

Da tipagem clássica à genómica: reforço da vigilância de *Legionella pneumophila* com uma nova metodologia

From classical typing to genomics: Strengthening the surveillance of Legionella pneumophila with a new methodology

Vítor Borges¹, Verónica Mixão¹, João Rodrigues², Raquel Rodrigues³, Jorge Machado⁴, João Paulo Gomes¹

vitor.borges@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genómica e Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Laboratório Nacional de Referência para Legionella. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Laboratório de Microbiologia de Águas. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(4) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Neste artigo de revisão é abordada a evolução da tipagem molecular de *Legionella pneumophila*, bactéria responsável pela Doença dos Legionários. São discutidas as limitações dos métodos convencionais, frequentemente insuficientes para estabelecer de forma robusta ligações entre casos humanos e fontes ambientais de contaminação, o que tem dificultado a deteção e subsequente investigação de surtos. Revisita-se a aplicação da sequenciação do genoma total (WGS) de *L. pneumophila* em Portugal e as suas vantagens, destacando-se o recente desenvolvimento de uma nova metodologia de análise de dados de WGS (através da bioinformática), que visa reforçar a deteção de surtos, a identificação de fontes de infeção e a avaliação de risco, apoiando o controlo atempado e efetivo de ameaças para a saúde pública a nível local e transfronteiriço.

_Abstract

This article reviews the evolution of molecular typing of *Legionella pneumophila*, the bacterium responsible for Legionnaires' disease. The limitations of conventional methods are discussed, as they are often insufficient to robustly link human cases to environmental sources of contamination, which may hinder outbreak detection and subsequent investigation. The application of whole-genome sequencing (WGS) of *L. pneumophila* in Portugal is revisited, highlighting its advantages, as well as the recent development of a novel typing approach for bioinformatics analysis of WGS data. This approach aims to strengthen outbreak detection, source attribution, and risk assessment, ultimately supporting more timely and effective control of public health threats at local and cross-border levels.

_Doença dos Legionários: introdução à vigilância laboratorial

A Doença dos Legionários é uma forma grave de pneumonia causada por bactérias Gram-negativas do género *Legionella*, particularmente *Legionella pneumophila*, as quais estão amplamente presentes no ambiente, sobretudo em ambientes aquáticos naturais e solos húmidos (1-5). A infeção humana

ocorre principalmente por via respiratória, através da inalação de aerossóis contendo gotículas de água contaminada, podendo, mais raramente, resultar da aspiração pulmonar de água contendo a bactéria (1-5). O quadro clínico da doença caracteriza-se por febre, tosse e mialgias, podendo também incluir cefaleias, dispneia, expetoração, anorexia, náuseas e diarreia (1-5). A letalidade varia aproximadamente entre 5% e 15%, podendo ultrapassar 40% em casos mais graves ou em indivíduos com fatores de risco associados (4,6,7). Entre estes destacam-se a idade avançada, o tabagismo, a imunossupressão e a presença de doenças crónicas, como diabetes ou patologias pulmonares. A crescente incidência desta doença tem sido detetada por vários sistemas de vigilância internacionais e notificada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e pelo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), o que reforça a importância da vigilância epidemiológica e laboratorial contínua (7,8).

Entre as fontes ambientais associadas à ocorrência de doença humana destacam-se, sobretudo, sistemas aquáticos artificiais, como instalações de aquecimento de água (por exemplo, cilindros e caldeiras, bem como torneiras e chuveiros), sistemas de ar condicionado com recirculação de água, torres de arrefecimento, dispositivos de evaporação e humidificadores (1,9). Para além da sua ampla distribuição ambiental, a *L. pneumophila* possui uma elevada capacidade de adaptação e sobrevivência numa grande amplitude de condições de temperatura e humidade. A sua capacidade de formar biofilmes estruturados em superfícies aquáticas artificiais constitui um fator determinante para a sua persistência prolongada nestes sistemas, dificultando a sua eliminação e aumentando o risco de exposição

humana (9-11). Como consequência, embora os casos de Doença dos Legionários ocorram maioritariamente de forma esporádica, podem também ocorrer surtos devido à exposição de indivíduos a uma mesma fonte ambiental (3,5,12-14). Historicamente, muitos dos grandes surtos desta doença têm sido associados a sistemas complexos de água, tais como torres de arrefecimento industriais (12-14).

