean, results of at least 30 samples should be generated over time. The first tentative estimate of the operational uncertainty can be calculated after 10 samples have been studied. The test protocol and the calculations are suitable for a gradual build-up of data.

By appropriate selection of different technicians, equipment, and incubation conditions in the basic experiment the estimate can be made to represent the intralaboratory [equipment + time + operator]-different intermediate reproducibility standard uncertainty, see ISO 5725-3.^[2] Once determined, the uncertainty value is assumed to be a valid estimate for all analyses of the target microorganism in the given type of matrix by the same method. A reassessment is required only following changes to any of the influence factors.

The original global approach runs into difficulties in microbiological analyses whenever the distribution uncertainty is a non-negligible component of variance. As a consequence, the original global design is unsuitable for low counts in general and especially for MPN methods and partial confirmation.

The difficulty with low counts can be overcome by a modification of the original approach. The more stable operational uncertainty component is extracted from the reproducibility standard uncertainty of each sample in the course of the basic experiment. The average (root mean square) operational uncertainty calculated from several specimens of the same type of sample is expected to be stable enough also to represent future analyses. Because the evaluation is based on subtraction, the estimate is imprecise. As a consequence, the values generated when the counts are low can be imprecise to the extreme. Therefore it is advisable to avoid low counts and MPN methods, and not to use partially confirmed counts. This recommendation refers to the *exploratory experiment only*. Once an estimate of operational uncertainty is available, low counts and MPN methods are not a problem. There is no difference in the daily use of the estimates in the global and component approaches. Both can deal with partial confirmation.

When future use of an estimate of the standard uncertainty of a test result is required, the operational uncertainty is reunited with the relevant distribution uncertainty, u_d , to form a combined uncertainty for any given test result, y .

$$u_c^2(y) = u_o^2 + u_d^2 \quad (\text{F.1})$$

where

u_o is the standard operational uncertainty;

u_d is the assumed distribution uncertainty.

It is the task of a global experiment to provide a plausible general estimate for the operational uncertainty.

F.2 Experimental protocol

The design for determining the reproducibility standard uncertainty of the final result in microbiological analyses by the global approach appears in ISO/TS 19036:2006.^[6] The model is the same as corresponding models in chemistry. In microbiology it is a tradition to make the calculations in common logarithms.

26

© ISO 2012 – All rights reserved

ISO 29201:2012(E)

For practical reasons and simplicity of calculations, the recommended experimental unit consists of only two independent analyses of every sample. A large number of similar samples should be studied. A challenge is to create experimental conditions such that the estimate can legitimately be considered an intralaboratory reproducibility standard uncertainty.

According to ISO/TS 19036:2006,^[6] the conditions in the two replicate analyses should be as different as possible and should ideally include as many variations as may be encountered from one day to another within the laboratory, in terms of technicians, batches of culture media and reagents, equipment and time of analysis. "As different as possible" should be interpreted to mean "as few of the technical influence quantities the same" as possible. For each sample, two different operators take one test portion (a subsample from the same laboratory sample), and prepare from it one initial suspension, and analyse it once. It is not necessary that the same two operators study all samples. The two operators should use different equipment and materials for the test.

With at least five operational uncertainty components to consider it is not easy to design an experiment based on two replicates in which all components are varied in a statistically balanced manner.

Variation of influence quantities, such as equipment for homogenization of the initial suspension, position and time in the incubator, and batches of nutrient media and reagents, can only be approximated by arranging a random choice. Even then it is not certain that truly representative variation is achieved. Ideas for randomization of such details can be found in Annex M.

F.3 Calculations

F.3.1 The combined reproducibility standard uncertainty

In this annex, the calculations are made in the common logarithmic scale. For each sample, two analytical results are obtained, one for each operator. An estimate of intralaboratory reproducibility variance can be calculated from the results. Calculation in logarithmic scale ensures that the value of the parameter is not sensitive to contamination level (dilution). Therefore, it can be calculated from the original counts.

