

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Detecção de bactérias do gênero *Legionella* em amostras de água provenientes de sistemas de ar condicionado

Helder Yudji Etto

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública-USP para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Saúde Ambiental
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Pepe Razzolini.

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Detecção de bactérias do gênero *Legionella* em amostras de água provenientes de sistemas de ar condicionado

Helder Yudji Etto

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Público-USP para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Saúde Ambiental
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Pepe Razzolini.

**São Paulo
2009**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Dedicatória

A minha querida Joyce;
Aos meus queridos Pais, Luiz e Thereza;
e minhas irmãs Leina e Mayra.

Agradecimentos

Expresso minha gratidão a todos que colaboraram para a realização deste trabalho:

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio

À Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Pepe Razzolini, minha orientadora, por ser uma companhia constante, paciente e verdadeira durante esse longo percurso de aprendizado e crescimento profissional, mas acima de tudo pessoal. Agradeço sinceramente pela amizade e carinho que me ajudaram a superar momentos difíceis e a tomar decisões importantes.

Às Dr^a. Maria Inês Zanoli Sato e a Dr^a. Elayse Maria Hachich da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB, por ceder as cepas de *Legionella pneumophila* essenciais para a realização deste trabalho.

À Bióloga Francisca Alzira dos Santos Peternella, do Departamento de Saúde Ambiental pelos ensinamentos e auxílio nos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

À Dr^a. Solange Martone Rocha do Departamento de Saúde Ambiental pelo auxílio nos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

À Dra Elayse Maria Hachich e ao Prof. Dr Glavur Rogério Matté pelas valiosas sugestões.

Às estagiárias do Departamento de Saúde Ambiental, Veridiana Karmman Bastos, Heloisa de Luca e Thais Filomena Silva dos santos, pelo apoio e incentivo á realização deste trabalho.

Resumo

Etto HY. Detecção de bactérias do gênero *Legionella* em amostras de água provenientes de sistemas de ar condicionado [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.

Introdução: Destaca-se a importância dos organismos do gênero *Legionella* como agentes causadores de doenças do aparelho respiratório como a legionelose ou doença do Legionário, e ainda de um controle na manutenção adequada de sistemas de ar condicionado, uma vez que estes foram identificados como ambientes favoráveis à proliferação desses microrganismos. **Objetivo:** Devido à importância de bactérias do gênero *Legionella* como agentes causadores de doenças, e um crescente número de casos de legionelose relacionados à permanência em ambientes fechados, este estudo teve como objetivo determinar a presença de *Legionella* em águas de bandejas de sistemas de ar condicionado. **Métodos:** Foram realizadas análises de amostras de água provenientes de bandejas de ar condicionado de dois hospitais, uma instituição de ensino superior e um centro comercial, totalizando 41 amostras. Volumes de 1L das amostras coletadas foram concentrados em membrana, seguida de tratamento ácido. Alíquotas das amostras tratadas e não tratadas com ácido, foram então inoculadas em meio Agar BCYE- α , com e sem adição de antibióticos. As cepas isoladas foram submetidas a teste sorológico para identificação. **Resultados:** Das amostras analisadas, 4 (9,5%) apresentaram resultado positivo para *Legionella sp.*; uma no centro comercial e três em um dos hospitais estudados. Os isolados foram submetidos a teste sorológico, sendo um identificado como *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 e três como seis prováveis espécies: *L. longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*. **Conclusão:** Os resultados deste estudo comprovam a presença de *Legionella sp.* nos sistemas de ar condicionado pesquisados, sendo observada maior frequência dos isolados em amostras analisadas oriundas dos hospitais. Os resultados demonstraram a importância e a necessidade de planos de monitoramento em sistemas de

ar condicionado como medida preventiva à colonização por organismos patogênicos nesses sistemas e dessa forma proteger a saúde dos ocupantes e usuários de ambientes climatizados artificialmente.

Descritores: *Legionella*, água, sistemas de ar condicionado

Abstract

Etto HY. Detection of bacteria genus *Legionella* in water samples of air-conditioning systems [master degree] São Paulo: School of Public Health-USP; 2009.

Introduction: It highlights the importance of organisms' genus *Legionella* as responsible for diseases of the respiratory system such as legionellosis or Legionnaires' disease, and a control on proper maintenance of air conditioning systems, as these were identified as favorable environment for the proliferation of these microorganisms. **Objective:** Due to the importance of *Legionella* as causative agents of disease and a growing number of cases of legionellosis related to stay indoors, this study aimed to determine the presence of *Legionella* in water samples from air-conditioning systems.

Methods: We performed analysis of samples of water from trays of air-conditioning systems in two hospitals, a university and a trade center, totaling 41 samples. One liter volumes of water samples were concentrated on membrane, followed by acid treatment. Aliquots of the sample treated and not treated with acid, were inoculated on BCYE- α agar medium, with and without added antibiotics. The strains were subjected to serological identification. **Results:** Out of the samples analyzed, 4 (9.5%) were positive for *Legionella* sp.; one in a trade center and three in one of the hospitals. Isolates were submitted to serological testing, one identified as *Legionella pneumophila* serogroup 1 and three as probable six species: *L. longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L. gormanii*, *L. jordan*, *L. micdadei*, *L. anise*.

Conclusion: The results confirm the presence of *Legionella* sp. in air conditioning systems studied. It was observed a higher frequency in isolates from hospitals. The results demonstrated the importance and necessity of monitoring plans in air-conditioning systems as a preventive measure to colonization by pathogens in these systems and protect the health of occupants and users of these buildings.

Descriptors: *Legionella*, water, air-conditioning systems

ÍNDICE

1 Introdução	13
2 Referencial Teórico	16
2.1 Características da Família Legionellaceae	16
2.2 Ecologia de <i>Legionella</i> spp.	18
2.3 Importância Clínica	20
2.4 Epidemiologia e ocorrência no ambiente	23
2.5 Ocorrência de <i>Legionella</i> sp.no Brasil	28
2.6 Detecção de <i>Legionella</i> spp.	30
2.7 Controle de <i>Legionella</i> spp	33
3 Legislação	36
4 Objetivos	38
4.1 Objetivo Geral	38
4.2 Objetivo Especifico	38
5 Material e Métodos	39
5.1 Amostra e Amostragem	39
5.2 Isolamento de bactérias do gênero <i>Legionella</i>	43
5.3 Contagem de bactérias heterotróficas	49
5.4 Avaliação do desempenho método	50
5.4.1 Procedimentos	51
5.5 Parâmetros Físico-Químicos	52
6 Resultados	54
6.1 Ocorrência de <i>Legionella</i> sp.	54
6.2 Bactérias heterotróficas	57
6.3 Parâmetros físico-químico	61
6.4 Avaliação do desempenho do método de recuperação de <i>Legionella pneumophila</i>	65
7 Discussão	67
7.1 Ocorrência de <i>Legionella</i> sp.	67
7.2 Avaliação do desempenho do método	72
8 Conclusões	73
9 Referências bibliográficas	74

Anexos	88
Anexo 1 Instruções da Health Protection Agency - HPA, para manutenção e controle de lentes de contato	89
Anexo 2 Meios de cultura e reagentes	93
Anexo 3 Resultados obtidos nas análises das amostras de água	97
Anexo 4 Apresentação do trabalho sob a forma de pôster no 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica	100

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática do processo de infecção de uma célula por <i>Legionella sp.</i>	21
Figura 2: Dados de um levantamento epidemiológico realizado por EWGLI - <i>European Working Group of Legionnaires Infection</i> no período de 1987 a junho de 2008 (EWGLW-2008)	24
Figura3: Sistema de ar condicionado localizado no centro comercial (CC)	40
Figura 4: Sistema de ar condicionado localizado na instituição de ensino superior (IES)	41
Figura 5: Sistema de ar condicionado localizado no hospital 1- HO1(M1)	41
Figura 6: Sistema de ar condicionado localizado no hospital 1 - HO1(M2)	42
Figura 7: Sistema de ar condicionado localizado no hospital 2 (HO-2)	42
Figura 8: Representação esquemática do processo de concentração por filtração em membrana e isolamento de organismos do gênero <i>Legionella</i>	45
Figura 9: Colônias de <i>Legionella sp.</i> em meio seletivo BCYE- α	46
Figura 10: Teste de látex para identificação de <i>Legionella sp.</i> Oxoid®	47
Figura 11: Reação observada no teste de Látex Oxoid® para identificação de <i>Legionella sp</i>	48
Figura 12: Porcentagem de amostras positivas para <i>Legionella sp.</i> nas amostras de água coletadas de sistemas de ar condicionado em quatro instituições localizadas no município de São Paulo no período de agosto de 2007 a julho de 2008	54
Figura 13: Concentração de bactérias heterotróficas nas amostras de água analisadas por ponto de amostragem	58
Figura 14: Variação de temperatura da água nos pontos de coleta	62

Lista de Tabelas

Tabela 1: Detecção e identificação de <i>Legionella</i> sp. segundo pontos de amostragem	55
Tabela 2: Concentração de bactérias heterotróficas e <i>Legionella</i> sp	60
Tabela 3: Taxa de recuperação de <i>Legionella pneumophila</i> , com inóculo de 0,1mL	65
Tabela 4: Taxa de recuperação de <i>Legionella pneumophila</i> , com inóculo de 0,5mL	66

Lista de Quadros

Quadro 1: Espécies do gênero <i>Legionella</i> e possível associação com casos clínicos	22
--	----

1- INTRODUÇÃO

A qualidade do ar pode ser considerada como um importante fator relacionado à saúde e bem estar das pessoas. Dessa forma, questões relacionadas à melhoria da qualidade do ar são relevantes para se alcançar boas condições de saúde.

Desde as décadas de 1960 e 1970, observou-se um número cada vez maior de pessoas trabalhando em ambientes fechados como escritórios e edifícios comerciais e na medida em que esses prédios cresciam em tamanho para comportar o crescente número de usuários, também foram sendo desenvolvidos sistemas de climatização e ventilação, com o intuito de se obter um ambiente mais agradável a seus ocupantes e protegê-los da poluição do meio externo, criando microclimas artificiais no interior desses edifícios (Santos e col. 1992; Seppanen e Fisk 2002).

Normalmente, a circulação e distribuição do ar dentro desses edifícios é feita através de dutos, que passam por um equipamento centralizado, que compõem um sistema de filtração e refrigeração do ar.

Esses sistemas de dutos fazem com que o ar circule várias vezes dentro do próprio edifício, resultando em pouca renovação do ar e ainda na concentração de agentes tóxicos, favorecendo o contato desses agentes com as pessoas que ocupam esses locais e trazendo prejuízos à saúde.

Esses locais, por serem fechados e apresentarem pouca renovação de ar, constituem um ambiente favorável ao aparecimento de uma série de sintomas, aos seus ocupantes, tais como: dores de cabeça, irritação dos olhos, nariz e mucosas. Esses problemas caracterizam o que se convencionou chamar de “Síndrome dos Edifícios Doentes” situação em que os problemas de saúde estão relacionados com as condições ambientais do edifício, que nessas condições são chamados de “Edifícios Doentes” (Sterling e col. 1991; Marmot e Eley 2006).

Segundo *World Health Organization* (WHO), a Síndrome dos Edifícios Doentes é a relação entre as condições ambientais observadas em áreas

internas com reduzida renovação de ar e os níveis de agressão a saúde dos seus ocupantes, é caracterizada por uma série de sintomas não específicos, que ocorrem particularmente em locais fechados, e não são causados por nenhuma doença específica como alergia ou uma infecção, mas pela exposição dos indivíduos a agentes tóxicos e outros contaminantes. Os vários sintomas observados nessas condições podem ser agrupados em dermatológicos, irritação de mucosas, e qualquer outro sintoma que não tenha uma definição clínica (WHO, 1983, Edvardsson e col.2008).

Esses problemas, geralmente, podem ser resultado da exposição a produtos químicos potencialmente tóxicos utilizados na limpeza dos escritórios ou pela liberação de gases tóxicos pelos equipamentos existentes nos escritórios, como computadores, impressoras, que podem deixar resíduos no ambiente, ou ainda de uma limpeza inadequada dos sistemas de ar condicionado, os quais podem conter contaminantes como poeira, vírus, esporos de fungos e bactérias (as quais também podem produzir substâncias tóxicas), dentre outros agentes causadores de alergias e infecções respiratórias graves (Apter e col. 1994; Pommer e col. 2004; Jaakkola e Jaakkola 2007)

A ocorrência de doenças relacionadas à Síndrome dos Edifícios Doentes é significativamente maior (cerca de 30 a 200%) em locais com ventilação artificial (Seppanen e Fisk 2002).

A qualidade do meio afeta o bem estar, o temperamento e o rendimento das pessoas enquanto desenvolvem suas atividades, portanto a manutenção de um ambiente saudável trará repercussões positivas à saúde e produtividade dos indivíduos (Santos e col 1992).

Os contaminantes biológicos atmosféricos, que são pouco estudados, assumem um papel importante no processo de saúde e doença; eles estão presentes na atmosfera e podem causar doenças denominadas de transmissão aérea. Indubitavelmente, a presença desses microrganismos pode representar um fator de risco à saúde de pessoas expostas, especialmente em locais confinados. Segundo Morawska (2006), dentre os contaminantes biológicos presentes em ambientes internos estão vírus

(influenza, varicela); bactérias do gênero *Mycobacterium* e *Legionella* e fungos do gênero *Aspergillus*

Um agente que tem causado sérios problemas à saúde nesses ambientes é *Legionella* spp. A infecção por *Legionella* sp. pode ser adquirida pela inalação do microrganismo suspenso no ar, na poeira, ou em aerossóis, provenientes de sistemas de ar condicionado (Ishimatsu e col. 2001, Isozumi e col. 2005, Laumbach e Kipen 2005).

O gênero *Legionella* é responsável por causar uma doença conhecida como legionelose ou doença do Legionário. Esses organismos ganharam destaque, após um grande surto da doença, que ocorreu em uma convenção de legionários que acontecia na Filadélfia, Estados Unidos, no ano de 1976, onde foram acometidos pela doença 200 indivíduos, dos quais 29 chegaram a óbito (Brenner e col. 1979).

A legionelose é uma pneumonia bacteriana aguda, que se caracteriza por febre alta, mal estar, cefaléia, calafrios, diarreia, tosse seca; dados apresentados pela *World Health Organization* (WHO) indicam uma taxa de mortalidade de 40% (WHO 2005).

Com o aumento do número de pessoas trabalhando em locais confinados, tem aumentado também os casos de legionelose, e por esse motivo, esse patógeno emergente, tem sido objeto de estudo em vários países (Fields e col.2002; Souza 2005, Liu e col. 2006, Helbig e col. 2007).

Surto de legionelose têm sido observados em uma grande variedade de ambientes, como em casas, hotéis, hospitais e até em cruzeiros marítimos (Delgado–Viscogliosi e col.2005).

Dados epidemiológicos fornecidos pelo Grupo Internacional de Pesquisa de Infecção por *Legionella* spp. (EWGLI-*European Working Group of Legionnaire's Infection*) indicaram que é crescente o número de casos de legionelose, principalmente na Europa (EWGLI, 2005)

Segundo *World Health Organization* (WHO), as populações mais vulneráveis à doença são geralmente idosos, pessoas com doenças respiratórias pré-existentes, doenças renais, fumantes e usuários de álcool (WHO 2005).

Conforme literatura consultada, a contaminação de pessoas por *Legionella* spp. ocorre principalmente por essa bactéria crescer em locais como sistemas de abastecimento de água e de ar condicionado, o que favorece sua disseminação, principalmente pela formação de aerossóis.

A colonização de torres de resfriamento de sistemas de ar condicionado foi identificada como sendo uma das principais fontes responsáveis pela disseminação da bactéria que pode originar surtos de infecção por *Legionella* sp. (Sabrina e col. 2006, Tran e col. 2006).

Tendo em vista o exposto, pode-se considerar que sistemas de ar condicionado não só são excelentes meios de crescimento de *Legionella* spp. mas também, são eficientes meios de disseminação dessa bactéria. (Joly 1993, Türetgen e col. 2005).

Nesse sentido, investigações epidemiológicas realizadas indicaram que alguns surtos de legionelose podem ter ocorrido pelo fato de *Legionella* sp. crescer em torres de resfriamento e bandejas de aparelhos de ar condicionado, favorecendo a transmissão da bactéria pelo ar (Santos e col. 1992; Greig e col. 2004; Carbonne e Astagneau. 2005).

Portanto, considerando-se os relatos da literatura consultada nesse estudo foram analisadas amostras de água provenientes de bandejas de aparelhos de ar condicionado, para avaliar os níveis de contaminação por *Legionella* sp..

2- REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1- CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA *Legionellaceae*

A primeira linhagem de *Legionella* sp. foi isolada de porquinhos da Índia em 1943, o gênero foi estabelecido em 1979 por Brenner e col. após um grande surto da doença, que ocorreu em uma convenção de legionários

na Filadélfia (EUA) no verão de 1976 (Brenner e col., 1979; Delgado-Viscogliosi e col. 2005)

A Família *Legionellaceae* é composta por apenas um único gênero, *Legionella* (Fields e col 2002).

O gênero *Legionella* atualmente é composto por 50 espécies e 71 diferentes sorogrupos, sendo 16 sorogrupos pertencentes a *L. pneumophila*, porém o número de espécies da família *Legionellaceae* continua a crescer (La Scola e col. 2004, WHO 2007).

Segundo *Bergey's Manual* (2° ed., 2005), as bactérias do gênero *Legionella* são bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, não encapsulados e de tamanhos variados, com 0,3 a 0,9µm de largura e 2,0 a 20µm de comprimento (Brenner e col.1979). Em esfregaços de amostras biológicas, são observadas formas mais curtas e delgadas ou em forma de cocobacilos (Flannery e col.2006, Pião e col. 2006).

A temperatura ótima para o desenvolvimento da bactéria do gênero *Legionella* é de 36 ±1 °C e pH ótimo de 6,8 a 7,0 (Feeley e col. 1979).

Com exceção de três espécies imóveis, *L. oakridgensis*, *L. nautarum* e *L. londinensis*, as demais espécies se movimentam através de um ou mais flagelos subpolares (Diederer 2007).

Legionella spp. são organismos quimiorganotróficos e utilizam aminoácidos como fonte de carbono e energia e não são capazes de oxidar ou fermentar carboidratos (Brenner e col. 1979; Fields e col. 2002; Park e col. 2003).

Organismos do gênero *Legionella* são aeróbios estritos e nutricionalmente exigentes, pois requerem para seu crescimento L-cisteína e sais de ferro. Sua natureza fastidiosa provavelmente se deve ao fato de *Legionella* sp. viver em associação com outros microrganismos de onde retira seus nutrientes, já que os nutrientes de que a bactéria necessita não são comumente encontrados dissolvidos no ambiente. Pode ser encontrada vivendo como parasita intracelular de protozoários de vida livre (Brenner e col.1979, Feeley e col. 1979; Mastro e col. 1991).

Algumas espécies de *Legionella*, quando cultivadas, apresentam autofluorescência se expostas à luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 365 nanômetros. As espécies *L.anisa*, *L.bosemanii*, *L.parisiensis*, *L.tucsonensis*, *L.gormanii*, *L.cherri*, *L.steigerwaltii* e *L.dumoffi* apresentam fluorescência branco-azulada; as espécies *L.birminghamensis* e *L.wadsworthii* apresentam fluorescência verde-amarelada enquanto as espécies *L.erythra* e *L.rubrilucens* apresentam fluorescência avermelhada (Winn 1999).

2.2-ECOLOGIA DE *Legionella* spp.

Organismos do gênero *Legionella* são comumente encontrados em ambientes aquáticos, que constituem o seu principal reservatório. Esses ambientes podem ser naturais, como rios, lagos, lençóis freáticos, solos úmidos além de mares e oceanos e também artificiais, criados pelo homem, como linhas de suprimento de água quente em hospitais, água de torre de refrigeração de indústrias, sistemas de ar condicionado de grandes edifícios, como escritórios, hospitais e hotéis (Flierman e col. 1981, Riffard e col. 2001, Bartie e col. 2003, Brooks e col. 2004, Türetgen e col. 2005).

Nesses sistemas de climatização artificial, alguns fatores podem favorecer o desenvolvimento de *Legionella* spp., como por exemplo, os componentes metálicos desses sistemas, além da complexidade de manutenção dos mesmos, o que pode levar algumas partes do sistema a sofrer processos de oxidação. A oferta de metais oxidados sob a forma de íons dissolvidos, e a formação de biofilme microbiano são fatores importantes na proliferação de *Legionella* sp. pois os íons metálicos são uma fonte importante de nutrientes para o metabolismo da bactéria, e o biofilme atua como uma barreira à ação de agentes antimicrobianos (Van der Kooij e col. 2005).