Em Portugal, a Doença dos Legionários foi identificada pela primeira vez em 1979 e passou a integrar a lista de doenças de declaração obrigatória em 1999 (15). Em 2004, foi implementado o Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários, que articula investigação epidemiológica, ambiental e laboratorial (16,17). Neste contexto, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) coordena a componente laboratorial da vigilância, sendo responsável pela caracterização e comparação genética de estirpes humanas, no âmbito do Laboratório Nacional de Referência (LNR) do Departamento de Doenças Infeciosas, e de estirpes ambientais analisadas pelo Laboratório de Microbiologia de Águas do Departamento de Saúde Ambiental. Adicionalmente, o INSA integra atualmente o consórcio do Laboratório de Referência da União Europeia para *Legionella* (EURL-PH-LEGI) (18), contribuindo para o desenvolvimento e harmonização de metodologias laboratoriais e de vigilância a nível europeu. Esta integração permite apoiar a investigação epidemiológica e identificar potenciais fontes ambientais associadas a casos esporádicos ou surtos, contribuindo, assim, para a implementação atempada de medidas de controlo e prevenção. Ao longo das últimas duas décadas, vários surtos de Doença dos Legionários foram identificados em Portugal (14,19), com particular destaque para o ocorrido em 2014 na região de Vila Franca de Xira, um dos maiores surtos registados mundialmente (14,20). Este surto originou mais de 400 casos de doença e 14 mortes, tendo sido uma torre de arrefecimento industrial apontada como provável fonte de contaminação (14,20,21). Acresce que este surto constituiu também um marco científico, tendo sido a primeira vez em Portugal que a sequenciação do genoma total (*Whole-Genome Sequencing*, WGS) de *L. pneumophila* foi aplicada na investi-

gação e resolução de um surto. Esta abordagem laboratorial permitiu confirmar a ligação genética entre isolados humanos e ambientais, bem como identificar características genéticas potencialmente associadas à persistência e evolução da estirpe no meio ambiente (20). No contexto deste surto foi ainda descrito um caso possível de transmissão pessoa-a-pessoa da doença, identificado através da análise comparativa do genoma completo de isolados bacterianos provenientes de dois doentes com contacto próximo e em que um deles não foi exposto à fonte de contaminação ambiental na região de Vila Franca de Xira (22). Estudos posteriores demonstraram que a estirpe responsável pelo surto de 2014, identificada como *L. pneumophila* ST1905, se manteve no ambiente ao longo dos anos seguintes, tendo vindo a ser associada a novos casos de doença em diferentes localizações geográficas, evidenciando a sua capacidade de dispersão e persistência para além do epicentro inicial do surto (23).

Métodos convencionais de tipagem molecular

A investigação de surtos de Doença dos Legionários depende da integração de dados epidemiológicos, ambientais e laboratoriais, sendo a caracterização (tipagem) e comparação microbiológica das estirpes um elemento essencial para estabelecer ligações entre casos humanos e potenciais fontes de infeção (24). Durante mais de duas décadas, o método de tipagem mais utilizado para *L. pneumophila* foi o *Sequence-Based Typing* (SBT) (25,26), uma variante da metodologia de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) que analisa sete genes para definir o designado *Sequence Type* (ST) de um dado isolado bacteriano (27). Desenvolvido no início dos anos 2000 pelo *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Legionella Infections* (ESGLI), o SBT tornou-se o método de referência para a caracterização genética de isolados desta bactéria, permitindo identificar isolados com o mesmo ST e estabelecer semelhanças genéticas entre eles de suporte à investigação epidemiológica de surtos (28). Para amostras clínicas, uma das principais vantagens da técnica SBT é a possibilidade de gerar informação genética relevante mesmo na ausência de isolamento bacteriano por cultura, um processo frequentemente desafiante