The common logarithmic scale is a relative scale of a kind. Nevertheless, in this annex the subscript "rel" is not applied in connection with uncertainty estimates. This is done in order to avoid confusion with other parts of this International Standard, where subscript "rel" indicates standard deviations in natural logarithmic scale. To change the end result in common logarithmic scale to real relative standard uncertainty, conversion to natural logarithms is possible. See examples F.5.1 and F.5.2

From the results of the basic global experiment, the reproducibility standard uncertainty is calculated for every sample.

$$u_{R}^2 = \frac{(\lg n_{c_1} - \lg n_{c_2})^2}{2} \quad (\text{F.2})$$

where

n_{c_1} is the number of colonies in the first replicate;

n_{c_2} is the number of colonies in the second replicate.

The parameter determined for each sample is accepted as an estimate of the relative reproducibility standard variance. For use in further calculations, as presented in the examples below, take care to express the relevant uncertainties (operational, distributional and combined) in the same logarithmic scale.

ISO 29201:2012(E)**F.3.2 The distribution uncertainty**

The intrinsic variability of the determination, in common logarithmic scale, due to particle distribution is estimated for each sample, i , by Equation (F.1)

$$u_{d_i}^2 = \frac{2 \times 0,1886}{n_{c_{1i}} + n_{c_{2i}}} = \frac{0,1886}{\bar{n}_{ci}} \quad (\text{F.3})$$

where \bar{n}_{ci} is the mean count of colonies per plate in sample i .

The arithmetic mean of the sample distribution variances is

$$u_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n u_{d_i}^2}{n} \quad (\text{F.4})$$

where n is the number of samples.

F.3.3 Mean operational uncertainty

Operational uncertainty is estimated by subtracting the mean distributional variance from the mean reproducibility variance, taking care that both are expressed in the common logarithmic scale.

$$u_o^2 = u_R^2 - u_d^2 \quad (\text{F.5})$$

The subtraction can be made individually in each sample, and the mean difference calculated as the last step. Another alternative is to calculate the mean values of u_R^2 and u_d^2 first and make the subtraction last. Both alternatives are illustrated in the example below.

NOTE When the global approach is applied with an MPN method, the average distribution variance is calculated as the mean of the relative variances of the two MPN estimates. See Annex D.

F.4 Combined standard uncertainty of the test result

Once a global estimate of the operational uncertainty for a given sample type is available, it can be used for construction of a combined uncertainty estimate with any new test result by the same method. Combined relative uncertainty of the final test result is calculated according to

$$u_c(y) = \sqrt{u_o^2 + u_d^2} \quad (\text{F.6})$$

where

u_o is the mean relative operational uncertainty for the given sample type and parameter;

u_d is the relative distribution uncertainty (intrinsic variation) of the count.

It is necessary to express u_o and u_d on the same scale of measurement.

The distribution uncertainty is derived without experiments from assumed statistical distributions. In microbiological methods, the value of the parameter depends on the observed count and is different for colony methods and MPN methods (Annex C and Annex D).

NOTE Sometimes microbiological results are confirmed by testing a subset of presumptive colonies. This is termed "partial confirmation". In such instances, the uncertainty of confirmation becomes a major additional component of intrinsic variation and considerably decreases the precision of the combined uncertainty estimate (Annex E).

F.5 Examples

F.5.1 Example 1: Colony count method — Calculation with common logarithms

Several samples were studied independently by two analysts. For each sample, each operator took one test portion (a subsample from the same laboratory sample), and prepared one initial suspension from it, which was analysed once.

Each analyst used dilution blanks and plates of medium from a batch selected randomly and the plates were placed in randomly selected positions in the incubator. The plates were removed for counting after randomly allocated times of incubation. Each analyst read their own plates. The results (colony counts) of six samples are shown in Table F.1.