A formação de biofilmes microbianos tem demonstrado ser de grande importância na proliferação de *Legionella* sp. em sistemas de distribuição de

água, e sistemas de climatização artificial (Piao e col. 2006, Türetgen e Cotuk 2007). Esse efeito positivo do biofilme sobre a *Legionella sp.*, provavelmente ocorra pelo aumento de matéria orgânica no meio derivada dos processos metabólicos de bactérias que compõem o biofilme, que são capazes de se multiplicar mesmo sob condições de estresse (Guerrieri e col. 2007). Segundo Dolean (2002), essas estruturas produzem uma comunidade microbiana aderida e coesa, podendo conferir vantagens à sobrevivência e proliferação desses microrganismos, como proteção a compostos nocivos, variações bruscas de temperatura, pH e salinidade.

Outro fator que pode contribuir para a proliferação de organismos do gênero *Legionella* nesses ambientes artificiais é a presença de protozoários, como amebas de vida livre, com a qual a bactéria pode se associar e estabelecer uma relação de parasitismo (Mastro e col. 1991).

Segundo Wadowsky e col. (1982), no meio natural, bactérias do gênero *Legionella* vivem e se multiplicam em águas com temperaturas que podem variar de 25 a 45°C, com temperatura ótima variando de 32 a 42°C. Porém um trabalho realizado por Rogers e col. (1994) demonstrou que organismos do gênero *Legionella* são capazes de sobreviver em ambientes com temperaturas que podem variar de 20 a 70°C.

A medida em que a temperatura diminui, também cai a taxa de crescimento da bactéria, que apresenta pouco ou nenhum crescimento em temperaturas abaixo de 20°C, quando o organismo pode estar viável no ambiente, porém não cultivável (Konishi e col.2006; WHO 2007).

A bactéria também é tolerante a variações de pH, já tendo sido isolada de ambientes com variações de pH de 2,7 a 8,3 (Sheehan e col., 2005). Segundo Chang e col. (2008), em temperatura ambiente *Legionella* spp. mantêm-se viáveis em ambientes com pH variando de 2 a 10, perdendo totalmente sua viabilidade em pH abaixo de 2.

Em um trabalho realizado por Türetgen e col.(2005) em Istambul na Turquia, foram analisadas 103 amostras de água de 50 torres de resfriamento. Das 103 amostras analisadas, 27 (26%) apresentaram resultado positivo para a presença de *L. pneumophila* com concentrações

variando de 85 Unidades Formadoras de Colônias por 100mL (UFC/100mL) a $>10^6$ UFC/100mL. Nos resultados obtidos neste trabalho o pH das amostras analisadas variava de 5,56 a 9,40 e foi observado que as maiores concentrações de *Legionella* spp. foram obtidas em amostras com pH entre 8,84 a 8,99. A temperatura nos pontos de coleta variou de 4°C a 30°C, os autores relataram que o aumento na concentração de *Legionella* spp. era proporcional ao aumento da temperatura aumentava.

2.3-IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A principal forma de transmissão de *Legionella* spp. se dá através da inalação de aerossóis contaminados por esses organismos (Breiman e col. 1990).

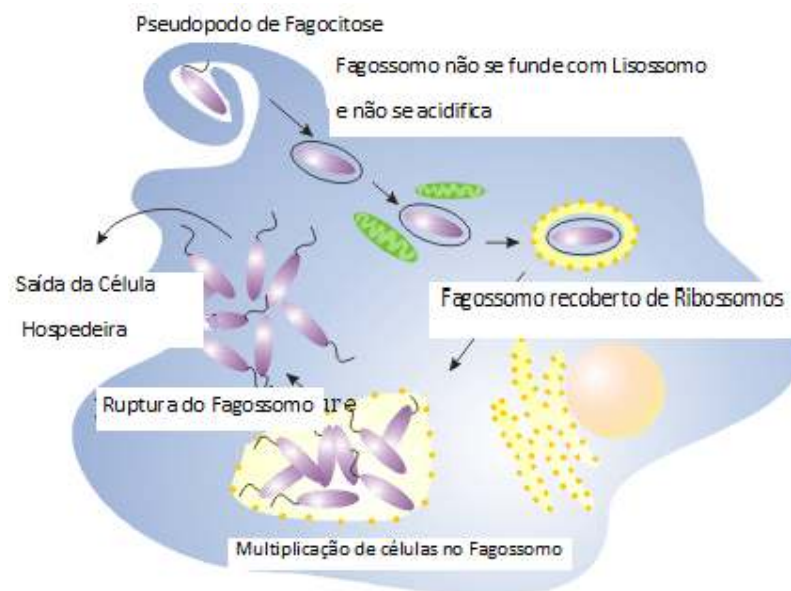
A exposição de um indivíduo a organismos do gênero *Legionella* pode resultar em duas doenças clinicamente distintas: a pneumonia e febre Pontiac. A pneumonia é uma doença infecciosa, com um período de incubação que pode variar de 2 a 10 dias, enquanto que a febre Pontiac é entendida como uma reação alérgica à exposição a esse organismo, com um período de incubação de 5 a 66 horas. A manifestação de duas formas da doença causadas por bactérias do gênero *Legionella* pode ser resultado de uma série de razões, como a exposição do indivíduo a células não viáveis, pela inabilidade do organismo de se multiplicar em tecidos humanos, virulência do organismo, e ainda a resistência do hospedeiro (Miller e col. 1993, Fields e col.2001; Castor e col.2005, Edelstein e col. 2005).

A patogenicidade de *Legionella* sp. em humanos depende da suscetibilidade do hospedeiro. Segundo WHO (1990), os mais vulneráveis são aqueles imunocomprometidos, principalmente indivíduos que tenham sofrido uma cirurgia de transplante; mas mesmo indivíduos considerados saudáveis podem desenvolver a doença.

Em humanos, as bactérias do gênero *Legionella* são patógenos intracelulares, que infectam macrófagos, onde as formas virulentas de

Legionella sp. tem a capacidade de se multiplicar dentro das células (Figura 1), as formas não virulentas não são capazes de se multiplicar no interior da célula hospedeira (Horwitz, 1993).

Figura 1- Representação esquemática do processo de infecção de uma célula por *Legionella* sp.



Fonte: Extraído de www.microbewiki.kenyon.edu

Aproximadamente, metade das espécies de *Legionella* tem sido associadas a infecções em humanos, entretanto uma única espécie, *L. pneumophila* é responsável por cerca de 90% dos casos, sendo que dos 15 sorogrupos dessa espécie o sorogrupo 1 é responsável por 85 % dos casos, o que indica que a maioria das espécies de *Legionella* são capazes de causar a doença, dependendo apenas de condições adequadas para que isso ocorra (Fields e col. 2002; Doleans e col. 2004; Helbig e col. 2007). O Quadro 1 relaciona as espécies de *Legionella spp.*, sorogrupos e sua associação com casos clínicos.

Quadro 1: Espécies do gênero *Legionella* e possível associação com casos clínicos.

Espécies	Sorogrupos	Associação com casos clínicos
<i>L. adelaidensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. anisa</i>	-	Sim
<i>L. beliardensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. birminghamensis</i>	-	Sim
<i>L. bozemanii</i>	2	Sim
<i>L. brunensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. busanensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. cherrii</i>	-	Desconhecido
<i>L. cincinnatiensis</i>	-	Sim
<i>L. drozanskii</i>	-	Desconhecido
<i>L. dumoffii</i>	-	Sim
<i>L. drancourtii</i>	-	Desconhecido
<i>L. erythra</i>	2	Sim
<i>L. fairfieldensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. fallonii</i>	-	Desconhecido
<i>L. feeleii</i>	-	Sim
<i>L. geestiana</i>	-	Desconhecido
<i>L. genomospecies</i>	-	Desconhecido
<i>L. gormanii</i>	-	Sim
<i>L. gratiana</i>	-	Desconhecido
<i>L. gresilensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. hackeliae</i>	2	Sim
<i>L. israelensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. jemestowniensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. jordanis</i>	-	Sim
<i>L. lansingensis</i>	-	Sim
<i>L. londidiensis</i>	2	Desconhecido
<i>L. longbeachae</i>	2	Sim
<i>L. lytica</i>	-	Desconhecido
<i>L. maceachernii</i>	-	Sim
<i>L. micdadei</i>	-	Sim
<i>L. moravica</i>	-	Desconhecido
<i>L. nautarum</i>	-	Desconhecido
<i>L. oakridgensis</i>	-	Sim
<i>L. parisiensis</i>	-	Sim
<i>L. pneumophila</i>	16	Sim
<i>L. quateirensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. quinlivanii</i>	2	Desconhecido
<i>L. rowbothamii</i>	-	Desconhecido
<i>L. rubrilucens</i>	-	Desconhecido

Continuação:

Espécies	Sorogrupos	Associação com casos clínicos
<i>L. sainthelensi</i>	2	Sim
<i>L. santicrucis</i>	-	Desconhecido
<i>L. shakespearei</i>	-	Desconhecido
<i>L. spiritensis</i>	2	Desconhecido
<i>L. steigerwaltii</i>	-	Desconhecido
<i>L. taurinensis</i>	-	Desconhecido
<i>L. tusconensis</i>	-	Sim
<i>L. wadsworthii</i>	-	Sim
<i>L. waltersii</i>	-	Desconhecido
<i>L. wosdsleiensis</i>	-	Desconhecido

Fonte: World Health Organization (WHO) 2007.

Clinicamente não é possível distinguir pacientes com legionelose de pacientes acometidos por pneumonia comum, sendo necessários exames mais específicos para identificar se o agente causador é *Legionella* sp. (Fields e col. 2002).

2.4-EPIDEMIOLOGIA E OCORRÊNCIA NO AMBIENTE

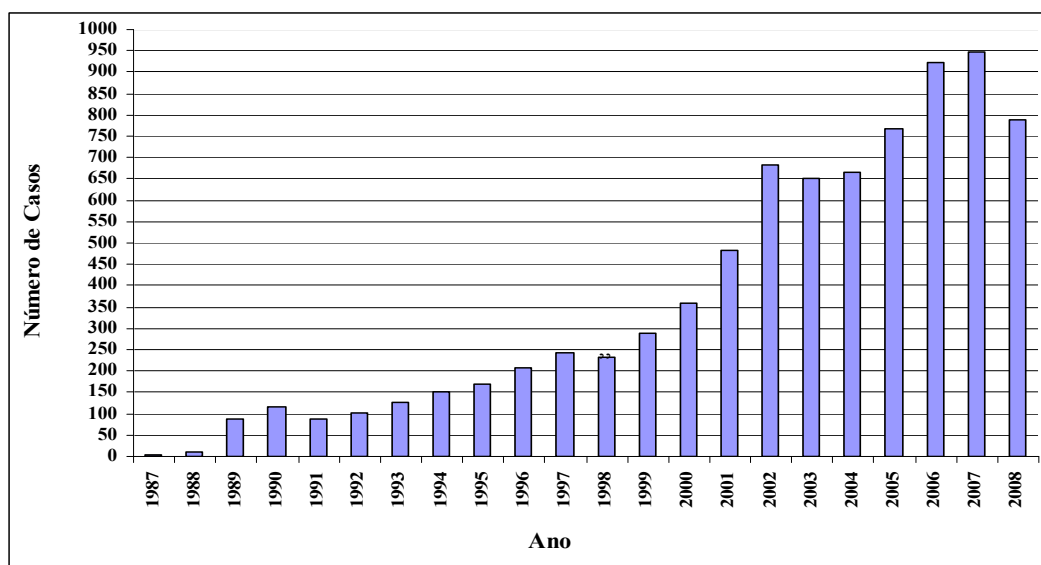
A partir da segunda metade do século XX, observou-se uma grande movimentação de pessoas vindas do campo e que passaram a viver nos grandes centros urbanos, com isso um número cada vez maior de pessoas passa a trabalhar em escritórios e edifícios comerciais.

O interesse econômico das grandes empresas da plena utilização dos espaços fez com que a arquitetura avançasse e desenvolvesse prédios cada vez mais altos e também que se eliminasse o vão central desses prédios que tinha a finalidade de fornecer iluminação e ventilação internas (Seppanen e col.2002). Também foram sendo desenvolvidos sistemas de climatização e ventilação, com o intuito de se obter um ambiente mais agradável a seus ocupantes.

Essa grande movimentação de pessoas provocou um elevado número de alterações no meio ambiente, que permanecem por mais tempo em locais fechados, climatizados artificialmente.

Um levantamento realizado pelo grupo Europeu de estudos de infecção por *Legionella spp.* (EWGLI- *European Working Group of Legionnaires' Infection*), demonstrou um aumento do número de casos de legionelose, principalmente na Europa, o que demonstra a preocupação dos países que compõem esse grupo em diagnosticar e identificar com rapidez a fonte de origem dessas infecções. A Figura 2 apresenta os dados obtidos em um levantamento realizado nos países que compõem o EWGLI- *European Working Group of Legionnaires Infection*.

Figura 2: Dados de um levantamento epidemiológico realizado por *European Working Group of Legionnaires Infection-EWGLI* no período de 1987 a junho de 2008 (*European Working Group of Legionnaires' Infection - EWGLW,2008*).



Fonte: EWGLI - *European Working Group of Legionnaires Infection* (EWGLI-2008).

Os dados obtidos nesse levantamento indicam um aumento de casos de legionelose a cada ano; no entanto deve-se considerar que esse aumento possa ser atribuído, a melhorias nos métodos de diagnósticos da doença e também na maior eficiência dos sistemas de informação onde os casos são registrados.

Shelton e col.(1994), investigaram possível associação entre altas concentrações de *Legionella* sp. em torres de resfriamento e a ocorrência de surtos de legionelose. Compararam as concentrações de torres associadas (n=2) e não associadas (n=286) a surtos da doença. As torres associadas a surtos apresentaram concentrações da bactéria acima de $1,6 \times 10^3$ UFC/mL, enquanto que as não associadas aos surtos apresentaram concentrações iguais ou superiores a $1,6 \times 10^2$ UFC/mL. Segundo os autores seus resultados indicam uma forte relação entre altas contagens de *Legionella* sp. e a ocorrência de surtos de legionelose e que portanto; quanto maior a concentração da bactéria nos sistemas de ar condicionado maior será a exposição das pessoas e o risco de infecção.

Bentham (2000) desenvolveu um trabalho para avaliar se altas concentrações de *Legionella* sp. estariam relacionadas ao risco de ocorrer um surto da doença. Foram analisadas amostras de água, no período de verão, de 28 aparelhos de ar condicionado relacionados a surtos de legionelose ocorridos em Adelaide-Austrália. Na maioria dos aparelhos analisados foram obtidas concentrações inferiores a 100UFC/mL. Segundo o autor, isso sugere que altas concentrações de *Legionella* sp. nos sistemas de ar condicionado não são comuns e que provavelmente ocorram esporadicamente, o que resultaria em surtos de legionelose. Portanto se faz necessário um monitoramento nesses sistemas, uma vez que, essas variações provavelmente sejam influenciadas por fatores como temperatura, frequência de utilização dos aparelhos e estação do ano.

Relatório elaborado pelo centro de controle de doenças norte americano, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) descreve um surto ocorrido em Ohio (EUA), no período de 12 a 15 de março de 2001, onde foram identificados quatro casos de legionelose em trabalhadores de

uma indústria automotiva. Com o intuito de determinar a origem da transmissão da bactéria, foi realizada análise em 197 amostras de água das torres de resfriamento de aparelhos de ar condicionado, das mangueiras e dos aquecedores, já que em áreas confinadas como esta podem ser fontes de propagação e transmissão da bactéria. Foi detectada a presença de *Legionella sp.*, em 18 (9%) das 197 amostras de água analisadas (CDC 2001).

Garcia-Fulgueiras e col. (2003) relataram que em Murcia (Espanha), foram diagnosticados mais de 800 casos suspeitos de legionelose, dos quais se confirmaram 449 casos (56%) sendo 1,1% fatais, motivando a realização de estudos na tentativa de se identificar a origem desse surto. A investigação incluiu análise de água coletada do sistema de abastecimento de água (339), torres de resfriamento de sistemas de ar condicionado (22) e fontes ornamentais. Foi delimitada área com raio de 200m ao redor dessas instalações para se inspecionar a possível formação e alcance de aerossóis. Não detectaram *L. pneumophila* nas amostras do sistema de abastecimento de água da cidade, entretanto foi isolada *L. pneumophila* sorogrupo 1 de caixas de água de 3 edifícios e em 50% das amostras das torres de resfriamento estudadas, nas quais detectaram a presença da linhagem Philadelphia Mab type pertencente ao sorogrupo 1, principal responsável por casos letais de infecções humanas

No Japão, após relatos de casos de infecções hospitalares em recém-nascidos, Yamamoto e col.(2003) realizaram pesquisa com o objetivo de verificar a presença de *Legionella sp.* nos sistemas de distribuição de água, para prevenir casos de infecção na ala neonatal do hospital universitário de Ryukyu. Por seis anos, de 1996 a 2001, foram coletadas amostras de água de nove chuveiros e torneiras do centro de terapia intensiva neonatal. Foram isoladas cepas de *Legionella* em duas amostras no ano de 1996, nenhum isolado da bactéria em 1997, um isolado em 1998, dois em 1999 e três isolados no ano de 2000 e 2001; todas identificadas como sendo *L. anisa*.

Na Itália, Borella e col. (2004), realizaram uma pesquisa em seis cidades (Milão, Modena, Bolonha, Roma, Nápoles e Bari), representando

diferentes regiões italianas (nordeste, central e sudeste), para detectar a ocorrência de *Legionella* sp. em amostras de água quente de sistemas de aquecimento de 146 residências. As análises acusaram a presença da bactéria em 33 (22,6%) das 146 amostras estudadas.

Nguyen e col. (2006) realizaram um estudo a respeito de um surto de legionelose ocorrido em novembro de 2003, em uma comunidade rural em Harnes, Pas-de-Calais (França). Foram notificados 104 casos suspeitos entre novembro de 2003 a janeiro de 2004, dos quais 84 foram confirmados havendo 18 (21%) óbitos. Amostras de água das casas dos indivíduos que tiveram a doença confirmada e das torres de resfriamento de indústrias locais foram analisadas assim como sistemas de ar condicionado em prédios públicos, fontes decorativas, sistema público de água potável e plantas de tratamento de esgotos. Foram obtidas mais de 1100 amostras de água no período entre 2003 e 2004. Das amostras analisadas foram isoladas cepas de *Legionella pneumophila* em: 44 (7,2%) das 610 torres de resfriamento analisadas; 43 (44,3%) das 97 plantas de tratamento de esgotos; 6 (8,8%) dentre as 68 casas estudadas; 5 (3%) dos 165 lava – rápido de carros; 2 (4,8%) das 41 torres de resfriamento industriais; 2 (6,6%) das 30 outras instalações capazes de produzir aerossol e 2 (16,7%) das 12 amostras oriundas do sistema de distribuição de água da cidade.

Triassi e col.(2006) realizaram um trabalho em um hospital escola italiano (V. Monaldi) com o objetivo de avaliar a distribuição de *Legionella* sp. nas diferentes alas do hospital. Avaliaram amostras clínicas provenientes de dois pacientes com pneumonia, internados no centro cirúrgico adulto entre 2000 e 2001, e também 63 amostras de água em vários locais do hospital como: centro cirúrgico adulto e pediátrico, unidades de tratamento intensivo neonatal e cardiorrespiratório Os resultados obtidos mostraram que nas amostras clínicas foram identificadas como *L. pneumophila* sorogrupo 1. Nas amostras de água foram isoladas *Legionella* sp. em 30 amostras distribuídas em todas as alas do hospital. Em 21 amostras foi identificada a ocorrência de *L. pneumophila* sorogrupo 3; *L. pneumophila* sorogrupo 1 em quatro amostras, e como não pneumophila em cinco amostras analisadas.

Segundo Armstrong e col. (2008) que desenvolveram um modelo para avaliar o risco de exposição à *Legionella* sp., e apontaram que há dificuldades na determinação da dose de exposição, entretanto sustentam a teoria de que uma vez que ocorra a exposição a uma cepa virulenta é provável que o indivíduo desenvolva a doença independente da concentração da bactéria.