para *L. pneumophila*, moroso e com taxas de sucesso limitadas (29). Esta característica do SBT continua a ser particularmente útil e vantajosa em contexto de investigação de surto, quando a obtenção de respostas rápidas é essencial para apoiar a implementação de medidas de saúde pública. Contudo, a experiência acumulada ao longo dos anos demonstrou que este método apresenta limitações importantes, uma vez que uma proporção significativa de casos está associada a um número relativamente reduzido de STs predominantes, o que limita a sua capacidade para distinguir estirpes sem ligação epidemiológica, mas pertencentes ao mesmo ST (30,31). Acresce que, o SBT é uma metodologia tecnicamente trabalhosa e apresenta baixo poder discriminatório para diferenciar isolados geneticamente muito próximos, o que limita a sua utilidade em análises epidemiológicas de maior resolução, como estudos mais detalhados de persistência ambiental ou na investigação de persistência de casos associados à mesma fonte de infeção (23,30,31).

_Sequenciação do genoma total (WGS)

O desenvolvimento e aumento do acesso à tecnologia de WGS abriu novas possibilidades para a vigilância laboratorial e epidemiológica de *L. pneumophila*, oferecendo um poder discriminatório significativamente superior ao das metodologias convencionais. Ao dar informação ao nível do genoma completo, e não apenas baseada em sete genes como é o caso do SBT, esta abordagem permite estabelecer ligações mais precisas entre isolados humanos e ambientais, melhorando a capacidade de identificação de fontes de infeção e apoiando a implementação de medidas de controlo durante surtos (20,23,32,33). No entanto, a implementação e aplicação da WGS na rotina laboratorial continua a apresentar desafios operacionais significativos, especialmente no que diz respeito à análise bioinformática do enorme volume de informação produzido pelas tecnologias de sequenciação de nova geração (*Next-Generation Sequencing*, NGS). Por exemplo, a análise comparativa de isolados baseadas em *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (*i.e.*, “mutações”) é uma abordagem que oferece uma elevada resolução. Contudo, além de reque-

rer fluxos de análise bioinformática complexos e dependentes da escolha de genomas de referência, esta abordagem é menos adequada para a comparação sistemática de grandes coleções com uma grande diversidade de isolados, como é o caso das coleções nacionais de *L. pneumophila*. Assim, a aplicação de uma abordagem de SNPs em *L. pneumophila* (e outras bactérias) tem estado reservada à investigação num contexto de surto ou identificação de fontes ambientais onde o número de isolados é reduzido e a sua diversidade é menor, não sendo aplicada à vigilância contínua, que requer uma visão mais ampla de todas as estirpes em circulação independentemente da sua proximidade genética. Neste contexto, a análise por *core-genome* MLST (cgMLST), que é uma metodologia conceptualmente semelhante ao SBT, mas baseada num maior número de genes, pois assenta na utilização de dados de WGS, apareceu como alternativa. Esquemas de cgMLST previamente desenvolvidos para *L. pneumophila*, como o esquema de 1521 genes (32) ou a alternativa baseada em 50 genes (33), contribuíram para melhorar a resolução em alguns contextos epidemiológicos. Ainda assim, estes esquemas apresentam limitações relacionadas com a representatividade genómica, a dependência de plataformas específicas ou a insuficiente capacidade discriminatória (32-34). Estas limitações evidenciam a necessidade de desenvolver abordagens genómicas mais robustas, escaláveis e harmonizadas que possam ser aplicadas de forma consistente na vigilância laboratorial continuada.