Table F.1 — Calculation with common logarithms

| Sample No | Dilution ^a | n_{c_1} | n_{c_2} | $\lg n_{c_1}$ | $\lg n_{c_2}$ | u_R^2 | u_d^2 | u_o^2 |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|---------|---------|----------|
| 1 | -4 | 5 | 8 | 0,699 0 | 0,903 1 | 0,020 8 | 0,029 0 | -0,008 2 |
| 2 | -3 | 15 | 11 | 1,176 1 | 1,041 4 | 0,009 1 | 0,014 5 | -0,005 4 |
| 3 | -4 | 11 | 19 | 1,041 4 | 1,278 8 | 0,028 2 | 0,012 6 | 0,015 6 |
| 4 | -6 | 21 | 39 | 1,322 2 | 1,591 1 | 0,036 1 | 0,006 3 | 0,029 8 |
| 5 | -5 | 68 | 45 | 1,832 5 | 1,653 2 | 0,016 1 | 0,003 3 | 0,012 8 |
| 6 | -4 | 151 | 203 | 2,179 0 | 2,307 5 | 0,008 3 | 0,001 1 | 0,007 2 |
| Mean | | | | | | 0,019 8 | 0,011 1 | 0,008 6 |

^a Dilution needs not to be considered when working with logarithms.

NOTE Theoretically, variances should never be negative. However, when an estimate of variance is obtained by subtraction and the experimental variances are based on small numbers of replicates such things can happen.

The relative operational variance in common logarithmic scale is given by $u_o^2 = u_R^2 - u_d^2$.

The final result, the estimate of the mean operational uncertainty, can be obtained in two ways.

- From mean values: $u_o^2 = u_R^2 - u_d^2 = 0,019 8 - 0,011 1 = 0,008 7$ (with this calculation the last column of the table is unnecessary.)
- From the mean of the individual values (last column): mean $u_o^2 = 0,008 6$.

The small difference between the two estimates could be due to the effects of rounding in hand calculations.

Common logarithms are not likely to be utilized in the component approach. Uncertainty estimates are expressed as relative standard uncertainties or percentages. If comparison with uncertainty estimates expressed as relative or ln values is desired, the result of the global analysis, u_o^2 , can be converted to the relative scale by multiplying by 5,302. In this example $u_{o,rel}^2 = 5,302 \times 0,008 6 = 0,045 6$.

Hence, the average relative operational uncertainty from the set of six samples is $u_{o,rel} = \sqrt{0,045 6} = 0,208 \approx 21\%$.

F.5.2 Example 2: Most probable number method — Calculation with common logarithms

Two analysts made independent analyses of coliforms in water samples using an MPN method. The trays were incubated in randomly allocated positions on the incubator shelves and in randomly chosen layers in stacks. The maximum height of stacks was 20. The MPN values, x_1 and x_2 , and their confidence limits, T_0 and T_1 , were obtained from tables provided by the manufacturer. Results of five samples are shown in Table F.2.

ISO 29201:2012(E)

The estimates of relative reproducibility variance are

$$u_{R'}^2 = \frac{(\lg x_1 - \lg x_2)^2}{2} \tag{F.7}$$

where x_1 and x_2 are MPN estimates.

Table F.2 — Calculation with common logarithms

| Sample | x_1 | $T_{0,1}$ | $T_{1,1}$ | x_2 | $T_{0,2}$ | $T_{1,2}$ | $u_{R'}^2$ | u_{d1}^2 | u_{d2}^2 | u_d^2 | u_c^2 |
|--------|-------|-----------|-----------|-------|-----------|-----------|------------|------------|------------|---------|----------|
| 1 | 42,9 | 29,7 | 62,5 | 53,1 | 37,5 | 76,2 | 0,004 3 | 0,006 8 | 0,006 2 | 0,006 5 | -0,002 2 |
| 2 | 22,2 | 14,1 | 35,2 | 28,8 | 19,0 | 43,9 | 0,006 4 | 0,010 3 | 0,008 6 | 0,009 4 | -0,003 1 |
| 3 | 25,4 | 16,5 | 39,4 | 27,1 | 17,7 | 41,6 | 0,000 4 | 0,009 3 | 0,009 0 | 0,009 1 | -0,008 7 |
| 4 | 23,8 | 15,3 | 37,3 | 45,3 | 31,5 | 65,6 | 0,039 1 | 0,009 7 | 0,006 6 | 0,008 2 | 0,030 9 |
| 5 | 65,9 | 47,2 | 93,7 | 50,4 | 35,4 | 72,5 | 0,006 8 | 0,005 8 | 0,006 3 | 0,006 1 | 0,000 7 |
| Mean | | | | | | | 0,011 4 | | | 0,007 9 | 0,003 5 |