2.5- OCORRÊNCIA DE *Legionella* sp. NO BRASIL

No Brasil, Levin e col. (1991), realizaram um trabalho para identificar a origem de um surto de legionelose que ocorrera entre junho de 1989 a março de 1990. Foram diagnosticados oito casos da doença do legionário, em uma unidade de transplante renal, do Hospital das Clínicas de São Paulo. No trabalho foram investigados, o sistema de ar condicionado do centro cirúrgico, 12 amostras de água coletadas de chuveiros e torneiras da unidade transplante renal, e amostras de água das caixas de água do hospital. Os resultados obtidos revelaram isolados de cepas de *L. anisa* em 2 das 12 amostras de água do centro de transplante, e cepas de *L. pneumophila* sorogrupo 1 do sistema de ar condicionado. Nas amostras de água das caixas de água do hospital não se detectou a presença de *Legionella* sp. Os autores concluíram que a provável origem do surto seria o sistema de distribuição de água e como medida de controle foi aplicada a hipercloração e o aumento da temperatura da água para 80°C. Os autores acreditam que este tenha sido o primeiro surto de legionelose reportado na América Latina.

Pellizari e col. (1995), realizaram um estudo com o objetivo de pesquisar a ocorrência de *Legionella* sp. em águas residenciais, de prédios públicos, de ambientes hospitalares e também de ambientes industriais na cidade de São Paulo. Nesse trabalho foram analisadas 69 amostras de água, provenientes de torres de refrigeração, caldeiras, chuveiros, torneiras e reservatórios de água. Seis amostras apresentaram resultado positivo,

somando um total de 19 cepas, das quais 11 confirmadas como *Legionella* sp. sorogrupo 1, 7 como *Legionella* sorogrupo 6 e uma como *Legionella bozemanii*.

Uma pesquisa realizada por Ferreira (2004) detectou *L. pneumophila* em amostras de água provenientes de sistemas de distribuição de água de hospitais, no Rio de Janeiro, Brasil. Foram inspecionados 16 hospitais dos quais 5 apresentaram resultados positivos para a presença de *L. pneumophila*. Estes hospitais foram integrados a um projeto de investigação que visa à detecção e quantificação desse patógeno. Durante 10 semanas consecutivas, foram realizadas quatro coletas somando um total de 200 amostras analisadas dos cinco hospitais pesquisados. Foram isoladas cepas de *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 em todos os pontos de coleta, assim como isolados de *L. pneumophila* sorogrupo 3, 4 e 6. Os resultados mostraram que a rotina de vigilância da rede de distribuição da água de um hospital é fundamental para assegurar que não ocorram agravos a saúde em decorrência desse agente etiológico e deve incluir, prioritariamente, o acompanhamento da ocorrência de *L. pneumophila* nesses ambientes

Estudo realizado por Carvalho e col. (2007a) avaliou o efeito da ação antropogênica sobre uma população *Legionellaceae* em águas que recebem descarga de esgoto. Foram coletadas amostras de água de uma região prístina (rio Rio Branco), e de uma região estuarina moderadamente afetada por esgotos domésticos sem tratamento (rio Itanhaém). A utilização de meio de cultura não revelou a presença de organismos do gênero *Legionella*, porém métodos independentes de cultivo mostraram que as amostras continham seqüências de DNA homólogas à de *Legionella pneumophila* e espécies não-pneumophilas. Todas as seqüências isoladas das amostras coletadas do rio Rio Branco pertenciam a *L. pneumophila*, enquanto que as seqüências encontradas nas amostras do rio Itanhaém, 2 eram de *L. pneumophila*, 2 de *Fluoribacter dumoffi*, 2 *L. lytica* uma de *L. birminghamensis*, uma de *F. bozemanii* e 4 eram de seqüências relacionadas à *Legionella* sp. ainda não identificadas. Segundo os autores, os resultados sugerem que ações antropogênicas, como a descarga de

esgotos sem tratamento, favorecem o crescimento de algas e cianobactérias que podem estimular o desenvolvimento de espécies de *Legionella* e, ainda a presença de protozoários nos quais a bactéria pode se reproduzir intracelularmente quando as condições ambientais forem desfavoráveis.

Carvalho e col.(2007b) desenvolveram estudo para avaliar a ocorrência de bactérias do gênero *Legionella* na cidade de São Paulo utilizando diferentes métodos de isolamento e identificação. Foram coletadas 67 amostras de água e biofilme de diferentes locais como: reservatórios naturais, torres de resfriamento e seus reservatórios, unidades dentárias, chuveiros, aquecedores e condensadores. Nos resultados obtidos, 9 das 67 amostras de água analisadas apresentaram resultado positivo para a presença de *Legionella sp.*. As amostras positivas eram provenientes de sistemas de climatização artificial e foi observada a predominância de *L pneumophila* sorogrupo 1. Os resultados evidenciam que esses ambientes podem servir como reservatório para esses organismos.

2.6-DETECÇÃO DE *Legionella spp.*

O isolamento e a identificação de *Legionella spp.* baseiam-se em aspectos como característica de crescimento em meio de cultura seletivo, tipagem sorológica, assim como reação de imunofluorescência, aglutinação em micropartículas de látex e técnicas moleculares (Edelstein e Edelstein, 1993, Pellizari e col.1995, Socan e col. 1999, Malan e col. 2003, Turetgen e col. 2005, Triassi e col. 2006, Carvalho e col.2007a e b, Diederer e col. 2008).

Diferentes métodos têm sido aplicados para a detecção de espécies de *Legionella* em amostras ambientais. O cultivo em meio de cultura seletivo é um método padrão e certificado para a determinação de bactérias do gênero *Legionella* (Miyamoto e col., 1997, Triassi e col. 2006 Nazarian e col. 2008, Koziol-Montewka e col. 2008). O cultivo em meio de cultura seletivo permite o isolamento e a quantificação da bactéria do gênero *Legionella* do

meio ambiente (Delgado-Viscogliesi e col. 2005), porém podem ser mencionadas desvantagens deste método tais como o tempo de até 10 dias para obtenção dos resultados, além da possibilidade de haver perda de células durante o processo de concentração ou durante o tratamento ácido, e existe também a possibilidade de bactérias oportunistas de crescimento mais rápido impedirem o crescimento de *Legionella* sp. (Hussong e col., 1986; Fields e col. 2002, Tronel e Hartemann 2009).

Outro aspecto a ser observado no método de cultivo é que a contagem de número de unidades formadoras de colônias (UFC) sobre a placa pode ser subestimado, uma vez que as células podem apresentar-se agrupadas, concentradas em amebas de vida livre ou ainda podem se encontrar em um estado fisiológico viável, porém não cultivável (Wellinghausen e col.,2001, Gião e col.2008).

Vários métodos de detecção independentes de cultivo vêm sendo desenvolvidos para detecção de *Legionella* sp. em amostras ambientais. Esses métodos têm sido sugeridos como alternativa para aumentar a sensibilidade e a especificidade dos ensaios na detecção da bactéria, devido à baixa concentração da bactéria no meio ambiente ou as condições metabólicas do organismo, que pode estar viável, porém não cultivável, devido a condições do meio onde se encontra (Haydeen 2001; Herpers 2003).

Os métodos independentes de cultivo incluem detecção do organismo com antígenos específicos e processos para detecção de DNA de *Legionella* com a utilização de PCR (Joly, 1993).

Em relação ao emprego da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), diferentes métodos têm sido amplamente utilizados para detectar diferentes espécies *Legionella* em amostras ambientais com marcadores específicos para o genes 16S rRNA, 5S rRNA. A utilização de PCR para detecção de DNA de *Legionella* sp. tem se mostrado uma valiosa ferramenta em investigações de surtos de legionelose (Miller e col.1993, Miyamoto e col., 1997, Wellinghausen e col., 2001, Buchbinder e col., 2002, Fields e col. 2002). As vantagens da técnica de PCR são a alta velocidade, sensibilidade

e simplicidade da análise, bem como a capacidade de se detectar células não-cultiváveis. Entretanto, algumas limitações na utilização dessa técnica seria a presença de inibidores presentes nas amostras tais como matéria orgânica ou de metais pesados, e outro aspecto a ser levado em conta é que não é possível se discriminar células viáveis de não viáveis (Catalan e col., 1997).

Estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar e comparar os métodos de cultivo e independentes de cultivo no isolamento de organismos do gênero *Legionella*.

A PCR em tempo real tem sido utilizada para a determinação quantitativa de células de *Legionella* sp. em amostras de água (Leskela e col. 2005). Na Alemanha, Wellinhausen e col (2001) desenvolveram um trabalho onde compararam a técnica de PCR em tempo real com técnicas tradicionais (cultivo em meio seletivo) na detecção de *Legionella* sp. em amostras de água de três hospitais. Foram analisadas 77 amostras de água. Com o cultivo em meio seletivo a frequência de resultados positivos foi de 70% enquanto que com a técnica de PCR em tempo real obtiveram 98,7% de amostras positivas. Segundo os autores, os resultados demonstram que a utilização dessa técnica de PCR é mais eficiente e uma valiosa ferramenta na detecção de bactérias do gênero *Legionella*.

Outro método bastante útil para a detecção de *Legionella* sp. em ambientes aquáticos é a técnica de imunofluorescência direta (DFA) (Palmer e col. 1995). Com este ensaio é possível identificar várias espécies diferentes, entretanto há a impossibilidade de discriminar espécies estreitamente relacionadas como a *Legionella cinclinatiensis*, *Legionella sainthelensi* e *Legionella santicrusis*, devido a reações cruzadas com *Legionella longbeachae* sorogrupos 1 e 2 (Saint, 1999).

Carvalho e col.(2007 b) analisaram amostras de água provenientes de ambientes naturais e artificiais, com a utilização de três diferentes técnicas (cultivo em meio seletivo, ensaios de imunofluorescência direta e co-cultivo em amebas de vida livre) com o intuito de compará-las no isolamento e identificação de *Legionella* spp.. Foram isoladas *L.*

pneumophila com predominância do sorogrupo 1 nas amostras de ambientes artificiais examinadas, porém não foram isoladas cepas de *Legionella* spp. nas amostras de ambientes naturais. Segundo os autores as três técnicas empregadas apresentaram resultados similares, não sendo observada uma diferença significativa, indicando que os três métodos utilizados são igualmente eficientes para o monitoramento de populações de *Legionella* spp. em ambientes artificiais.

Também têm sido utilizados anticorpos monoclonais (MAbs), produzidos por imunização em camundongos, especificamente produzidos para a detecção de *L. pneumophila* de sorogrupos diferentes. A desvantagem deste método é a possibilidade de haver reação cruzada com outras espécies do gênero (Helbig e col., 1997).

Outra técnica que tem sido desenvolvida é o ensaio de hibridização, para a detecção de DNA dessas bactérias (Namimatsu e col., 2000; Rautio e col, 2003).

Leskelä e col. (2005), desenvolveram um método independente de cultivo para detecção de *Legionella* sp. Neste estudo, descrevem uma metodologia de hibridização para a detecção dessas bactérias em amostras de ambientes aquáticos utilizando sondas específicas para o gene 16S rRNA.

Todos os métodos apresentados, possuem vantagens e desvantagens quanto a sua eficiência na detecção de *Legionella* sp.. Entretanto podem produzir bons resultados se utilizados em conjunto, ou de forma complementar. A escolha da técnica de isolamento de *Legionella* sp. está relacionada com o objetivo da pesquisa proposta.

2.7 CONTROLE DE *Legionella* spp.

Como já citado anteriormente, o gênero *Legionella* sp. é comumente encontrado em ambientes naturais como mananciais, e também em ambientes criados pelo homem como em sistemas domésticos de água

potável, fontes decorativas, torres de resfriamento. Sua dispersão se dá através de aerossóis de água contaminada resultando em um risco de contaminação individual e, por vezes causar surtos da doença (Fields e col.2002).

Por esse motivo, várias práticas têm sido utilizadas para controle da proliferação de *Legionella* sp. As técnicas mais utilizadas são tratamento térmico, ionização com cobre e prata, irradiação com ultravioleta e cloração (Miller 2003).

Triassi e col.(2006) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar técnicas de tratamento térmico e irradiação por ultravioleta (UV) como métodos de desinfecção e controle de *Legionella* sp. em diferentes alas de um hospital italiano. O primeiro método a ser aplicado foi o tratamento por choque térmico, e após um mês desse procedimento ainda foi isolada *Legionella* sp. nas amostras de água avaliadas. O segundo método avaliado foi a aplicação de irradiação de ultravioleta (UV) no sistema de distribuição de água do hospital. Para avaliar a eficácia do método, amostras de água do centro cirúrgico adulto e infantil, foram analisadas. Antes da instalação da UV ambos os centros estavam contaminados por *L. pneumophila* sorogrupos 1, 3 e *Legionella* não-*pneumophila*. Após a aplicação de UV verificou-se a eliminação de *L. pneumophila* sorogrupos 1 e *Legionella* não-*pneumophila* e ainda a diminuição da concentração de *L. pneumophila* sorogrupos 3. Os resultados obtidos indicam que a irradiação com luz ultravioleta, se mostrou mais eficiente que o choque térmico.

Um trabalho realizado por Flannery e col. (2006) na cidade de São Francisco (Califórnia) teve como objetivo avaliar a eficiência da utilização de monoclорamina em relação ao cloro no controle de colonização de sistemas de água por *Legionella* sp.. Nos resultados obtidos observaram que quando o cloro era utilizado como desinfetante, foram isoladas *Legionella* sp. em 96 (60%) das 159 amostras analisadas e que 37 (70%) dos 53 edifícios estavam colonizados por *Legionella* sp.. Após a conversão para monoclорamina, detectou-se *Legionella* sp. em 7 (4%) das 159 amostras analisadas e que 5 (9%) dos 53 edifícios estavam colonizados pela bactéria.

A conversão para monocloramina resultou em uma redução de 93% na prevalência de colonização de *Legionella sp.* nos sistemas de água dos edifícios estudados.

Varvara e col.(2007) realizaram, em Atenas (Grécia), um estudo com o objetivo de avaliar a eficiência, vantagens e desvantagens da utilização do choque térmico para o controle de *Legionella sp.* Foram analisadas amostras de água provenientes de 385 hotéis, 18 hospitais e 94 centros esportivos, dos quais 80 hotéis, 8 hospitais e 4 centros esportivos tinham seus sistemas de abastecimento colonizados por *Legionella sp.*. O tratamento por choque térmico foi aplicado nos locais onde se evidenciaram colonização pela bactéria. Realizou-se monitoramento da concentração de *Legionella* até que permanecesse abaixo de 1000 UFC/L. Nesse estudo os autores concluíram que a temperatura de 65°C é suficiente para eliminar organismos do gênero *Legionella*, entretanto esses organismos não foram eliminados totalmente dos sistemas de distribuição, sugerindo mecanismos protetores como associação a biofilmes.

Cachafeiro e col.(2007) realizaram uma revisão da literatura que destacava a eficiência e segurança da ionização com cobre e prata no controle de *Legionella sp.* em sistemas de água. Foram selecionados dez trabalhos realizados entre janeiro de 1997 e janeiro de 2007. Os autores constataram que a maioria dos trabalhos reportava níveis abaixo de 2mg/L de cobre e 0,1mg/L de prata, limites máximos recomendados pela *World Health Organization* (WHO). Após análise dos textos, evidenciaram que a ionização com cobre e prata é um método eficiente para o controle de *Legionella sp.*, que a manutenção de temperaturas elevadas no sistema de abastecimento de água pode maximizar a efeito do método e, ainda que pode ser considerada segura quando respeitados os níveis de concentração máxima recomendados pela *World Health Organization* (WHO).

Gião e col. (2008) realizaram um trabalho com o intuito de avaliar o efeito de diferentes concentrações de cloro sobre o crescimento de *Legionella pneumophila*. No trabalho foram preparadas suspensões de *L. pneumophila* em água filtrada e sem cloro com concentração aproximada de

10^7 células. As suspensões foram então submetidas a concentrações de 0,2, 0,7 e 1,2 mgCl/L e analisadas no início do experimento, e a cada 10 minutos até completar o tempo de exposição de 30 minutos, para verificar se havia variação na concentração da bactéria. Os resultados obtidos por Gião e col. demonstraram que a concentração de 0,2 mgCl/L não afeta a viabilidade das células porém começam a perder sua capacidade de crescimento. Quando expostas a concentração de 0,7 mgCl/L, as células perdem sua capacidade de crescimento porém continuam viáveis, já a concentrações de 1,2 mgCl/L as células perdem sua capacidade de crescimento nos primeiros dez minutos de exposição e pequena diminuição no número de células viáveis. Segundo os autores, os resultados mostram que quando as bactérias são expostas a ao cloro perdem a capacidade de crescimento, porém continuam viáveis e, portanto, capazes de causar infecção (Gião e col. 2008).

3-LEGISLAÇÃO

Considerando o interesse sanitário na divulgação do assunto; a preocupação com a saúde, a segurança, o bem-estar e o conforto dos ocupantes dos ambientes climatizados; e o atual estágio de conhecimento da comunidade científica, na área de qualidade do ar ambiental interior, o Ministério da saúde (MS) publicou no ano de 1998 uma portaria que estabelece padrões referenciais e/ou orientações para esse controle.

No ano de 2000 foi publicada pela ANVISA a resolução RE/ANVISA N°176 de 24 de outubro de 2000, como uma revisão da portaria GM/MS N°3523 de 28 de agosto de 1998.

Em 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou uma nova resolução, a N°9 de 16 de Janeiro de 2003, com o intuito de revisar e atualizar a RE/ANVISA N°176 de 24 de outubro de 2000 sobre os Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em Ambientes Climatizados Artificialmente de Uso Público e Coletivo.

A resolução ANVISA N°9 de 16 de Janeiro de 2003 recomenda que os órgãos competentes de Vigilância Sanitária com o apoio de outros órgãos governamentais, organismos representativos da comunidade e dos ocupantes dos ambientes climatizados, utilizem esta Orientação Técnica como instrumento técnico referencial, na realização de inspeções e de outras ações pertinentes nos ambientes climatizados de uso público e coletivo.

A mesma resolução recomenda que os padrões referenciais adotadas por esta Orientação Técnica sejam aplicados aos ambientes climatizados de uso público e coletivos já existentes e aqueles a serem instalados, no que diz respeito à definição de valores máximos recomendáveis para contaminação biológica, química e parâmetros físicos do ar interior, a identificação das fontes poluentes de natureza biológica, química e métodos analíticos.

O Valor Máximo Recomendável - VMR, para contaminação microbiológica deve ser 750 UFC/m³ de fungos, para a relação I/E 1,5, onde I é a quantidade de fungos no ambiente interior e E é a quantidade de fungos no ambiente exterior. Quando o VMR for ultrapassado ou a relação I/E for > 1,5, é necessário fazer um diagnóstico de fontes poluentes para uma intervenção corretiva.

Essa resolução utiliza como referência para contaminação microbiológica apenas a contagem de fungos, e diz que é inaceitável a presença de qualquer fungo patogênico no ambiente, entretanto não faz referência alguma a presença e controle de bactérias patogênicas, fato de grande importância uma vez que é sabido que existem bactérias capazes de causar danos à saúde humana e que podem ser transmitidas por via aérea.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar a presença de *Legionella* spp. em amostras de água de bandejas de sistemas de ar condicionado, uma vez que estes locais são ambiente propício à proliferação desse microrganismo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a presença e concentração de bactérias do gênero *Legionella* em amostras de água de sistemas de ar condicionado;
- Identificar as espécies e os sorogrupos de *Legionella* sp. encontradas;
- Determinar condições higiênico sanitárias dos sistemas de ar condicionado estudados, mediante a quantificação de bactérias heterotróficas nas amostras de água;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. AMOSTRA E AMOSTRAGEM

Para a coleta das amostras, foram seguidas as técnicas descritas no “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”. 20th edition.

Foram coletadas para análise, amostras de água de bandejas de sistemas de ar condicionado de edifícios localizados no município de São Paulo, no período de agosto de 2007 a julho de 2008, respeitando-se uma frequência bimestral. Foram coletadas seis amostras de água em cada ponto, totalizando 41 amostras. Os pontos de coleta foram:

- um Centro Comercial (CC) na Zona Sul (Figura 3), onde foram coletadas amostras de água em três máquinas identificadas por: CC(M1); CC(M2); CC(M3);
- uma Instituição de Ensino Superior (IES) na Zona Oeste (Figura 4);
- dois Hospitais, HO-1 onde foram coletadas amostras de água em duas máquinas identificadas por HO1(M1); HO1(M2); e HO2 ambos localizados na Zona Oeste (Figuras 5, 6 e 7).