_Nova metodologia na vigilância genómica

Neste contexto, foi recentemente estabelecido o grupo de trabalho internacional *Legionella International Typing* (LIT), com o objetivo de desenvolver e disponibilizar um novo esquema de tipagem genómica para *L. pneumophila* baseado numa abordagem combinada de *core-* e *whole-genome* MLST (cg/wgMLST). Este trabalho, recentemente disponibilizado à comunidade científica (35), foi co-liderado pelo INSA em colaboração com o LNR de França (*Hospices Civils de Lyon*) e o CDC dos Estados Unidos da América, e resultou no desenvolvimento de um esquema cg/wgMLST baseado

na diversidade genética de mais de 9600 genomas de *L. pneumophila*, capaz de analisar rapidamente o perfil genético de 4707 genes desta bactéria. Esta abordagem permite capturar uma maior diversidade genómica da espécie e melhorar significativamente a resolução na comparação entre isolados bacterianos. Uma característica central deste sistema é a sua arquitetura em dois níveis: um esquema cgMLST estático (2009 genes partilhados por quase toda a população de *L. pneumophila*), adequado para comparação padronizada em cenários de vigilância laboratorial, e um componente wgMLST dinâmico que permite análises de elevada resolução em *clusters* (grupos de isolados identificados por cgMLST como geneticamente próximos) específicos de potencial interesse epidemiológico (35). Nesta análise dinâmica, o número de genes usado para comparação dos isolados é ampliado, pois, além dos 2009 genes, são também considerados os restantes genes do esquema que, apesar de não estarem presentes na grande maioria da população da espécie, estão presentes em todos os isolados do *cluster* (35). Esta estratégia de “ampliação” genómica (“zoom-in”) é automatizada com o recurso à ferramenta ReporTree (36), na qual a análise inicial identifica potenciais *clusters* de estirpes relacionadas, que são posteriormente investigados pela inclusão automática de genes específicos, aumentando o poder discriminatório. A aplicação do esquema LIT demonstrou ganhos substanciais na capacidade de discriminar isolados epidemiologicamente relacionados, prevendo-se que venha permitir o reforço da capacidade laboratorial para deteção de surtos, identificação de fontes ambientais e rastreio de cadeias de transmissão (35).

Para além do aumento de resolução, o novo esquema cg/wg-MLST foi concebido para facilitar a sua implementação em redes de vigilância internacionais. A compatibilidade com ferramentas bioinformáticas amplamente utilizadas, como o *software* chewBBACA (37) e ReporTree (36), e a disponibilização pública do esquema acompanhado de *guidelines* de implementação e utilização (38) contribuem para promover a harmonização das metodologias de análise entre laboratórios a nível local e global. Esta padronização é particularmente relevante num contexto em que a vigilância baseada em WGS se

torna progressivamente central para a resposta a surtos de Doença dos Legionários. A adoção de abordagens genómicas harmonizadas permitirá reduzir disparidades na análise e interpretação de dados entre diferentes instituições e países, facilitando a comparação internacional de isolados e o rastreio de *clusters* transfronteiriços. Por fim, apesar destes importantes avanços na área da análise de dados genómicos (bioinformática), a implementação de WGS na vigilância de *L. pneumophila* continua a enfrentar desafios, nomeadamente a dependência do isolamento bacteriano em cultura. Neste contexto, o investimento futuro na adoção de abordagens que permitam a realização de WGS diretamente a partir de amostras biológicas, já implementadas com sucesso no INSA para outras bactérias patogénicas (39-42), constitui um passo natural para continuar a reforçar e expandir a vigilância integrada da Doença dos Legionários, promovendo uma identificação mais rápida e fiável das fontes de infeção e contribuindo para respostas de saúde pública mais efetivas.