$$u_{d1}^2 = \left(\frac{\lg T_{0,1} - \lg T_{1,1}}{3,92} \right)^2 ; u_d^2 = \frac{u_{d1}^2 + u_{d2}^2}{2} ; u_c^2 = u_{R'}^2 - u_d^2 \tag{F.8}$$

$$u_{d2}^2 = \left(\frac{\lg T_{0,2} - \lg T_{1,2}}{3,92} \right)^2$$

The relative common logarithmic operational variance is the difference between the means of $u_{R'}^2$ and u_d^2 : $u_c^2 = 0,0114 - 0,0079 = 0,0035$. An alternative is to calculate the mean of the individual differences (last column). Its square root is the global estimate of the relative operational uncertainty $u_c = \sqrt{0,0035} = 0,0592$.

Conversion of the operational standard uncertainty to natural logarithmic scale makes it more expressive: $0,059 \times 2,303 = 0,136 = 13,6\%$.

F.6 Calculating the combined uncertainty of a new test result

For a colony count result, n_c , the combined relative standard uncertainty in common logarithmic scale is

$$u_c(y) = \sqrt{\frac{0,1886}{n_c} + u_c^2} \tag{F.9}$$

For an MPN result, with upper and lower 95 % CI given, T_1, T_0 , the combined relative standard uncertainty in common logarithmic scale is

$$u_c(y) = \sqrt{\left(\frac{\lg T_1 - \lg T_0}{3,92} \right)^2 + u_c^2} \tag{F.10}$$

F. ■ Documento digital – Folha de cálculo de Legionella

Calculos de Legionella - Excel

Ver

Rever

Dados

Fórmulas

Esquema de Página

Esquema

Esquema de Página

Esquema de Página Personalizadas

Normal

Pré-visualização de Esquema

Quebras de Página de Página Personalizadas

Vistas

Vistas de Livro

Mostrar

Linhas de Grealha

Cabeçalhos

Barra de Fórmulas

Régua

Zoom

Zoom para Seleção

Zoom 100%

Zoom

Zoom 100%

Zoom para Seleção

Nova Janela

Dispor Janelas

Fixar Janelas

Dividir Janelas

Ocultar Janelas

Mostrar Janelas

Reparar a Posição da Janela

Deslocamento Sincronizado

Ver Lado a Lado

Mudar de Janela

Macros

Partilhar

Pronto

Folha1

Folha2

Folha3

90%

CL13

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

$N_{ufc/L} = \text{número de Legionella em ufc/L}$

$n = \text{número de colónias} = \frac{\text{colónias positivas}}{\text{colónias confirmadas}} \times \text{total de colónias contadas na placa}$

$V_c = \text{Volume total analisado, mL}$

$V_r = \text{Volume de referência (normalmente 1000 mL)}$

$V_e = \text{Volume final de concentrado, mL}$

$V = \text{Volume inoculado na placa ou placas do mesmo meio de cultura, mL}$

$F = \text{Factor de Diliuição}$

Amostra directa

$N_{ufc/L} = \frac{n}{V_c} \times V_r$

| | | | | | |
|------------------|---|---|----|---|------|
| n= | 3 | x | 22 | = | 13,2 |
| V _c = | 5 | | | | |

Amostra concentrada

$N_{ufc/L} = \frac{n \times V_e}{V \times V_c} \times V_r$

| | | | | | |
|--------------------|-------|--|--|--|--|
| n= | 1 | | | | |
| V _c = | 10 | | | | |
| V _e = | 0,1 | | | | |
| V | 10 | | | | |
| V _r = | 1000 | | | | |
| N _{ufc/L} | 10000 | | | | |

Amostra diluída

$N_{ufc/L} = \frac{n \times V_r}{V_{dil}} \times F$

| | | | | | |
|--------------------|--------|--|--|--|--|
| n= | 1 | | | | |
| V _r = | 1000 | | | | |
| V _{dil} = | 0,1 | | | | |
| F | 10 | | | | |
| N _{ufc/L} | 100000 | | | | |