Os aparelhos de refrigeração dos sistemas de ar condicionado em geral localizavam-se em salas de máquinas, dentro do próprio edifício (IES, CC e HO-1), com exceção do HO-2 onde as máquinas se localizavam em uma casa de máquinas situada ao lado do prédio do hospital.

Foram coletadas amostras de 1 litro de água, ou máximo volume possível, provenientes das bandejas dos sistemas de ar condicionado. Em alguns casos, quando evidenciada a presença de biofilme, como complemento, era realizada a coleta deste material utilizando-se o *swab*, em estruturas do aparelho, para a verificação da presença de *Legionella sp.* no biofilme.

As amostras de água foram coletadas com o auxílio de seringas estéreis de 60 mL e armazenadas em frascos de plástico atóxico, devidamente limpos e esterilizados. As amostras foram mantidas em recipiente térmico durante o transporte até a chegada ao Laboratório de Análises Biológicas do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública-USP, onde foram realizadas as análises.

O período decorrido entre a coleta do material e o processamento das amostras no laboratório foi de, aproximadamente, duas horas.

Figura 3: Sistema de ar condicionado localizado no Centro comercial (CC)



Bandeja de água

Entrada de Ar

Figura 4: Sistema de ar condicionado localizado na Instituição de ensino superior (IES)

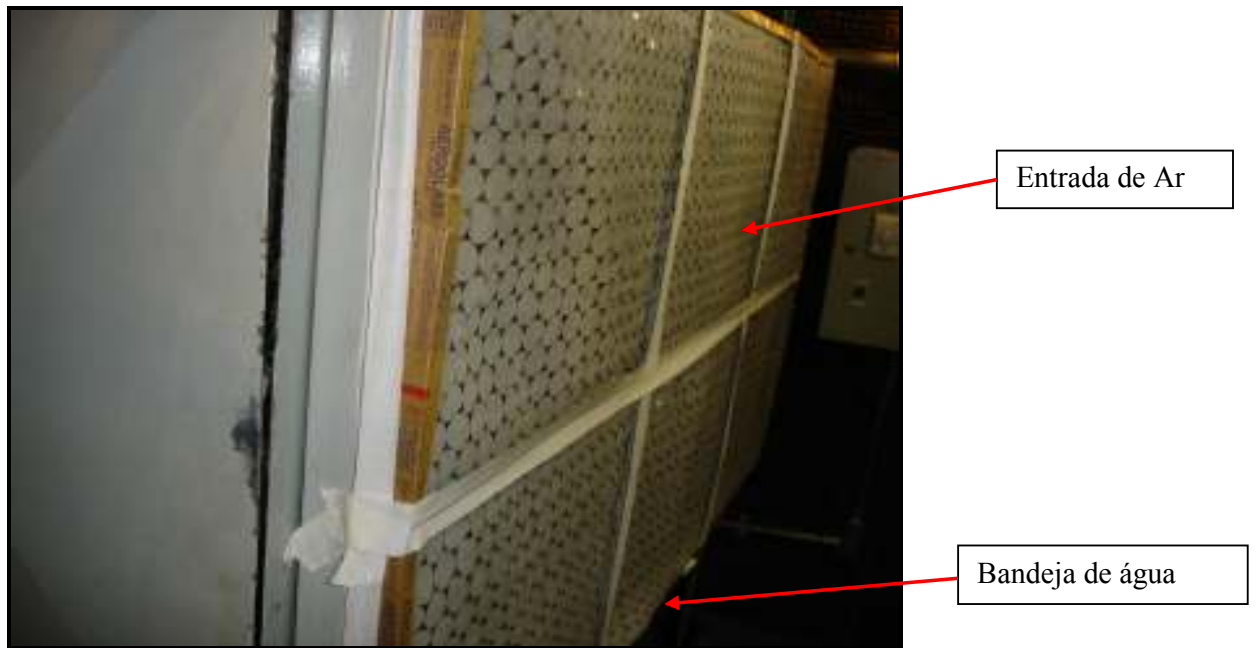


Figura 5: Sistema de ar condicionado localizado no Hospital 1 - HO1(M1)

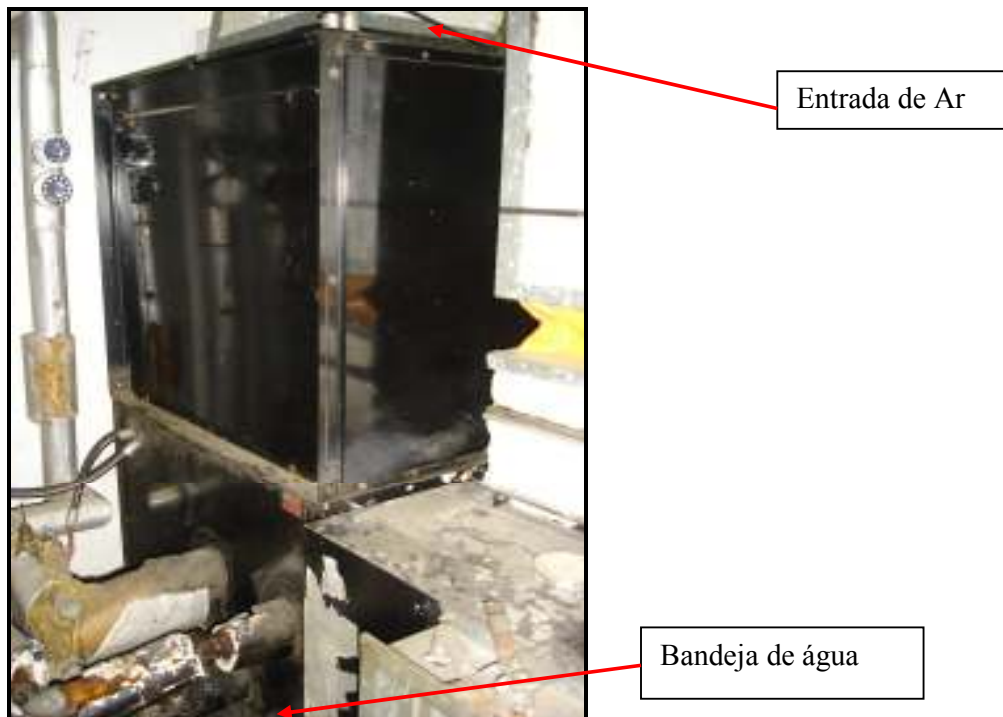


Figura 6: Sistema de ar condicionado localizado no Hospital 1 - HO1(M2)

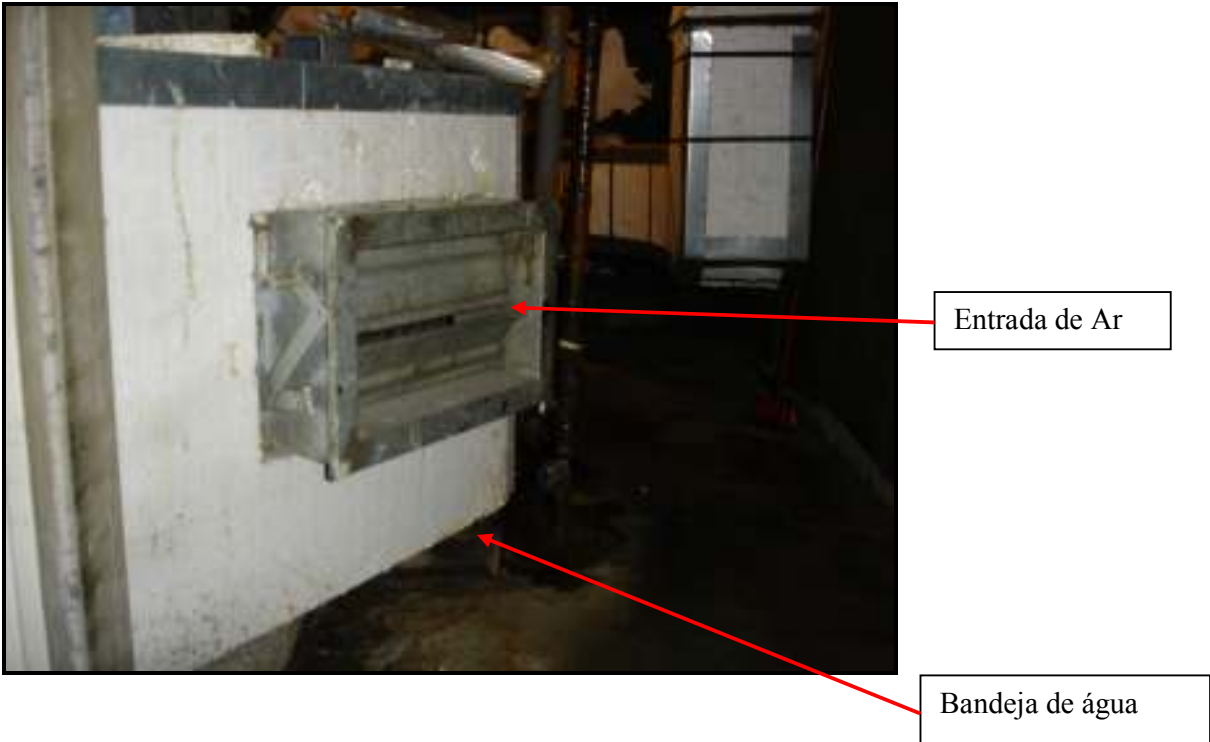


Figura 7: Sistema de ar condicionado localizado no Hospital 2 (HO-2)



5.2. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Legionella*

Para o isolamento e identificação de bactérias do gênero *Legionella*, as amostras de água passaram por um processo de concentração por filtração em membrana, de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th ed (2000)* como ilustrado na Figura 8.

As amostras coletadas no período de 27/08/07 a 08/04/08 foram concentradas em membrana de éster de celulose de 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,45µm; já as amostras coletadas no período de 12/05/08 a 15/07/08 foram concentradas em membrana de policarbonato de 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,22 µm.

Após a concentração na membrana, o material retido era ressuscitado em um tubo cônico tipo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de água destilada, submetido à agitação utilizando-se agitador de tubos tipo *vortex*, por três vezes durante trinta segundos.

Após a ressuspensão do material aderido à membrana, volume de 1mL da amostra foi submetido ao tratamento com ácido e o restante da amostra não foi submetida a este tratamento.

Para o tratamento com ácido, 1,0mL da amostra foi transferido a um tubo de ensaio e a esse volume foi adicionado 1,0 mL da solução para tratamento ácido (KCl/HCl 0,2M). A solução é mantida em repouso por 15 minutos, após o qual adicionou-se 1,0 mL de solução alcalina (KOH 0,1N) para neutralizar a ação do ácido.

Uma alíquota de 0,1mL de cada uma das amostras: tratada com ácido e não tratada; foram inoculadas em triplicatas, pela técnica de *spread plate*, em placas de Petri contendo *Buffered Charcoal Yeast Extract Alpha base* (BCYE-alfa) e BCYE-alfa suplementado com glicina, vancomicina, polimixina B e Cicloeximina (GVPC). As placas de Petri foram incubadas a 35°C ±0,5°C.

Após 48 horas de incubação, foi feita a primeira leitura de placas com o auxílio de um contador de colônias. Após a primeira leitura, as placas

foram incubadas por um período de até oito dias, sendo examinadas diariamente durante todo o período. As colônias típicas (Figura 9 a e b) foram transferidas para os meios de cultura *Buffered Charcoal Yeast Extract Alpha base* (BCYE-alfa) e *Buffered Charcoal Yeast Extract Alpha base* (BCYE) sem cisteína, e incubadas a $35^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para confirmação do gênero *Legionella*.

Figura 8: Representação esquemática do processo de concentração por filtração em membrana e isolamento de organismos do gênero *Legionella*

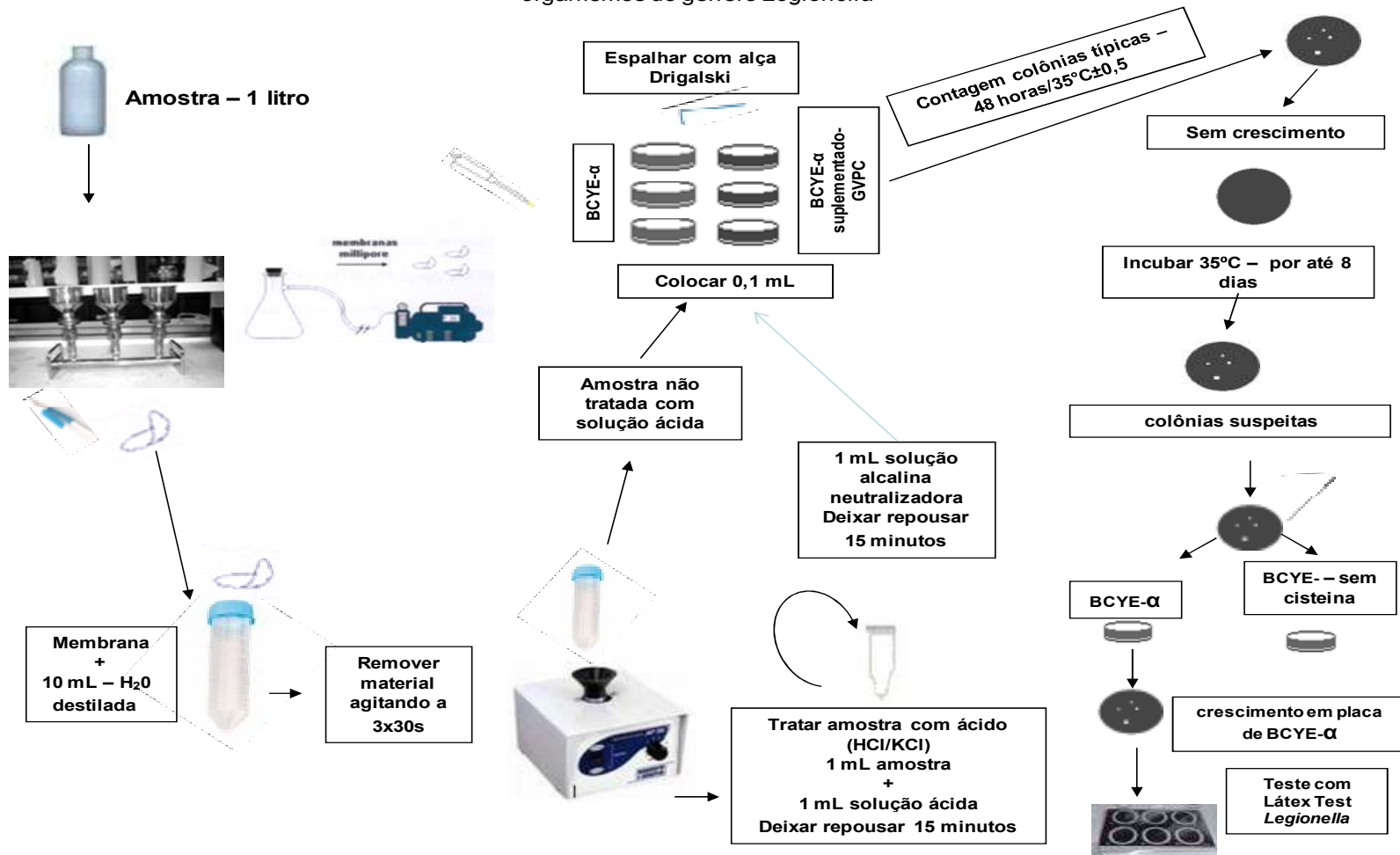


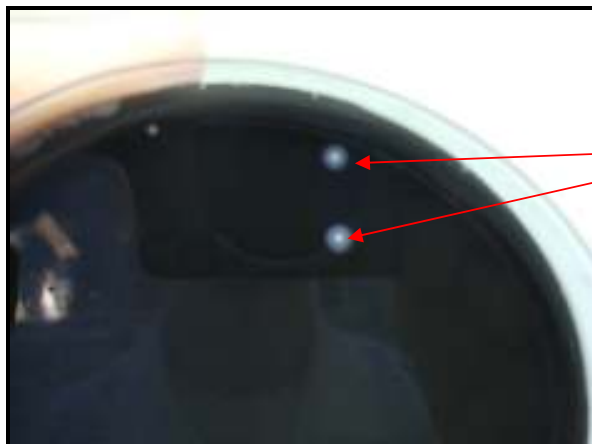
Figura 9: Colônias de *Legionella* sp. em meio seletivo BCYE- α

a:



Colônia típica de *Legionella* sp.

b:



Colônia *Legionella* sp.
(INCQS 00437 correspondente
a ATCC33737)

As colônias confirmadas como *Legionella* sp. foram submetidas ao teste de látex Oxoid®, para identificação de espécies.

O teste de látex (Figura 10) é composto por uma cartela de reação, uma suspensão tampão e seis reagentes, o primeiro reagente identifica *Legionella pneumophila* sorogrupo 1, consiste de partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho específicos contra o antígeno do sorogrupo 1. O segundo identifica *Legionella pneumophila* sorogrupos 2 a

14, o qual consiste de partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho específicos contra o antígeno do sorogupo 2 a 14. O terceiro trata-se de um soro polivalente que identifica seis prováveis espécies sendo: *L.longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei*, *L.anisa*, consiste de partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho específicos contra essas seis espécies. O quarto reagente é um controle positivo, ou seja, é uma suspensão polivalente de células de *Legionella* em tampão e o quinto reagente é um controle negativo trata-se de uma suspensão de células de *L. spiritensis* em tampão não reativo com os reagentes do teste. O quarto e quinto reagentes são utilizados para verificação do correto funcionamento dos reagentes do látex. O sexto reagente é um látex de controle, consistindo de partículas de látex azul sensibilizadas com globulina de coelho não reativa.

Para o controle positivo dos testes de látex foi utilizada uma cepa de *Legionella pneumophila* INCQS 00437 correspondente a ATCC 33737; e para o controle negativo foi utilizada água destilada.

Figura 10: Teste de Látex (Oxoid®) para identificação de *Legionella* sp.



Para a identificação com o teste de aglutinação, foram seguidas as instruções do fabricante. Foi transferida uma gota de solução tampão e de cada um dos reagentes a um dos quatro círculos existentes no cartão de reação. Com o auxílio de uma alça bacteriológica, as colônias foram removidas do meio de cultura, misturadas a solução tampão até se obter uma suspensão homogênea, foram realizados movimentos circulares para homogeneização dos reagentes.

A cartela permanecia em repouso por 1 minuto para que se pudesse observar a reação. Em caso positivo era observada reação de aglutinação (Figura 11a) e em caso negativo não se observava aglutinação (Figura 11b).

Figura 11: Reações observadas no teste de Látex Oxoid® para identificação de *Legionella* sp.

a: Reação positiva



b: Reação negativa



5.3. CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

Para a avaliação das condições higiênico-sanitárias dos sistemas de ar condicionado estudados, foi realizada a quantificação de bactérias heterotróficas.

As análises das amostras foram realizadas de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Ed (2000)*.

Volumes de 0,1 e 1,0 mL de amostra foram inoculados em duplicata em placas de Petri, com adição de meio de cultura fundido "Plate Count Agar" (PCA) a 45°C. Após a adição do meio e homogeneização, as placas foram incubadas a 35°C ± 0,5°C por 48 horas.

Após o período de incubação realizou-se a contagem com o auxílio de um contador de colônias.

A concentração de bactérias foi obtida calculando-se a média das contagens de colônias de cada duplicata.

Quando as placas apresentavam mais de 300 colônias, a contagem foi realizada como segue:

- menos de 10 colônias por cm² a contagem era feita em 13 quadrados do contador de colônias que apresentavam uma distribuição representativa de colônias e o valor obtido era multiplicado por 4,4 para obter o número estimado de colônias quando a área da placa era de 57cm².
- mais de 10 colônias por cm² a contagem era realizada em quatro quadrados representativos e a média obtida era multiplicada por 57 para se obter o número estimado de unidades formadoras de colônias.

Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Quando as placas não apresentavam crescimento de colônias, o resultado foi expresso como < 1 UFC/mL.

5.4- AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO

Com o intuito de avaliar o desempenho da técnica utilizada para o isolamento e quantificação de bactérias do gênero *Legionella*, foram determinadas as taxas de recuperação desses organismos em amostras de água.

Para essa avaliação foi utilizado um material de referência denominado “lentícula”. Trata-se de um tablete com uma concentração conhecida de *Legionella pneumophila* produzido pela *Health Protection Agency (HPA)*, cedido pelo Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB. O anexo 1 exibe a ficha de procedimentos para a utilização e controle das lentículas, fornecido pela *Health Protection Agency (HPA)*.