Referências bibliográficas:

- (1) Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct;14(10):1011-21. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70713-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70713-3)
- (2) Mondino S, Schmidt S, Rolando M, et al. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of Legionella. *Annu Rev Pathol*. 2020 Jan 24;15:439-66. Epub 2019 Oct 28. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742>
- (3) Yao XH, Shen F, Hao J, et al. A review of Legionella transmission risk in built environments: sources, regulations, sampling, and detection. *Front Public Health*. 2024 Jul 26;12:1415157. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1415157>
- (4) Pareek A, Singhal R, Pareek A, et al. Global surge of Legionnaires' disease in 2024: urgent call for heightened awareness and preparedness. *Lancet Microbe*. 2025 Apr;6(4):101031. Epub 2024 Nov 26. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.101031>
- (5) Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jul;15(3):506-26. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
- (6) European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease [Internet]. [consult. 2026-03-19]. <https://www.ecdc.europa.eu/en/legionnaires-disease>
- (7) European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2023. Stockholm: ECDC, 2026. 2026. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/LE-GI_AER_2023_Report.pdf
- (8) Barskey AE, Derado G, Edens C. Rising Incidence of Legionnaires' Disease and Associated Epidemiologic Patterns, United States, 1992-2018. *Emerg Infect Dis*. 2022 Mar;28(3):527-38. <https://doi.org/10.3201/eid2803.211435>
- (9) Jules M, Buchrieser C. Legionella pneumophila adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett*. 2007 Jun 19;581(15):2829-38. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.026>