5.4.1- PROCEDIMENTOS

A lentícula foi reidratada em 1 mL de água de diluição conforme instruções do fabricante (anexo 1), o tubo de ensaio contendo a solução foi então vertido em um frasco estéril contendo 1 litro de água de diluição estéril. O tubo de ensaio foi “lavado” diversas vezes com a mesma água contida no frasco, para que todo o material fosse removido

Após a obtenção dessa suspensão, a mesma foi submetida ao mesmo processo de concentração pela qual passam as amostras, de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastwater 20th Ed (2000)*.

A suspensão foi concentrada em membrana de policarbonato de 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,22 µm. O material retido na membrana foi ressuscitado em 10 mL de água destilada e esterilizada.

Volume de 1mL da suspensão ressuscitada, foi submetida a tratamento ácido. Após o tratamento, 0,1mL da solução tratada com ácido e não tratada com solução ácida foram inoculadas em meio BCYE-α e BCEY-GVPC. As placas foram incubadas a 35°C ± 0,5°C.

A primeira leitura das colônias foi realizada após 48 h de incubação. Após a primeira leitura as placas foram incubadas por um período de até oito dias, sendo analisada diariamente durante todo o período.

O procedimento para a determinação das taxas de recuperação de *Legionella pneumophila* foi realizado cinco vezes. Três vezes utilizando inóculo de 0,1mL e duas com inóculo de 0,5mL da solução de *L.pneumophila*, com o objetivo de avaliar se o aumento do volume do inóculo proporcionaria melhores resultados na recuperação de células.

A porcentagem da taxa de recuperação foi calculada por meio da equação:

$$R = \left[\frac{\text{UFC}}{4,38 \times 10^4} \right] \times 100$$

Onde: R= Recuperação (%)

UFC= Número de colônias por mL na amostra com *Spike*

$4,38 \times 10^4$ = Número de colônias por mL contidos na lentícula

O desvio padrão das taxas de recuperação foram calculados por meio da seguinte equação:

$$SD = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / n - 1}$$

Onde:

SD= Desvio padrão

x_i = Valor de cada evento individual

\bar{x} = média aritmética dos valores x_i

n= número de eventos

5.5.- PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Durante a coleta das amostras, foram realizadas medições para verificar parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura e cloro residual.

Para a medição do pH foi utilizada fita de pH da marca Merck®, indicador universal pH 0-14.

A temperatura foi medida utilizando-se termômetro de mercúrio com escala de -1,0 a 110°C da marca Incoterm.

Para a determinação do teor de cloro residual, foi utilizado o *kit* Cloro fornecido pela Policontrol, Instrumentos de Controle Ambiental, Industrial e

Comercial Ltda., que determina o teor de cloro residual nas amostras de água analisadas através do método DPD.

A reação entre o cloro e o reagente DPD (*N*-dietil-*p*-fenileno-diamina), produz uma coloração rósea cuja intensidade é proporcional a quantidade de cloro na amostra analisada. A intensidade da reação é medida em faixas de 0,1 a 3,0 mgCl/L.

6- RESULTADOS

Neste trabalho, foram coletadas amostras de água de sistemas de ar condicionado de quatro edifícios localizados no município de São Paulo. As coletas das amostras ocorreram no período de agosto de 2007 a julho de 2008. Os resultados obtidos com as análises das amostras de água estão representados na tabela do anexo 3.

6.1- OCORRÊNCIA DE *Legionella* sp.

Das 41 amostras de água provenientes dos sistemas de ar condicionado avaliadas, 4 (9,7%) apresentaram resultados positivos para a presença de *Legionella* sp. como ilustra figura 12. A Tabela 1 ilustra os resultados obtidos na análise das amostras de água obtidas, segundo pontos de coleta.

Figura 12: Porcentagem de amostras positivas para *Legionella* sp. em amostras de água coletadas de sistemas de ar condicionado, município de São Paulo, agosto de 2007 a julho de 2008.

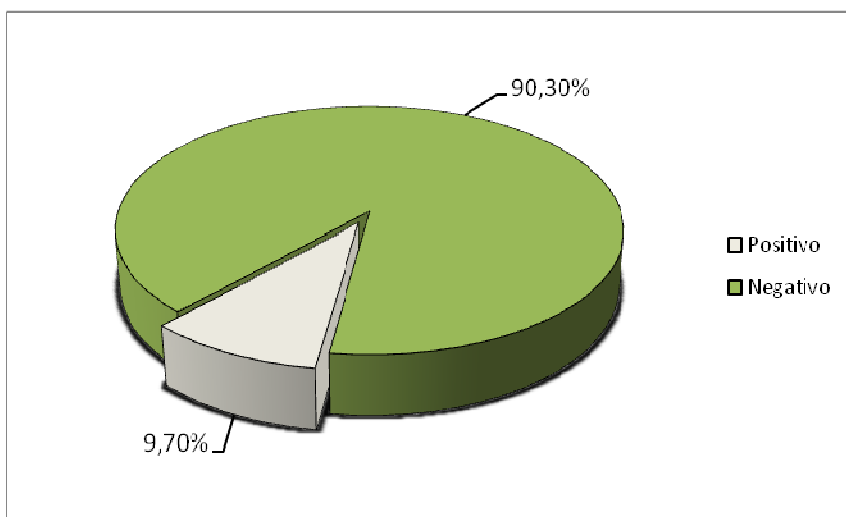


Tabela 1: Detecção e identificação de *Legionella* sp. segundo pontos de amostragem.

Amostra	Mês	Local	Resultado	Espécie	UFC/L
1	ago/07	HO1(M1)	negativo	-	-
2	ago/07	HO1(M2)	negativo	-	-
3	ago/07	HO2	negativo	-	-
4	set/07	CC(M1)	negativo	-	-
5	set/07	CC(M2)	negativo	-	-
6	set/07	CC(M3)	negativo	-	-
7	out/07	HO1(M1)	negativo	-	-
8	out/07	HO1(M2)	negativo	-	-
9	out/07	HO2	negativo	-	-
10	nov/07	IES	negativo	-	-
11	nov/07	CC(M1)	negativo	-	-
12	nov/07	CC(M2)	negativo	-	-
13	nov/07	CC(M3)	negativo	-	-
14	dez/07	HO1(M1)	negativo	-	-
15	dez/07	HO1(M2)	positivo	*	1,6x10 ²
16	dez/07	HO2	negativo	-	-
17	jan/08	IES	negativo	-	-
18	jan/08	CC(M1)	negativo	-	-
19	jan/08	CC(M2)	negativo	-	-
20	jan/08	CC(M3)	positivo	*	1.3x10 ²
21	fev/08	HO1(M1)	positivo	<i>L.pneumophila</i> -sg1	1x10 ²
22	fev/08	HO1(M2)	negativo	-	-
23	fev/08	HO2	negativo	-	-
24	mar/08	IES	negativo	-	-
25	mar/08	CC(M1)	negativo	-	-
26	mar/08	CC(M2)	negativo	-	-
27	mar/08	CC(M3)	negativo	-	-
28	abr/08	HO1(M1)	positivo	*	2x10 ²

**L.longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei*, *L.anisa*

Sg1 Sorogrupo 1

CC(M1) Centro Comercial maquina 1

CC(M2) Centro Comercial Maquina 2

CC(M3) Centro Comercial maquina 3

IES Instituição de Ensino Superior

HO1(M1) Hospital 1 Maquina 1

HO1(M2) Hospital 1 maquina 2

HO2 Hospital 2

Continuação

29	abr/08	HO1(M2)	negativo	-	-
30	abr/08	HO2	negativo	-	-
31	mai/08	IES	negativo	-	-
32	mai/08	CC(M1)	negativo	-	-
33	mai/08	CC(M2)	negativo	-	-
34	mai/08	CC(M3)	negativo	-	-
35	jun/08	IES	negativo	-	-
36	jun/08	CC(M1)	negativo	-	-
37	jun/08	CC(M2)	negativo	-	-
38	jul/08	CC(M3)	negativo	-	-
39	jul/08	HO1(M1)	negativo	-	-
40	jul/08	HO1(M2)	negativo	-	-
41	jul/08	HO2	negativo	-	-

**L.longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei*, *L.anisa*

Sg1 Sorogrupo 1

CC(M1) Centro Comercial maquina 1

CC(M2)Centro Comercial Maquina 2

CC(M3) Centro Comercial maquina 3

IES Instituição de Ensino Superior

HO1(M1) Hospital 1 Maquina 1

HO1(M2) Hospital 1 maquina 2

HO2 Hospital 2

Três das quatro amostras que apresentaram resultado positivo para a presença de *Legionella* sp., foram obtidas no Hospital 1; das quais duas (33,3%) no ponto HO-1(M1), uma (16,7%) no ponto HO1(M2). A quarta amostra que apresentou resultado positivo para a presença de *Legionella* sp. foi obtida no Centro comercial CC(M3), como ilustrado na tabela 1.

No ponto HO1(M1), a primeira cepa isolada foi identificada como *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 e apresentou concentração de $1,0 \times 10^2$ UFC/L; enquanto que a segunda cepa isolada nesse mesmo ponto foi identificada como uma das seis prováveis espécies (*L.longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei*, *L.anisa*) e esta

apresentou uma concentração de $2,0 \times 10^2$ UFC/L. No ponto de coleta HO1(M2), a cepa presente também foi identificada como seis possíveis espécies (*L.longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei*, *L.anisa*) e apresentou concentração de $1,6 \times 10^2$ UFC/L.

No Centro Comercial foi isolada uma cepa no ponto CC(M3) que com o teste de látex foi possível identificá-la como uma das seis prováveis espécies (*L.longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei*, *L.anisa*) com uma concentração de $1,3 \times 10^2$ UFC/L.

Todas as cepas isoladas no presente trabalho foram obtidas em meio BCYE-GVPC de amostras que não passaram pelo tratamento com solução ácida.

6.2-BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

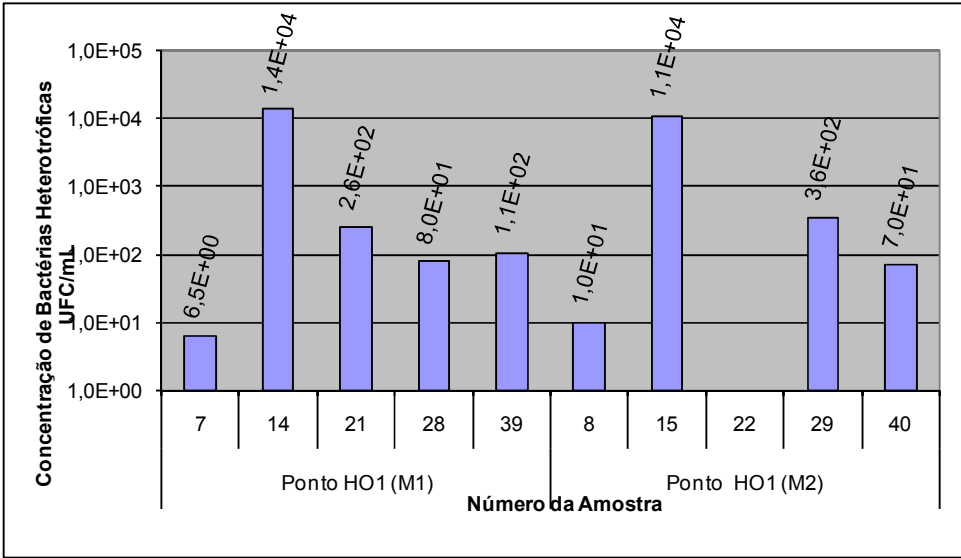
Os resultados obtidos na contagem de bactérias heterotróficas das amostras de água analisadas, indicam uma variação na concentração dessas bactérias, variando de <1 a $2,62 \times 10^4$ UFC/mL.

Como ilustrado na Figura 13 (a,b,c,d), pode-se observar que nos sete pontos de coleta houve uma maior concentração de bactérias heterotróficas nas amostras 12, 13, 14, 15, 16 que foram obtidas no período de novembro e dezembro, meses de verão, quando se espera uma maior temperatura média.

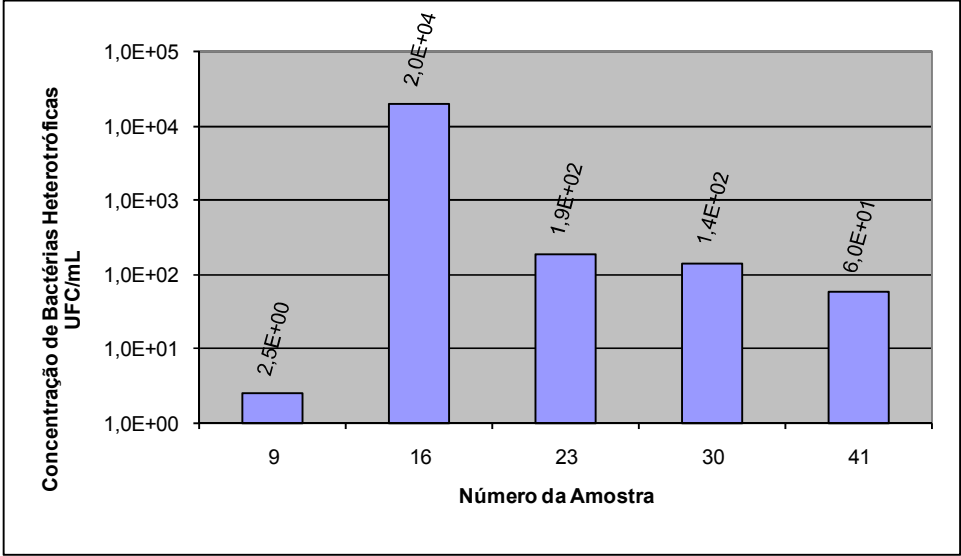
As amostras oriundas da Instituição de Ensino Superior (IES) apresentaram a menor média de concentração de bactérias heterotróficas, com valores de 35 UFC/mL. Entretanto, o ponto CC(M2) apresentou a maior concentração com valor máximo obtido de $2,62 \times 10^4$ UFC/mL.

Figura 13: Concentração de bactérias heterotróficas nas amostras de água analisadas, por ponto de amostragem.

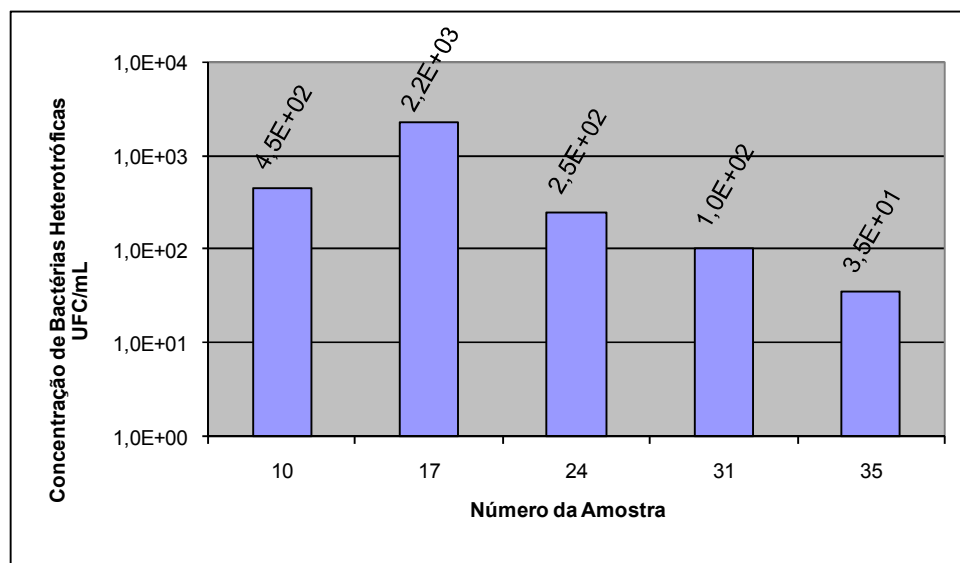
a: Hospital 1



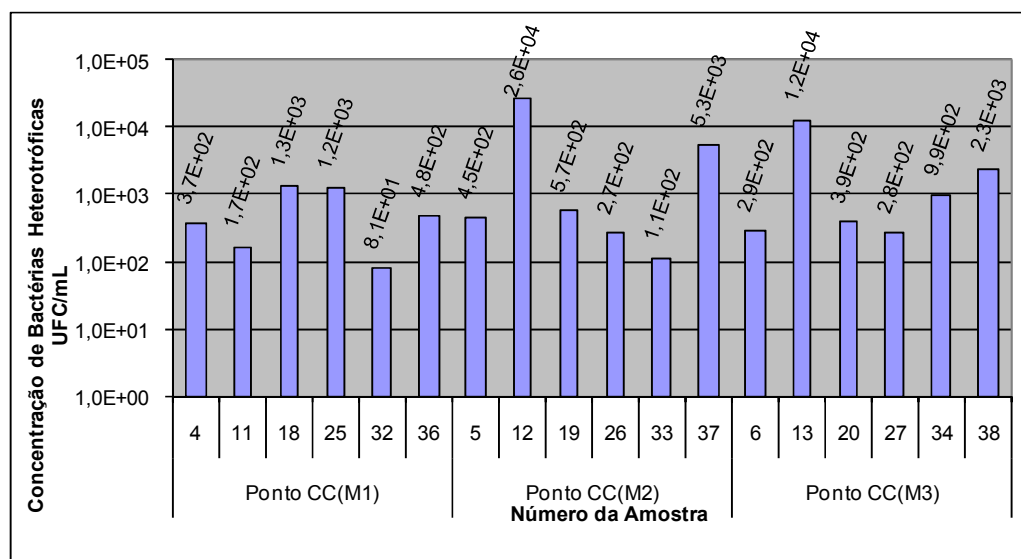
b: Hospital 2



c: Instituição de Ensino Superior



d: Centro Comercial



Os resultados ilustrados na Tabela 2, demonstram que foi constatada uma grande variação na concentração de bactérias heterotróficas entre os pontos onde foram isoladas *Legionella* sp.

Tabela 2: Concentração de bactérias heterotróficas e *Legionella* sp.

Número da amostra	Concentração de Bactérias Heterotróficas UFC/mL	Concentração de <i>Legionella</i> sp. UFC/L
1	NR	Ausente
2	NR	Ausente
3	NR	Ausente
4	3,72x10 ²	Ausente
5	4,50x10 ²	Ausente
6	2,91x10 ²	Ausente
7	6	Ausente
8	10	Ausente
9	2,5	Ausente
10	4,45x10 ²	Ausente
11	1,65x10 ²	Ausente
12	2,62x10 ⁴	Ausente
13	1,22x10 ⁴	Ausente
14	1,40x10 ⁴	Ausente
15	1,08x10 ⁴	1,6x10 ²
16	1,90x10 ⁴	Ausente
17	2.23x10 ³	Ausente
18	1,30x10 ²	Ausente
19	5,65x10 ²	Ausente
20	3,85x10 ²	1,3x10 ²
21	2,60x10 ²	1x10 ²
22	<1	Ausente
23	1,85x10 ²	Ausente
24	2,47x10 ²	Ausente
25	1,21x10 ³	Ausente
26	2,68x10 ²	Ausente
27	2,75x10 ²	Ausente
28	80	2x10 ²
29	3,55x10 ²	Ausente
30	1,40x10 ²	Ausente
31	1,04x10 ²	Ausente
32	81	Ausente

NR- Contagem de Bactérias Heterotróficas não realizada

Continuação:

33	1,08x10 ²	Ausente
34	9,90x10 ²	Ausente
35	35	Ausente
36	4,75x10 ²	Ausente
37	5,29x10 ³	Ausente
38	2,31x10 ³	Ausente
39	1,05x10 ²	Ausente
40	70	Ausente
41	60	Ausente

NR- Contagem de Bactérias Heterotóxicas não realizada

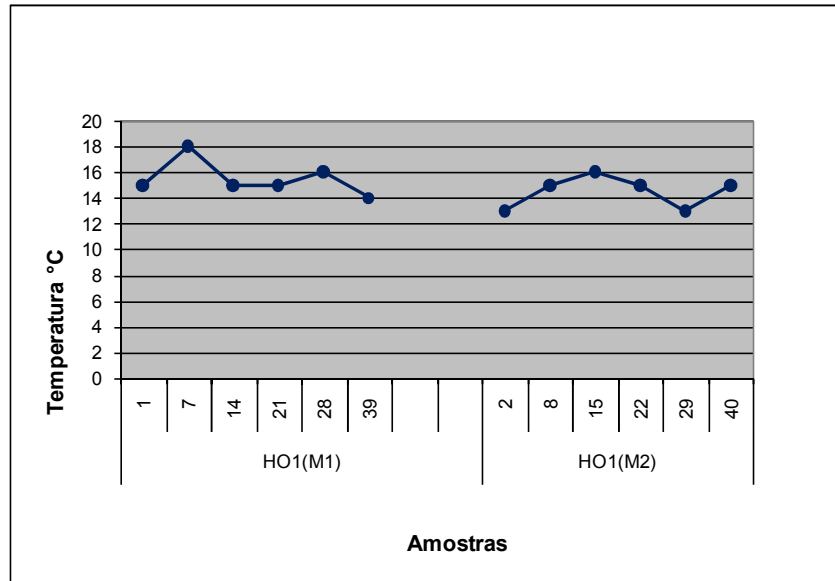
6.3 PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os valores obtidos nas medições de temperatura realizadas no momento da coleta das amostras de água, estão representados na figura 15 (a,b,c,d). A temperatura média nos locais de coleta foi de 14,1°C com máxima de 19°C e mínima de 12°C .

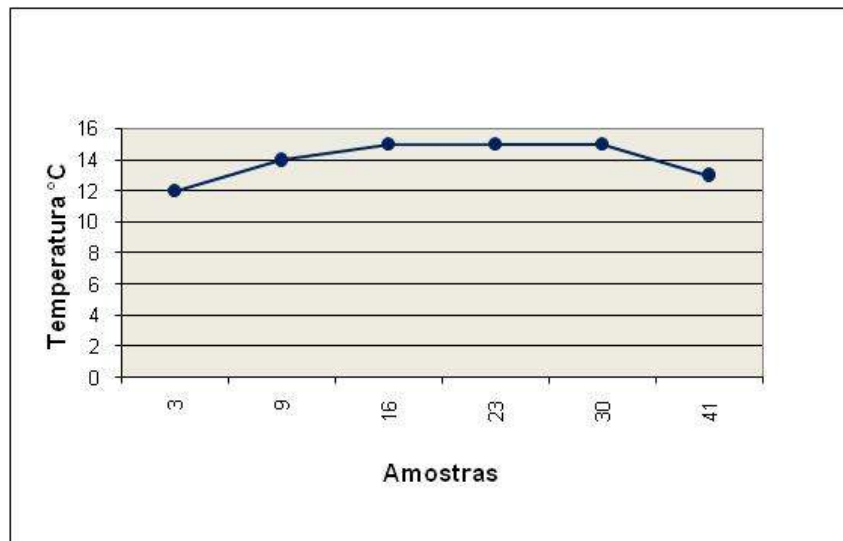
No Hospital 1, no ponto HO1(M1) a temperatura média da água registrada foi de 15,5°C, no ponto HO1(M2) a média foi de 14,5°C; no Hospital 2 (HO2) a temperatura média foi de 14°C, na Instituição de Ensino Superior (IES) a temperatura média foi de 15,2°C, já no Centro Comercial os valores médios de temperatura resgitrados nos pontos CC(M1), CC(M2) e CC(M3) foram 13°C,13,5°C e 13,5°C. respectivamente.

Figura 14: Variação de temperatura da água nos pontos de coleta

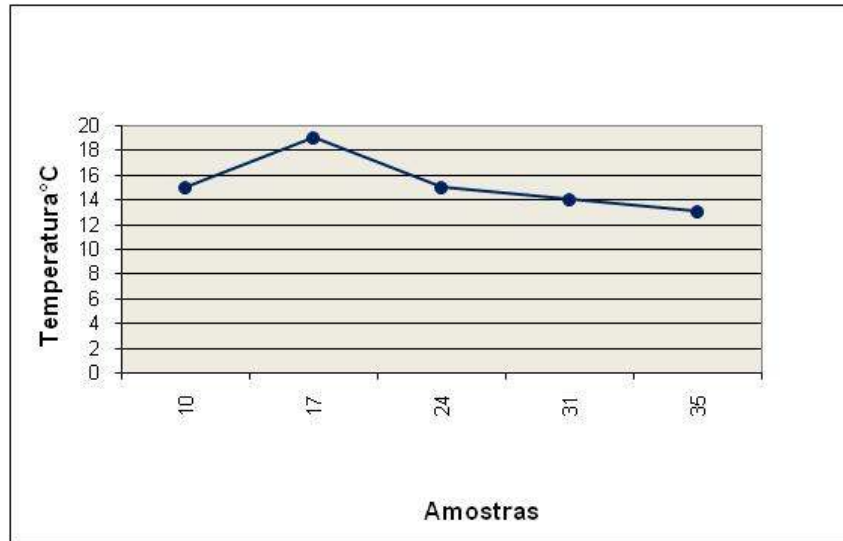
a: Hospital 1



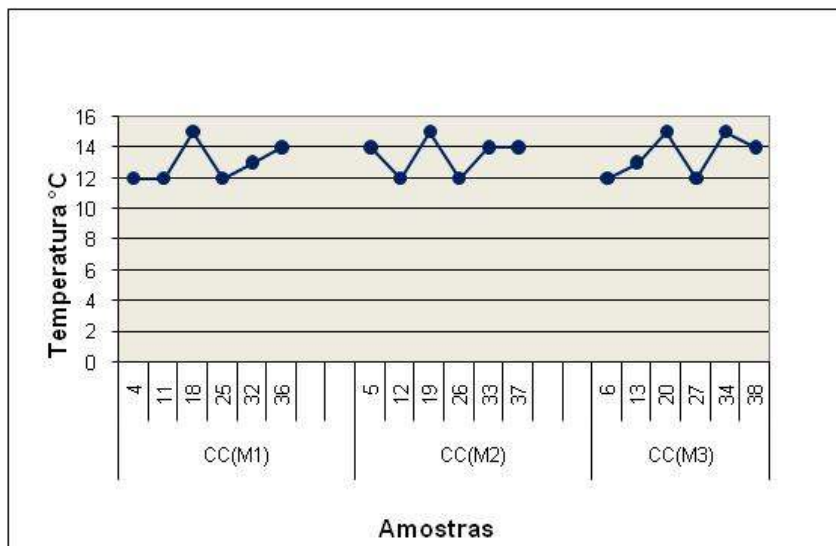
b: Hospital 2



c: Instituição de Ensino Superior



d: Centro Comercial



Durante as coletas também foram realizadas medições de cloro residual das amostras.

As medições de pH, apresentaram pouca variação nas amostras analisadas, uma (2,4%) apresentou valor de pH igual a 4, quatro (9,8%) pH igual a seis e 36 (87,8%) pH igual a 5.

No Hospital 1, ponto HO1(M1) não houve variação, todas as amostras apresentaram pH igual a 5, no ponto HO1(M2) as amostras 9 e 16 apresentaram pH 6 e a amostra 41 pH 4 as outras três amostras deste ponto apresentaram pH 5. No Hospital 2 (HO2) os valores de pH obtidos também foram 5 em todas as amostras analisadas.

Na Instituição de Ensino Superior (IES) apenas a amostra 31 apresentou pH 6 e as demais amostras apresentaram pH 5.

Já no Centro Comercial apenas a amostra 5 no ponto CC(M1) apresentou pH 6, as demais amostras deste ponto e dos pontos CC(M2) e CC(M3) apresentaram pH 5.

As medições de cloro, também apresentaram pouca variação, apenas a amostra 11 obtida na Instituição de Ensino Superior (IES) e 13 obtida no Centro Comercial (CC(M2)) apresentaram cloro residual, com valores de 0,1mgCl/L e 1,5mgCl/L respectivamente, enquanto as demais amostras apresentaram valores < 0,1mgCl/L.

6.4- AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO MÉTODO

Os dados obtidos com a determinação das taxas de recuperação para *Legionella pneumophila* são demonstrados na Tabelas 3 e 4.

Foi observada uma variação na taxa de recuperação de 51% a 75% com inóculo de 0,1mL.

Com inóculo de 0,5 mL a maior taxa de recuperação obtida foi de 58% e a menor de 57%.

Tabela 3: Taxa de recuperação de *Legionella pneumophila*, com inóculo de 0,1mL.

Teste	Alíquota	Concentração Inicial (UFC)	Número de células recuperadas (UFC/L)	%
1°	0,1 mL	$4,38 \times 10^4$	$2,33 \times 10^2$	51%
2°	0,1 mL	$4,38 \times 10^4$	$1,60 \times 10^3$	68%
3°	0,1 mL	$4,38 \times 10^4$	$1,80 \times 10^3$	70%
Média			$1,21 \times 10^3$	63%
Desvio padrão			$\pm 852,8$	$\pm 10,44$

Tabela 4: Taxa de recuperação de *Legionella pneumophila*, com inóculo de 0,5mL.

Teste	Alíquota	Concentração Inicial (UFC)	Número de células recuperadas (UFC/L)	%
4°	0,5 mL	4,38x10 ⁴	5,10x10 ²	58%
5°	0,5 mL	4,38x10 ⁴	4,30x10 ²	57%
Média			4,70x10 ²	57,50%
Desvio padrão			±56,56	±0,7

7- DISCUSSÃO

7.1- OCORRÊNCIA DE *Legionella* sp.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram a ocorrência de organismos do gênero *Legionella* em sistemas de climatização artificiais. A presença de *Legionella* sp. em sistemas de ar condicionado já havia sido relatada por outros autores em trabalhos similares a este.

No presente trabalho, das 41 amostras de água de sistemas de ar condicionado, 4 (9,7%) apresentaram resultado positivo para *Legionella* sp. sendo isoladas 3 cepas no hospital 1 e uma no Centro Comercial. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Pellizari e col.(1995), Türetgen e col. (2005) e Carvalho e col.(2007b), que obtiveram resultados semelhantes quanto à frequência de isolados em seus trabalhos.

Pellizari e col. (1995) realizaram um trabalho onde foram analisadas 69 amostras de água de residências, de prédios públicos, de ambientes hospitalares e industriais na cidade de São Paulo, das quais seis (8,7%) apresentaram resultado positivo para a presença de *Legionella* sp. Türetgen e col.(2005) analisaram 103 amostras de água de sistemas de ar condicionado das quais 27 (26%) apresentaram resultado positivo para a presença de *Legionella pneumophila*, já Carvalho e col.(2007b), analisaram 67 amostras de água de reservatórios naturais, torres de resfriamento, unidades dentárias, chuveiros, aquecedores e condensadores na cidade de São Paulo das quais 9 (13,4%) apresentaram resultado positivo para *Legionella* sp.

No presente trabalho três das quatro cepas de *Legionella* sp. obtidas, foram isoladas de amostras de água oriundas de hospitais, incluindo-se aí a presença de *L. pneumophila* e mais seis possíveis espécies de importância clínica, o que deve ser visto com atenção uma vez que esses organismos têm sido considerados como patógenos importantes nesses ambientes, responsáveis por causar pneumonias hospitalares e a presença de

Legionella sp. tem sido relatada em vários hospitais (Wellinghausen e col. 2001, Sabrina e Yu. 2002, Yamamoto e col. 2003)

As concentrações de *Legionella* sp. obtidas neste trabalho variaram de $1,0 \times 10^2$ UFC/L a $2,0 \times 10^2$ UFC/L, as quais coincidem com resultados obtidos por Bentham (2000), que analisou amostras de água de aparelho de ar condicionado relacionados a surtos de legionelose, e na maioria dos aparelhos obteve contagens inferiores a 100UFC/mL. Os resultados obtidos sugerem que altas concentrações de *Legionella* sp. nos sistemas de ar condicionado não são comuns e que provavelmente ocorram esporadicamente, podendo resultar surtos de legionelose (Bentham, 2000). Por isso é necessário um acompanhamento dos sistemas de ar condicionado, analisando-se várias amostras e não apenas uma única amostra, uma vez que essa variação provavelmente seja influenciada por fatores como temperatura, frequência de utilização dos aparelhos, e estação do ano (Bentham, 2000, Wéry e col. 2008).

Segundo Stout e col.(2003), a concentração de *Legionella* sp. não é relevante em uma avaliação de risco de surto de legionelose, e que um maior risco estaria associado à extensão da área colonizada por essa bactéria, o mesmo foi constatado por Armstrong e col. (2008) que relatam que a exposição a uma cepa virulenta é suficiente para que o indivíduo desenvolva a doença.

Nos resultados obtidos neste trabalho observou-se que as quatro amostras que apresentaram resultado positivo para a presença de *Legionella* sp., apresentaram concentrações de bactérias heterotróficas bastante distintas, com variação de 80 a $1,08 \times 10^4$ UFC/mL. Dados da literatura evidenciam existir uma possível associação entre o biofilme e a presença de bactérias do gênero *Legionella*, pelo fato de que o biofilme pode atuar como uma estrutura importante na proliferação desses organismos por conferirem uma proteção contra compostos nocivos e variações ambientais bruscas como temperatura, pH e salinidade (Doleans, 2004; Piao e col. 2006, Gerrieri e col. 2007). Aspecto interessante relatado por Alleron e col. (2008) é que além da capacidade de *Legionella* sp. interagir com amebas e

estruturas do biofilme, a bactéria pode diminuir sua capacidade metabólica, e entrar em um estado fisiológico viável porém não cultivável.

Entretanto, no presente trabalho, não foi possível comprovar tal relação dado o pequeno número de amostras positivas para presença de *Legionella* sp. e grande variação na concentração de bactérias heterotróficas encontradas nas amostras analisadas, como ilustrado na Tabela 2.

As temperaturas médias encontradas nos pontos de coleta deste estudo foram de 14,1°C. Rogers e col. (1994) demonstraram que essas bactérias são capazes de sobreviver em ambientes com temperaturas que podem variar de 20 a 70°C. E à medida que a temperatura diminui, também diminui a taxa de crescimento da bactéria, observando-se pouco ou nenhum crescimento em temperaturas abaixo de 20°C, quando o organismo pode estar viável no ambiente, porém não cultivável (Konishi e col. 2006; WHO, 2007).

As amostras positivas para a presença de *Legionella* sp. podem ser resultado de um procedimento de desligamento do sistema de ar condicionado durante o período noturno, conseqüente da diminuição ou paralisação das atividades nesses locais, resultando em aumento da temperatura desses sistemas. Wéry e col. (2008) realizaram um estudo para verificar a dinâmica das populações de *Legionella* spp. em sistemas de ar condicionado, e verificaram que maiores concentrações da bactéria e formação de biofilmes são encontrados quando os aparelhos são reativados após longos períodos de desativação. No entanto, no presente estudo as amostras positivas para a ocorrência de *Legionella* sp. foram encontradas em um dos hospitais estudados, onde provavelmente esses sistemas não sejam desligados durante o período noturno, entretanto no Centro Comercial esse procedimento pode ter sido adotado e então poderia explicar a ocorrência dessas bactérias.

Outro fator que pode ter influenciado os resultados e o número de células isoladas neste trabalho é o pH das amostras analisadas que estava sempre abaixo de 6. No trabalho realizado por Türetgen e col.(2005) em

Istambul na Turquia foi observado que só foram isoladas cepas de *Legionella sp.* em amostras com pH entre 8,84 a 8,99.

A baixa temperatura e pH ácido podem ter provocado alterações fisiológicas no organismo de forma que ele possa estar viável no ambiente porém não cultivável. Wellinghausen e col. (2001) destacam que o fato de a bactéria estar em um estado fisiológico não cultivável, é um fator limitante para o método de detecção em meio de cultura utilizado neste trabalho, já que com este método só é possível isolar organismos cultiváveis, o que poderia resultar na subestimação do número de organismos presentes no meio ambiente.

Outro fator que também pode ter influenciado os achados do trabalho é a competição por outros microrganismos de crescimento mais rápido, que podem inibir o crescimento de *Legionella sp.* em decorrência da presença de substâncias inibidoras resultantes de seu metabolismo (Carvalho e col. 2007a, Williams e col. 1996 apud Carvalho e col. 2007b).

Entretanto, com as técnicas tradicionais de cultivo em meio seletivo são isoladas apenas organismos viáveis, sendo uma informação importante uma vez que, estes organismos são capazes de se multiplicar podendo resultar em surto de legionelose (Catalan e col. 1997, Carvalho e col. 2007a).

O cloro, utilizado na desinfecção dos sistemas de ar condicionado também pode influenciar o crescimento de bactérias do gênero *Legionella*. Trabalho realizado por Gião e col. (2008), demonstrou que diferentes concentrações de cloro têm efeitos variáveis sobre o desenvolvimento de *Legionella sp.*. Em uma concentração de 0,2 mgCl/L a célula começa a perder sua capacidade de cultivo após 10 minutos de exposição, uma concentração de 0,7 mgCl/L as células perdem sua capacidade de crescimento após uma exposição de 30 minutos, já em uma concentração de 1,2 mgCl/L as células perdem sua capacidade de crescimento nos primeiros 10 minutos de exposição, porém nas três concentrações de cloro aplicadas no experimento as células não perdem sua viabilidade (Gião e col. 2008).

Entretanto, no presente trabalho não foi possível estabelecer uma relação entre a presença de *Legionella* sp. e a concentração de cloro nas amostras, uma vez que na maior parte das amostras as concentrações de cloro foram inferiores a 0,1mgCl/L e nas únicas amostras que apresentaram valores superiores a 0,1 mgCl/L não foram isoladas cepas de *Legionella* sp.

No presente trabalho o fato de terem sido isoladas cepas de *Legionella* sp. em amostras que não foram submetidas ao tratamento ácido, pode sugerir que esse processo seja desnecessário ou ainda que seja um fator de estresse resultando da perda da capacidade de crescimento. Porém, devido ao baixo número de isolados obtidos nesse estudo não é possível estabelecer tal relação.

No presente estudo não foi avaliado a concentração de íons metálicos nos pontos de coleta, porém a presença dessas bactérias pode estar associada a oferta de íons metálicos dissolvidos que é fonte de nutrientes importante para o metabolismo da bactéria (Van der Kooij e col. 2005).

Os resultados obtidos nessa pesquisa revelaram a importância do controle de bactérias do gênero *Legionella* em sistemas de ar condicionado, dado seu impacto negativo sobre a saúde de usuários de ambientes fechados, demonstrando a necessidade da implementação de planos de monitoramento em sistemas de ar condicionado, como uma medida preventiva a colonização por organismos patogênicos.

Uma sugestão seria a inclusão da quantificação de bactérias heterotróficas na Norma RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003 como um indicador das condições sanitárias de sistemas de ar condicionado e formação de biofilme uma vez que o biofilme proporciona condições favoráveis ao crescimento de outros microrganismos. A quantificação de bactérias heterotróficas é um procedimento simples, de baixo custo e de fácil aplicação.

Caso seja observada uma grande concentração de bactérias heterotróficas podem ser realizados estudos mais detalhados, para se verificar a presença de outros microrganismos com potencial patogênico, e

assim possam ser tomadas as medidas necessárias para o controle desses microrganismos.

7.2-AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO MÉTODO

Os resultados obtidos com a determinação das taxas de recuperação de *Legionella pneumophila*, indicaram recuperação de mais de 50% das células, em relação ao número de células presentes na solução original. Em um ensaio a taxa obtida foi de 70%.

A perda de células observada pode ter sido causada pela dificuldade na remoção das células retidas na membrana filtrante, ou ainda da possibilidade das células ficarem aderidas às estruturas do aparelho de filtração e na alça de Drigalski durante o processo de “espalhamento” do inóculo na superfície do meio de cultura.

A tentativa de se aumentar a recuperação de células, com o aumento do volume inoculado para 0,5 mL, não resultou em um aumento na recuperação das células, sendo que em um ensaio utilizando inóculo de 0,1 mL foi obtida taxa de 70% de células recuperadas frente aos 58% que foi o melhor resultado obtido com inóculo de 0,5mL

Outro aspecto observado com o inóculo de 0,5 mL foi a dificuldade em “espalhar” o inóculo de maneira uniforme sobre a superfície do meio de cultura, havendo pontos onde as colônias cresceram muito próximas umas às outras ou formando uma única estrutura dificultando sua contagem.

Talvez 0,5 mL de inóculo não seja um volume adequado, pois houve acúmulo do inóculo em algumas áreas da placa prejudicando a leitura e contagens das unidades formadoras colônias.