artigos breves_ n. 1

- (10) Hilbi H, Hoffmann C, Harrison CF. Legionella spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environ Microbiol Rep.* 2011 Jun;3(3):286-96. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00247.x>
- (11) Abu Khweek A, Amer AO. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by Legionella pneumophila. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Feb 27;8:38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00038>
- (12) Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* 1977 Dec 1;297(22):1189-97. <https://doi.org/10.1056/NEJM1977120129722201>
- (13) García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, et al. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug;9(8):915-21. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030337>
- (14) Shivaji T, Sousa Pinto C, San-Bento A, et al. A large community outbreak of Legionnaires disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Euro Surveill.* 2014 Dec 18;19(50):20991. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.50.20991>
- (15) Portaria n.º 1071/98, de 31 de dezembro. DR n.º 301/1998, Série I-B, 1998-12-31, pp. 7381-82. Aprova a tabela das doenças de declaração obrigatória.
- (16) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa n.º 05/DEP, de 22 de abril de 2004. Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários: Notificação Clínica e Laboratorial de Casos. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-5dep-de-22042004-pdf.aspx>
- (17) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa n.º 06/DT, de 22 de abril de 2004. Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários: Investigação Epidemiológica. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-6dt-de-22042004-pdf.aspx>
- (18) European Commission. EU Reference Laboratories for public health. [Internet] [consult. 2026/03/19] https://health.ec.europa.eu/health-security-and-infectious-diseases/surveillance-and-early-warning/eu-reference-laboratories-public-health_en
- (19) Freitas IL, Branco AR, Silva F, et al. Clinical Insights From Legionnaires' Disease: A Retrospective Analysis of Severe Cases on Account of a Cluster. *Cureus.* 2025 Aug 29;17(8):e91237. <https://doi.org/10.7759/cureus.91237>
- (20) Borges V, Nunes A, Sampaio DA, et al. Legionella pneumophila strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Sci Rep.* 2016 May 19;6:26261. <https://doi.org/10.1038/srep26261>
- (21) Russo A, Gouveia CM, Soares PMM, et al. The unprecedented 2014 Legionnaires' disease outbreak in Portugal: atmospheric driving mechanisms. *Int J Biometeorol.* 2018 Jul;62(7):1167-79. <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1520-8>
- (22) Correia AM, Ferreira JS, Borges V, et al. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med.* 2016 Feb 4;374(5):497-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1505356>
- (23) Manageiro V, Borges V, Rodrigues R, et al. Recurrence, Microevolution, and Spatiotemporal Dynamics of Legionella pneumophila Sequence Type 1905, Portugal, 2014-2022. *Emerg Infect Dis.* 2024 May;30(5):1022-25. <https://doi.org/10.3201/eid3005.231383>
- (24) Lück C, Fry NK, Helbig JH, et al. Typing methods for legionella. *Methods Mol Biol.* 2013;954:119-48. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-161-5_6
- (25) Gaia V, Fry NK, Afshar B, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol.* 2005 May;43(5):2047-52. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005>
- (26) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, et al. Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminidase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing Legionella pneumophila serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):1965-68. <https://doi.org/10.1128/JCM.00261-07>
- (27) Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:561-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>
- (28) Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):95-133. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-14>
- (29) Quero S, Párraga-Niño N, Sabria M, et al. Legionella SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool. *Sci Rep.* 2019 Jan 24;9(1):623. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36924-w>
- (30) Ricci ML, Fillo S, Ciammaruconi A, et al. Genome analysis of Legionella pneumophila ST23 from various countries reveals highly similar strains. *Life Sci Alliance.* 2022 Mar 2;5(6):e202101117. <https://doi.org/10.1038/lsa.202101117>
- (31) Timms VJ, Rockett R, Bachmann NL, et al. Genome Sequencing Links Persistent Outbreak of Legionellosis in Sydney (New South Wales, Australia) to an Emerging Clone of Legionella pneumophila Sequence Type 211. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Feb 14;84(5):e02020-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02020-17>
- (32) Moran-Gilad J, Prior K, Yakunin E, et al. Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires' disease incidents. *Euro Surveill.* 2015 Jul 16;20(28):21186. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.28.21186>
- (33) David S, Mentasti M, Tewolde R, et al. Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for Legionella pneumophila with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. *J Clin Microbiol.* 2016 Aug;54(8):2135-48. <https://doi.org/10.1128/jcm.00432-16>
- (34) Echahidi F, Park S, Meghraoui A, et al. Comparison of whole genome sequencing typing tools for the typing of Belgian Legionella pneumophila outbreaks isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2025 Mar;44(3):597-607. Epub 2024 Dec 21. <https://doi.org/10.1007/s10096-024-05013-4>
- (35) Mixão V, Ginevra C, Jacqueline C, et al. Advancing Legionella pneumophila genomic surveillance with a high-resolution cg/wgMLST schema for outbreak detection and investigation. *medRxiv* 2026.02.18.26346554 (preprint). <https://doi.org/10.64898/2026.02.18.26346554>
- (36) Mixão V, Pinto M, Sobral D, et al. ReporTree: a surveillance-oriented tool to strengthen the linkage between pathogen genetic clusters and epidemiological data. *Genome Med.* 2023 Jun 15;15(1):43. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01196-1>
- (37) Silva M, Machado MP, Silva DN, et al. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microb Genom.* 2018 Mar;4(3):e000166. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000166>
- (38) Mixão V, Ginevra C, Jacqueline C, et al. Legionella pneumophila LIT cg/wgMLST schema and necessary resources for its local implementation (Version v1, Feb 18, 2026). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.17871974>
- (39) Pinto M, Borges V, Antelo M, et al. Genome-scale analysis of the non-cultivable Treponema pallidum reveals extensive within-patient genetic variation. *Nat Microbiol.* 2016 Oct 17;2:16190. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.190>
- (40) Macedo R, Isidro J, Ferreira R, et al. Molecular Capture of Mycobacterium tuberculosis Genomes Directly from Clinical Samples: A Potential Backup Approach for Epidemiological and Drug Susceptibility Inferences. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 2;24(3):2912. <https://doi.org/10.3390/ijms24032912>
- (41) Isidro J, Escudero R, Luque-Larena JJ, et al. Strengthening the genomic surveillance of Francisella tularensis by using culture-free whole-genome sequencing from biological samples. *Front Microbiol.* 2024 Jan 5;14:1277468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1277468>
- (42) Borges V, Cordeiro D, Salas AI, et al. Chlamydia trachomatis: when the virulence-associated genome backbone imports a prevalence-associated major antigen signature. *Microb Genom.* 2019 Nov;5(11):e000313. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000313>