8-CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na presente investigação, pode-se concluir que:

1. Há ocorrência de organismos do gênero *Legionella* em sistemas de ar condicionado;
2. Houve maior frequência de isolados de *Legionella* sp. em amostras oriundas de hospitais;
3. Foi detectada a presença de *Legionella pneumophila* em uma amostra proveniente de um hospital;
4. Devido ao baixo número de resultados positivos, não foi possível relacionar a ocorrência de *Legionella* sp. com as concentrações de bactérias heterotróficas nos sistemas analisados;
5. Não foi possível relacionar as condições ambientais, como: temperatura, pH e concentração de cloro com a presença dessas bactérias nos sistemas estudados;
6. A técnica de detecção e quantificação de *Legionella* sp. apresentou taxa de recuperação média de 63% para inóculo de 0,1mL e de 57% para inóculo de 0,5 mL;
7. A identificação das espécies com o teste de látex é uma técnica bastante simples, rápida e viável, para identificar espécies de importância clínica;

São necessários planos de monitoramento em sistemas de ar condicionado, como medida preventiva a colonização por organismos patogênicos nesses sistemas de forma a proteger a saúde dos ocupantes e usuários de ambientes climatizados artificialmente.

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alleron L., Merlet N., Lacombe C., Frère J., Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the Viable but Nonculturable state after Monochloramine Treatment. *Curr. Microbiol.* 2008; 57:497-502.

American Public Health Works Association/Water Environment Federation (APHA); *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* (2000) 20th edition, Washington DC, USA.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003. Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em Ambientes Climatizados Artificialmente de Uso Público e Coletivo. Brasília (DF) 2003. disponível em: www.anvisa.gov.br acessado em 9/10/2007.

Apter A, Bracker A, Hodson M, Sidman J, Leung WY. Epidemiology of the sick building syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94:277-288.

Armstrong T.W. Haas C.N. Legionnaires' disease: evaluation of a quantitative microbial risk assessment model. *J. Water and Health.* 2008; 6(2):149-166.

Bartie C, Venter SN, Nel LH. Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Res.* 2003; 37: 1362-1370,.

Bentham H. R. Routine Sampling and the control of *Legionella* spp. In Cooling Tower Water Systems. *Curr. Microbiol.* 2000; 41:271-275.

Borella P, Montagna M.T, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, et. al. *Legionella* Infection Risk from Domestic Hot Water. Emerging Infectious Diseases. 2004; 10:457-464.

Breiman R.F., W. Cozen, B.S.Fields, T.D.Mastro, S.J.Carr, J.S. Spika, L. Mascola. Role of air sampling investigation of an outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser. J.Infect. Dis. 1990; 161:1257-1261.

Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE: Classification of the Legionnaires bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. ANN. Intern. Med. 1979; 90: 656-658.

Brenner DJ, Feeley JC, Weaver RE: Family VII *Legionellaceae* Brenner, Steigerwalt AG, McDade JE, Kreig NR, Holt JG (editores): In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ed. New York Springer, 2 ed. 2005: vol 1. Baltimore, Williams & Williams.

Brooks T, Osicki RA, Springthorpe, VS, Sattar SA, Filion L, Abrial D, Riffard S. Detection and Identification of Legionella species from groundwater. J. Toxicol. Environ. Health. 2004; v.67, p 1845-1859.

Buchbinder S., Trebesius K., Heesemann J. Evaluation of detection of *Legionella sp.* in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. Int. J. Med. Microbiol. 2002; 292: 241-245.

Cachafero S.P., Naveira I.M., Garcia I.G., Is copper-silver ionization safe and effective in controlling *Legionella*? J. Hosp. Infect. 2007; 67:209-216.

Carbonne A, Astagneau P. How to reduce the risk of Legionnaires disease? La Revue du praticien. 2005; 55(18).

Carvalho F.R.S., Vazoller R.F., Foronda A.N., Pellizari V.H.. Phylogenetic study of *Legionella* species in pristine and polluted aquatic samples from a tropical Atlantic forest ecosystem. *Curr. Microbiol.* 2007a; 55:288-293.

Carvalho F.R.S., Foronda A.S., Pellizari V.H. Detection of *Legionella pneumophila* in water and biofilm samples by culture and molecular methods from man-made systems in São Paulo-Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2007b; 38:743-751.

Castor M.L., E.A.Wagstrom, R.N. Danila, K.E. Smith, T.S. Naimi, J.M. Besser, K.A. Peacock, B.A. Juni, J.M. Hunt, J.M. Bartkus, S.R. Kirkhorn, R. Lynfield. An outbreak of Pontiac fever with respiratory distress among workers performing high-pressure cleaning at a sugar-beet processing plant. *J.Infect. Dis.* 2005; 191:1530-1537.

Catalan V., Garcia F., Moreno C., Vila M., Apraiz D. Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 1997; 148:71-78.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Legionnaires Disease Among Automotive Plant Workers- Ohio, 2001; 50:357-359.

Chang C.W., Chang W.L., Chang S.T. Influence of pH on bioactivity of cinnamon oil against *Legionella pneumophila* and its disinfection efficacy in hot springs. *Water res.* 2008; 42: 5022-5030.

Delgado-Vicogliosi P, Simonart T, Parent V, Marchand G, Dobbelaere M, Pierlot E, et. Al. Rapid Method for Enumeration of Viable *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* spp. in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 4086-4096.

Diederens BM, *Legionella* spp. and Legionnaire' disease. Journal of Infection (2007), Doi:10.1016/j.jinf.2007.09.010.

Diederens BM, Kluytmans JA, Vandembroucke-Grauls CM, Peeters MF. Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. J Clin Microbiol. 2008; 46(2):671-7

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 2002, 8: 881-890.

Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Clinical and Environmental Distributions of *Legionella* Strains in France Are Different. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 458-460

Edelstein P.H., Edelstein M. A. C. Comparison of three buffers used in the formation of buffered charcoal yeast extract medium. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:3329-3330.

Edelstein Paul H., Baofeng Hu, Takashi Shinzato, Martha A. C. Edelstein, Wenlian Xu, Maurice J. Bessman. *Legionella pneumophila* NudA Is a Nudix Hydrolase and Virulence Factor. Infect. and Immunity. 2005; 6567-6576.

Edvardsson B, Stenberg B, Bergdahl J, Eriksson N, Lindén G, Widman L, Medical and social prognoses of non-specific building-related symptoms (Sick Building Syndrome): a follow-up study of patients previously referred to hospital. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 2008; 81(7):805-12.

European Working Group For *Legionella* Infections (EWGLI). The European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaire' Disease. 2005. disponível em: www.ewgli.org/index.htm acessado em [25/12/2007](http://www.ewgli.org/index.htm).

European Working Group For *Legionella* Infections (EWGLI). The European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaire' Disease. 2008. disponível em: www.ewgli.org/index.htm acessado em 12/01/2009.

Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila* J Clin. Microbiol. 1979; 10(4):437-41

Ferreira AP, Risk and management in hospital water systems for *Legionella pneumophila*: a case study in Rio de Janeiro-Brazil. Int. J. Environ. Health. Res. 2004; 14, 453-459,.

Fields, B.S., T.Haupt, J.P. Davis, M.J.Arduino, P.H. Miller, J.C. Butler. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. J.Infect. Dis. 2001; 184:1289-1292.

Fields BS, Benson RF, Besser RE, *Legionella* And Legionnaires' Disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. 2002; 15:506-526,.

Flannery B, Gelling LB, vugia DJ, Weintraub JM, Salermo JJ, Conroy MJ, Stevens VA, Rose CE, Moore MR, Fields BS, Besser RE. Reducing *Legionella* Colonization of water systems with Monochloramine. Emerg.Infect. Dis. 2006; 12: 588-596.

Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. Ecological distribution of *Legionella pneumophila* Appl. Environ. Microbiol1981, 41:9-16.

Garcia-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, Gonzales-Diego P, Jiménez-Buñuales T, Rodrigues M, Lopez R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Baladron B, Pelaz C. Legionnaires Disease Outbreak in Murcia, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:915-921.

Gião M.S., Wilks S.A., Azevedo N.F., Vieira M.J., Keevil C.W. Validation of SYTO 9 propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. *Microb. Ecol.* Nov. 2008. Doi 10.1007/s00248-008-9472-x

Guerrieri E., Bondi M., Borella P., Messi P. Influence of aquatic microorganisms on *Legionella pneumophila* survival. *New Microbiologica.* 2007; 30:247-251.

Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Ryan NJ, Tan AG, Gordon IR, Zwolak B, Leydon JA, Guest CS, Hart WG. An outbreak of Legionnaires disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. *The Medical Journal of Australia* 2004; 180(11):566-72.

Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, Lloyd RV, Cockerill FR. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39:2618-26.

Helbig J.H., John B. Kurts, Madallena C. P., Carmen P., PAUL Christian LU"CK. Antigenic Lipopolysaccharide Components of *Legionella pneumophila* Recognized by Monoclonal Antibodies: Possibilities and Limitations for Division of the Species into Serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 2841-2845.

Helbig JH, Benson RF, Pelaz C, Jacobs and Lück PC. Identification and serotyping of atypical *Legionella pneumophila* strains isolated from human and environmental sources. J. Appl. Microbiol. 2007; 100-105.

Herpers BL, de Jongh BM, van der Zwaluw K, van Hannen EJ. Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 2003, 41:4815-16,.

Horwitz MA: Toward an understanding of host and bacterial molecules mediating *Legionella pneumophila* pathogenesis. *Legionella* current Status and emerging perspectives. Am.Soc. Microbiol. 1993; 55-62.

Hussong D, Westfall HN, Goldwasser RA, Weiss E, Prevalence of antibodies to *Legionella* species in a series of patients in Israel. J Med Sci, 1986; 22(2):131-8

Ishimatsu S, Miyamoto H, Hori H, Tanaka I, Yoshida S. Sampling and Detection of *Legionella pneumophila* Aerosols generated from an Industrial Cooling Tower. Occup.Hyg. 2001; 45:421-427.

Isozumi R, Ito Y, Ito I, Osawa M, Hirai T, Takakura S, Inuma Y, Ichiyama S, Tateda K, Yamaguchi K, Mishima M. An outbreak of *Legionella pneumophila* originating from a cooling tower. J. Infect. Dis., 2005; 37:709-711.

Jaakkola, MS, Jaakkola JJK. Office Work Exposures and Adult-Onset Asthma. Environ. Health Perspect. 2007;115:7

Joly JR, Monitoring the presence of *Legionella*: where, when, and how? In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP (editors), *Legionella*: current status and emerging perspectives. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1993; p211-216.

Konishi T., Yamashiro T., Koide M., Nishizono A. Influence of temperature on growth of *Legionella* biofilm determined by precise temperature gradient. J. Biosci. and Bioeng. 2006; 101(6):478-484.

Koziol-montewka M, magrys A, Stojek N, palusinska-Szys M, danielak M, Wójtowicz M, et. al. Monitoring *Legionella* species in hospital water systems. Link with disease and evaluation of different detection methods. 2008 Ann. Agric. Environ. Med. 15:143-147

La Scola B, Birtles RJ, Greub G, Harrison TJ, Ratcliff RM, Raoult D. *Legionella drancourtii* sp. Nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004; 54:699-703.

Laumbach RJ, Kipen HM. Bioaerosols and sick building syndrome: particles, inflammation, and allergy. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2005; 5:135-139.

Leskela T., Tilsala T.A., Kusnetov J., Neubauer P. Breitenstein. Sensitive genus specific detection of *Legionella* by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay. J. Microbiol. Methods. 2005; 62(2):167-179.

Levin AS, Caiiffa Filho, HH, Sinto SI, Sabbaga E, Barone AA, Mendes CM. An outbreak of nosocomial Legionnaires' disease in a renal transplant unit in São Paulo Brazil. Legionellosis Study Team. J. Hosp. Infect 1991; 18:243-248,

Liu HL, LamLT, Hou CC, Xu Y, Chen XM, A study of *Legionella pneumophila* in Tianjin, China. Inter. Environ. health res.2006; 16(1).

Malan AK, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR, Litwin CM. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. J Clin Microbiol. 2003; 41(7):3060-3.

Marmot AF, Eley J, Building health: an epidemiological study of “sick building syndrome” in the Whitehall II Study. J. Occup. Environ. Med., 2006; 63(4):283-9

Mastro T.D., B.S. Fields, R.F. Breiman, J. Campbell, B.D. Plikaytis, and J.S. Spika, Nosocomial Legionnaires' disease and use of medication nebulizers. J. Infect. Dis. 1991; 163:667-671.

Miller L.A., J.L. Beebe, J.C. Butler, W.T. Martin, R. Benson, R.E. Hoffman, B.S. Fields. Use of polymerase chain reaction in an epidemic investigation of Pontiac fever. J. Infect. Dis. 1993; 168:769-772

Miller R.S., CWT. Preventing *Legionella*: Common Disinfection Techniques. Earthwise Environmental Inc. 2003; 23-25.

Miyamoto H., Yamamoto H., Arima K., Fujii J, Maruta K. Izu K. Shiomori T. Yoshida S. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63:2489-2494.

Morawska L. Droplet fate in indoor environments, or can we prevent the spread of infection?. Indoor Air. 2006; 16:335-347.

Namimatsu T, Tsuna M, Imai Y, Futo S, Mitsuse S, Sakano T, Sato S. Detection of Salmonella by using the colorimetric DNA/rRNA sandwich hybridization in microtiter wells. J Vet Med Sci..2000;62(6):615-9.

Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylor A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(2):125-32

Nguyen TMN, Illef D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, Haeghebaert S, Ganiayre F, Marcel F, Etienne J, Desenclos JC. A Community-Wide Outbreak of Legionnaires Disease Linked to Industrial Cooling Towers- How Far Can Contaminated Aerosols Spread? *J. Infect. Dis*. 2006; 193:102-11

Palmer C.J., G. Fred B., Bruce Roll, Christine P., Louis R.S., Roger S.F.. Detection of *Legionella* Species in Reclaimed Water and Air with the EnviroAmp *Legionella* PCR Kit and Direct Fluorescent Antibody Staining. *Appl. Environ. Microbiol*. 1995; 2:407-412.

Park M. Y., K.S.Ko, H.K. Lee, M.S. Park, Y.H. KooK., *Legionella busanensis* sp. nov. isolated from cooling tower water in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2003; 53:77-80

Pellizari VH, Martins MT. Occurrence of *Legionella sp* in water samples from a man made systems of São Paulo – Brazil. *Rev. Microbiol*. 1995, V 26, p186-191.

Piao Z, SZE CC, Barysheva O, Iida K, Yoshida S. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila* *Appl. Environ. Microbiol*. 2006; 72:1613-1622.

Pommer L, Fick J, Sundell J, Nilsson C, Sjöström M, Stenberg B, Andersson B. Class separation of buildings with high and low prevalence of SBS by principal component analysis. *Indoor air* 2004; 14: 16-23.

Rautio Jari, Kim Bundvig Barken, Juhani Lahdenperä, Antje Breitenstein, Soren Molin, Peter Neubauer. Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates. *Microbial Cell Factories*. 2003; 2:4.

Riffard AS, Douglass S, Brooks T, Sprigthorpe S, Filion LG, Sattar AS. Occurrence of *Legionella* in ground water: an ecological study. *Water Sci. Technol.* 2001; 43:99-102.

Rogers JA, Dowsett Ab, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60:1585-1592.

Sabrina M. Yu VL. Hospital-acquired legionellosis: solutions for preventable infection. *Infect. Dis.* 2002; 2(6): 368-373.

Sabrina M., J. Alvarez, A. Dominguez, A. Pedrol, G. Sauca, L. Salleras, A. Lopez, M. A. Garcia-Nuñez, L. Parron, M. P. Barrufet A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 2006;12(7):642-7

Saint C.P., HO L. A PCR for the identification and discrimination of *Legionella Longbeachae* . *J. Microbiol. Method.* 1999;37(7):245-53.

Santos UP, Rumell D, Martarello NA, Ferreira CSW, Matos MP. Síndrome dos edifícios doentes em bancários. *Rev. de Saúde Publica* 1992; 26(6).

Seppanen O, Fisk W.J., Association of ventilation system type with SBS symptoms in office workers. *Indoor air*, 2002, 12:98.112

Sheehan KB, Henson JM, Ferris MJ, *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71:507-511.

Shelton B. G., Flanders W.D., Morris G.K. Legionnaires' disease outbreaks and cooling towers with amplified *Legionella* concentrations. *Curr. Microbiol.* 1994; 28:359-363.

Socan M, Marinic-Fiser N, Kese D. Comparison of serologic tests with urinary antigen detection for diagnosis of legionnaires' disease in patients with community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 1999; 5(4):201-204.

Souza, C P *Legionella*. In Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN (editores), *Microbiologia*, 4^o edição, Atheneu, São Paulo; 2005, 203-206.

Sterling T D, Collet C, Rumell D. A epidemia dos “edifícios doentes”. *Rev. de Saúde Pública*, 1991; 25(1): 56-63.

Stout J.E., Victor L. Yu. Hospital-acquired Legionnaires' disease: new developments. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003, 16(4):337-341.

Tran Minh Nhu Nguyen, Daniele Illef, Sophie Jurraud, Laurence Rouil, Christine Campese, Didier Che, Sylvie Haeghebaert, François Ganiayre, Frederic Marcel, Jerome Etienne, Jean-Claude Desenclos A Community-Wide Outbreak of Legionnaires Disease Linked to Industrial Cooling Towers-How Far Can Contaminated Aerosols Spread? *Journal of Infectious Disease* 2006 1;193(1):102-11.

Triassi M., DI Popolo A., Ribera D'Aalcala G.,Albanese Z., Cuccurulollo S., Montegrosso S., Crispino M., Borella P., Zarrilli R.. Clinical and environmental distribution of *Legionella pneumophila* in a university hospital in Italy: efficacy of ultraviolet disinfection. J. Hosp. Inf. 2006; 62:494-501.

Tronel H, Hartemann P. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. App. Microbiol. 2009; 48:653-656.

Türetgen I, Sungur EI, Cotuk A. Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems, Environ. Monit. Assess. 2005 100:53-58

Türetgen I, Cotuk A. Monitoring of Biofilm-associated *Legionella pneumophila* on different substrata in Model Cooling Tower System. Environ. Monit. Assess. 2007; 125:271-279

Van Der Kooji D., Harm R. Veenendaal, Willj. H. Scheffer. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipers of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. Water Res. 2005; 39: 2789-2798.

Varvara M.B.S., Emmanuel V., Christos H., Larissa, A Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. Ass. Prof. infect. control .2007; 9:35.

Yamamoto N. Kubota T. Tateyama M. Koide M. Nakasone C. Tohyana M. Shinzato t. Higa F. Kusano N. Kawakami K. Saito A. Isolation of *Legionella Anisa* from multiple sites of a hospital water system: the eradication of *Legionella* contamination. J. Infect. Chemother, 2003; 9(2):122-125

Wadowsky RM, Yee RB, Mezmar L, Wing EJ, Dowling JN. Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures. *Appl. Environ. Microbiol* 1982, 43 :1104-10.

Wellinghausen N., Frost C., Marre R., Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time Light Cyclers PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:3985-3993.

Wéry N, Bru-Adan V, Minervini C, Delgènes JP, Garrelly L, Godon JJ, Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 3030-3037.

Winn WC, *Manual of Clinical Microbiology*. 7 ed. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. 1999; 572-582.

World Health Organization (WHO). Indoor air Pollutants: exposure and health effects. Copenhagen. (Euroreports and studies, 78), 1983.

World Health Organization (WHO). Epidemiology, prevention and control of legionellosis: memorandum from a WHO Meeting. WHO. 1990; 68:155-164.

World Health Organization (WHO). Legionellosis Copenhagen. WHO Regional Office for Europe (European Series n°285), 2005.

World Health Organization (WHO). Legionella and the prevention of legionellosis. WHO 2007.

ANEXOS

Anexo 1
Instruções da Health Protection Agency - HPA, para
manutenção e controle de Lentículas.



Certificate Number FS 500165



SAFETY DATA SHEET FOR INTERNAL QUALITY CONTROL MATERIALS: LENTICULE DISCS

1. Identification of the product and the establishment

Product: Tablet format (LENTICULE disc) with known content and number of bacteria.
Establishment: Health Protection Agency Water EQA
Newcastle Laboratory
Institute of Pathology
General Hospital, Westgate Road
Newcastle upon Tyne NE4 9BE

Telephone (08.30 – 17.00 hours) +44 (0) 191 272 4585
Telephone (Out of working hours) +44 (0) 191 233 6161 (ask for the Health Protection Agency Water
Emergency on-call person)

2. Composition/information on ingredients

Plastic vials containing bacteria of hazard groups 1 and 2 (as defined by the Advisory Committee on dangerous Pathogens, 2004 Approved List of Biological Agents <http://www.hpa.gov.uk/pathogens/misc2008>), in tablet format (LENTICULE disc) with silica gel desiccant. A Hazard Group 2 organism may cause human disease and may be a hazard to laboratory workers, but it is unlikely to spread to the community. The silica gel self-indicating (orange) inserts are not classified as dangerous material.

3. Hazards identification

Physico-chemical hazard: Not applicable
Health hazard: Minimal risk of infection provided good laboratory practice is observed
Environmental hazard: Not applicable

4. First aid measures

If accidental contact with material occurs, laboratory staff must follow local first aid procedures that are normally applied following exposure to an equivalent routine sample.

5. Fire fighting measures

Not applicable.

6. Accidental release measures

Pick up the dropped tablet (LENTICULE disc) with absorbent paper moistened with a suitable disinfectant. Wipe area with a similarly moistened pad of absorbent paper and subsequently sterilise all paper and the tablet (LENTICULE disc).

7. Handling and storage

Store at -20 \pm 5 $^{\circ}$ C. The material must be processed in a laboratory environment which, as defined by national regulations or guidelines, is suitable for the handling of micro-organisms of ACDP Hazard Group 2. Staff handling the material should have been trained in the handling of infectious biological material. The material should be treated with the same degree of care as would be exercised with equivalent samples and laboratory waste. Hand-to-mouth contact should be avoided while working with the material and normal hand-washing procedures relating to the handling of routine samples must also be observed.

8. Exposure controls/personal protection

Use good laboratory practice and wear appropriate protective clothing.

9. Physical and chemical properties

Inert odourless material.

10. Stability and reactivity

Long term storage will not increase the minimal risks of infection associated with handling the material.

11. Toxicological information

Not applicable.

12. Ecological information

Not applicable

13. Disposal considerations

The used material must be disposed of using an autoclave as for laboratory waste containing infectious micro-organisms and in accordance with all local and national regulations.

14. Transport information

Refer to national and international regulations for the transport of bacteria in Hazard Group 2 (Biological Substance, Category B; UN3373)

15. Regulatory information

EC Biological agents Hazard Category/Risk Group 2.

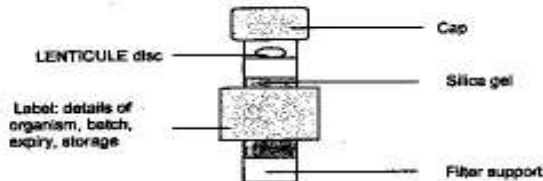
Note that this safety sheet does not constitute the user's own assessment of workplace risk as required by Health and Safety legislation.

Health Protection Agency Water EQA, LENTICULE discs for IQC, Newcastle Laboratory,
Institute of Pathology, General Hospital, Westgate Road, Newcastle upon Tyne NE4 6BE
Tel +44 (0)191 272 4585 Fax +44 (0)191 273 7292 e-mail:weqa@hpa.org.uk www.hpaweqa.org.uk
SDS/QCMLD/Issue 1a, 15.2.2007
Logo2/Issue 1a, 19.06.08



Certificate Number FS 500165

LENTICULE discs for IQC are microbiological reference materials, which are plano-convex discs containing micro-organisms at a defined number in a solid water soluble matrix. They are supplied as single units supported on a silica gel insert in a small airtight plastic tube - see diagram below. The discs are lens-shaped, are coloured and therefore easily seen on top of the filter insert.



As LENTICULE discs are water soluble they are easily reconstituted.

- Remove vial(s) to be used from freezer storage at $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- Leave to come up to room temperature - approx. 10-15 minutes
- Open the vial and remove the disc by simply inverting the vial over the medium to be used - solid or liquid. It can occasionally happen that during transit, the LENTICULE disc slips down the side of the vial between the insert; if this occurs, gently pull the insert out of the vial until the LENTICULE disc is free to be removed and placed onto, or into, the medium being used.

Any solid or liquid media can be used. However, please note, if using a selective medium, the recovery will usually be lower than on a non-selective medium.

Any volume of liquid medium can be used. Once added to the liquid leave to stand. When first added the LENTICULE disc may sink or float; if it floats there is no need to agitate as the disc will re-hydrate even if not completely submerged in the liquid.

DO NOT RE-HYDRATE DIRECTLY IN DISTILLED WATER as this will affect the recovery. First re-hydrate in a small volume of Maximum Recovery Diluent (MRD) or similar, and, once re-hydrated, transfer this entire volume distilled water.

- Leave for 10-15 minutes at room temperature to re-hydrate. Before proceeding, ensure that the disc is completely dissolved. As the disc is 'dry' and coloured, it can be easily seen when it is re-hydrated.
 - On solid media, the resulting 'drop' formed can be spread with a loop and incubated according to the standard operating procedure (SOP).
 - In liquid media, the re-hydrated disc is dispersed by shaking vigorously (e.g. 30 times in 15 secs). Leave to stand for approx 5 minutes to allow the 'froth' that forms to settle and disperse. The resulting suspension should be tested within one hour of reconstitution.

The use of an externally produced microbiological reference material is an important tool for checking the day to day performance of analytical processes within a laboratory. Ideally, these should be used as part of a Quality Assurance Programme together with participation in an External Quality Assessment Scheme.

- ✓ LENTICULE discs for IQC are ISO Registered.
- ✓ LENTICULE discs provide a means of an easy-to-use control material containing a quantified number of bacteria. Strains available are all traceable to NCTC cultures and are manufactured from ONE subculture thus ensuring that the characteristics are retained.
- ✓ The *indicative* mean count of any batch of Lenticules is method and media specific; data giving details of method(s) and media used is provided with each batch supplied. Potential differences in the use of Lenticules as supplied need to be understood and taken into consideration before implementing them as control materials.
- ✓ It is recommended that the customer should determine the mean for each batch of LENTICULE discs purchased using their specific methods, media and laboratory conditions.
- ✓ If the result obtained is different to the indicated mean for the batch, this does not mean that the LENTICULE disc has lost viability, but that the parameters used to assess the viability have altered.
- ✓ In any batch of LENTICULE discs, there will be an inevitable natural variation between the numbers of organisms in each disc. Therefore, the mean obtained by a customer may be different, lower or higher, than that given, but the counts obtained should be consistent and demonstrate this random variability by a Poisson distribution.
- ✓ ALL batches of LENTICULE discs are supplied in packs of 25 as single units in small air tight plastic vials, and cost £52.50 per pack.
- ✓ The recommended storage temperature for LENTICULE discs is $-20^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$. As they are a water soluble matrix, at temperatures below -30°C , the balance of this matrix may be altered, which can affect the subsequent recovery of organisms from the discs.
- ✓ Transport of LENTICULE discs does not require temperature controlled conditions; viability is not affected by ambient temperatures encountered during transit.

PLDFU/Issue 3, 14.2008

Health Protection Agency Water EQA, LENTICULE discs for IQC, Newcastle Laboratory,
 Institute of Pathology, General Hospital, Westgate Road, Newcastle upon Tyne NE4 6BE
 Tel +44 (0)191 272 4585 Fax +44 (0)191 273 7292 e-mail:weqa@hpa.org.uk www.hpaweqa.org.uk
 Logo2/Issue 1a, 19.06.06



LENTICULE DISCS FOR IQC

Microbiological Reference Material for Internal Quality Control

These discs were prepared from a traceable culture obtained freeze-dried from the National Collection of Type Cultures (NCTC) based at the Health Protection Agency, Colindale Laboratory, London.

The freeze-dried culture was reconstituted as per instructions and one sub-culture was made onto Legionella agar BCYE + cysteine supplement (Oxoid BCYE). After approx. 64 hours incubation at 37°C, a heavy suspension of this sub-culture was incorporated into 'Lenticulating Fluid' and control dried. These high count storage Lenticules (seed stock) are checked for purity and stored at -20°C (±5°C).

LENTICULE discs at a defined number are prepared from the high count storage Lenticules by dilution and without further sub-culture. Therefore, there has been only one subculture from the original freeze-dried culture received from NCTC. Each batch of LENTICULE discs is checked for homogeneity and stability.

For batches of discs with counts of e.g. 10^7 cfu/disc and above, a dilution is required to determine the *indicative mean*. The count given is determined on 10 discs which are reconstituted in an appropriate volume of maximum recovery diluent (Oxoid MRD). If necessary, serial dilutions (1 in 10) are done to cover a countable range. 8 replicates of 20 µl aliquots at an appropriate countable dilution are done and counted for each LENTICULE disc tested. The mean of all the counts obtained is that given for the batch. Details of testing for this batch are given below:

Re-hydration medium	Maximum recovery diluent (Oxoid, MRD)	
Re-hydration volume	1 ml	
Medium used	BCYE + cysteine supplement agar (Oxoid)	GVPC (Oxoid)
No. tested	10	10
Date tested	03.03.2008	03.03.2008
Incubation T°C	36.9 - 37.0°C	36.9 - 37.0°C
Incubation time	69 hours	69 hours
BCYE: read at: 10^{-1} dilution.		GVPC: read at @neat' i.e. re-hydration volume.
Actual counts: no. cfu/20 µl aliquot.		

1	68	109	90	59	86	83	82	76	4.08×10^4	64	71	65	62	47	64	52	70	3.09×10^3
2	93	121	88	100	72	79	83	108	4.65×10^4	75	81	77	77	85	74	85	84	3.99×10^3
3	99	92	113	97	94	93	103	116	5.04×10^4	76	81	69	74	84	71	76	84	3.84×10^3
4	87	87	109	91	91	69	105	97	4.60×10^4	61	57	73	51	57	59	68	70	3.10×10^3
5	78	83	87	101	99	114	83	87	4.58×10^4	61	55	72	66	64	64	49	59	3.06×10^3
6	91	87	92	78	9	84	74	85	3.75×10^4	54	51	72	70	63	52	56	51	2.93×10^3
7	79	92	89	81	93	96	81	85	4.35×10^4	72	64	58	63	77	72	64	55	3.28×10^3
8	76	83	82	85	76	84	75	83	4.03×10^4	51	61	60	59	58	72	65	53	2.99×10^3
9	98	98	94	95	85	90	97	98	4.72×10^4	79	72	72	75	75	71	77	71	3.70×10^3
10	77	87	93	72	83	72	78	76	3.99×10^4	51	52	45	62	54	63	55	59	2.76×10^3

Legionella pneumophila (Serogroup 1) NCTC 12821

310-080219

$m = 4.38 \times 10^4$ cfu/disc on BCYE
(Range $3.75 - 5.04 \times 10^4$)

$m = 3.28 \times 10^3$ on GVPC
(Range $2.76 - 3.99 \times 10^3$)

Expiry April 2009

prepared from one subculture of *L. pneumophila* NCTC 12821 (Batch No. 05) obtained as a freeze-dried culture from The National Collection of Type Cultures, (London).

For long term storage it is recommended that LENTICULE discs must be stored at -20°C ± 5°C.

As LENTICULE discs are a water soluble matrix, at temperatures below -30°C, the balance of this matrix may be altered which may affect the subsequent recovery of organisms from the discs.

Prior to use, the vial(s) containing the disc should be removed from freezer storage and allowed to come up to room temperature. The disc can be removed from the vial either by using fine forceps or simply by inverting the vial over the media to be used (see above). When using liquid media, the resulting suspension should be tested within one hour of reconstitution. The mean (indicative) number of organisms in each LENTICULE disc cannot be guaranteed if these conditions are not adhered to.

Health Protection Agency Water EQA, LENTICULE discs for IQC, Newcastle Laboratory, Institute of Pathology, General Hospital, Westgate Road, Newcastle upon Tyne NE4 6BE

Tel +44 (0)191 272 4585 Fax +44 (0)191 273 7292 e-mail: weqa@hpa.org.uk www.hpawega.org.uk

Logo/Issue 1, 1.2.2008

Anexo 2

Meios de cultura e Reagentes

Buffered Charcoal Yast Extrat (BCYE) Oxoid®.

Composto	g/Litro
Carvão ativado	2,0
Extrato de Levedura	10,0
Agar	13,0

No preparo do meio BCYE foram dissolvidos 12,5 gramas do meio em 450 mL de água destilada, a mistura foi homogeneizada e aquecida até que atingisse leve ebulição, para que o meio se dissolvesse por completo.

O meio foi então autoclavado a 121°C por 15 minutos.

O preparo da solução foi realizado seguindo indicações do fabricante.

Suplemento para BCYE (L-cisteína e pirofosfato férrico), para o crescimento de *Legionella* spp. Oxoid®.

Composto	Ampola para 100mL de meio BCYE
Hidróxido de Potássio	1,0g
Pirofosfato férrico	0,025g
L-cisteína	0,04g
α -ketoglutarato	0,1g

No preparo do suplemento Sr 110 L-cisteína e pirofosfato férrico, foi adicionado 10ml de água destilada estéril á ampola, esta era então agitada e até a dissolução do suplemento.

A solução era adicionada a 90 mL de meio BCYE.

O preparo da solução foi realizado seguindo indicações do fabricante.

Suplemento seletivo GVPC (glicina, vancomicina e polimixina β) Oxoid®.

Composto	Ampola para 500mL de meio
Glicina	1,5g
Vancomicina	0,5mg
Polimixina B	39600 μ l
Cicloeximina	40,0mg

No preparo do suplemento GVPC (glicina, vancomicina e polimixina β), foi adicionado 10ml de água destilada estéril á ampola, esta era então agitada e até a dissolução do suplemento.

A solução era adicionada a 500mL de meio BCYE- α

O preparo da solução foi realizado seguindo indicações do fabricante.

Plate Count Agar Difco®.

Composto	g/Litro
Caseina	5,0
Extrato de Levedura	2,5
Dextrose	1,0
Agar	15,0

No preparo do meio Plate Count Agar, foram dissolvidos 23,5 gramas de meio em 1 litro de água destilada, a mistura era então aquecida sob agitação frequente até a completa dissolução do meio.

O meio era então autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

O preparo da solução foi realizado seguindo indicações do fabricante.

Solução para tratamento ácido (KCl/HCl 0,2M).

Solução	Composto	
Solução A	0,2 M KCl	14,9 g/L
Solução B	0,2 M HCl	16,7 mL/L

Para a solução A, foram diluídos 14,9 gamas de KCl 0,2M em um litro de água destilada; para a solução B, foram diluídos 16,7 ml de HCl 0,2M em um litro de água destilada.

A solução de tratamento ácido, é composta de 18 partes da solução A e 1 parte da solução B. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos.

O preparo das soluções foi realizado segundo “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” 20th Ed(2000).

Reagente de neutralização alcalina.

Solução	Composto	g/Litro
Solução estoque	KOH 0,1N	6,46

Para a solução estoque, foram diluídos 6, 46 g de KOH em 1 litro de água destilada.

A solução de neutralização é composta de 10,7 ml da solução estoque 89,3 ml de água destilada. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos.

O preparo das soluções foi realizado segundo “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” 20th Ed(2000).

Anexo 3

Resultados obtidos nas análises das amostras de água

Resultados obtidos nas análises das amostras de água dos sistemas de ar condicionados

Amostras	Local	Mês	Resultado	Espécie de Legionella	Legionella sp.	Bactérias Heterotróficas	Temperatura °C	pH	Dura mg/L
1	HO1(M1)	Ago/07	negativo	-	-	NR	15	5	< 0,1
2	HO1(M2)	Ago/07	negativo	-	-	NR	19	5	< 0,1
3	HO2	Ago/07	negativo	-	-	NR	12	5	< 0,1
4	CC1(M1)	Set/07	negativo	-	-	3,72x10 ²	12	6	< 0,1
5	CC2(M2)	Set/07	negativo	-	-	4,50x10 ²	14	5	1,5
6	CC3(M3)	Set/07	negativo	-	-	2,91x10 ²	12	5	< 0,1
7	HO1(M1)	Out/07	negativo	-	-	6	18	5	< 0,1
8	HO1(M2)	Out/07	negativo	-	-	10	15	6	< 0,1
9	HO2	Out/07	negativo	-	-	2,5	14	5	< 0,1
10	IES	Nov/07	negativo	-	-	4,45x10 ²	15	5	0,1
11	CC1(M1)	Nov/07	negativo	-	-	1,65x10 ²	12	5	< 0,1
12	CC2(M2)	Nov/07	negativo	-	-	2,62x10 ²	12	5	< 0,1
13	CC3(M3)	Nov/07	negativo	-	-	1,22x10 ²	13	5	< 0,1
14	HO1(M1)	Dez/07	negativo	-	-	1,40x10 ²	15	5	< 0,1
15	HO1(M2)	Dez/07	positivo	*	1,6x10 ²	1,08x10 ²	16	6	< 0,1
16	HO2	Dez/07	negativo	-	-	1,90x10 ²	15	5	< 0,1
17	IES	Jan/08	negativo	-	-	2,23x10 ²	19	5	< 0,1
18	CC1(M1)	Jan/08	negativo	-	-	1,30x10 ²	15	5	< 0,1
19	CC2(M2)	Jan/08	negativo	-	-	5,65x10 ²	15	5	< 0,1
20	CC3(M3)	Jan/08	positivo	*	1,3x10 ²	3,85x10 ²	15	5	< 0,1
21	HO1(M1)	Fev/08	positivo	L pneumophila-sg1	1x10 ²	2,60x10 ²	15	5	< 0,1

*L. longbeachae, L. bozemanii, L. dumoffii, L. gormanii, L. jordanii, L. micdadei, L. anisae, Sg1 serogrupos: CC(M1)Centro Comercial Maquina 1; CC(M2)Centro Comercial Maquina 2; CC(M3)Centro Comercial Maquina 3; IES Instituto de Ensino Superior; HO1(M1) Hospital Maquina 1; HO1(M2) Hospital Maquina 2; HO2 Hospital 2; NR Não Realizado

Continuação:

Amostras	Local	Mês	Resultado	Espécie de Legionella	Legionella sp.	Bactérias Heterotróficas UFC/ mL	Temperatura °C	pH	Cloro mgCl/ L
22	HO1(M2)	Fev/08	negativo	-	-	>1	15	5	< 0,1
23	HO2	Fev/08	negativo	-	-	1,85x10 ²	15	5	< 0,1
24	IES	Mar/08	negativo	-	-	2,47x10 ²	15	5	< 0,1
25	CC1(M1)	Mar/08	negativo	-	-	1,21x10 ³	12	5	< 0,1
26	CC2(M2)	Mar/08	negativo	-	-	2,68x10 ²	12	5	< 0,1
27	CC3(M3)	Mar/08	negativo	-	-	2,75x10 ²	12	5	< 0,1
28	HO1(M1)	Abr/08	positivo	*	2x10 ²	80	16	5	< 0,1
29	HO1(M2)	Abr/08	negativo	-	-	3,55x10 ²	13	5	< 0,1
30	HO2	Abr/08	negativo	-	-	1,40x10 ²	15	5	< 0,1
31	IES	Mai/08	negativo	-	-	1,04x10 ²	14	6	< 0,1
32	CC1(M1)	Mai/08	negativo	-	-	81	13	5	< 0,1
33	CC2(M2)	Mai/08	negativo	-	-	1,08x10 ²	14	5	< 0,1
34	CC3(M3)	Mai/08	negativo	-	-	9,90x10 ²	15	5	< 0,1
35	IES	Jun/08	negativo	-	-	35	13	5	< 0,1
36	CC1(M1)	Jun/08	negativo	-	-	4,75x10 ²	14	5	< 0,1
37	CC2(M2)	Jun/08	negativo	-	-	5,29x10 ³	14	5	< 0,1
38	CC3(M3)	Jul/08	negativo	-	-	2,31x10 ³	14	5	< 0,1
39	HO1(M1)	Jul/08	negativo	-	-	1,05x10 ²	14	5	< 0,1
40	HO1(M2)	Jul/08	negativo	-	-	70	15	4	< 0,1
41	HO2	Jul/08	negativo	-	-	60	13	5	< 0,1

**L. longbeachae*, *L. bozemannii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*; Sg1 sorogrupo1; CC(M1)Centro Comercial Maquina 1; CC(2)Centro Comercial Maquina 2; CC(M3)Centro Comercial Maquina 3; IES Instituição de Ensino Superior; HO1(M1)Hospital1 Maquina 1, HO1(M2) Hospital 1 Maquina 2; HO2 Hospital 2, NR Não Realizado

Anexo 4

Trabalho apresentado sob a forma de pôster no 1º Simpósio Internacional de microbiologia em Clínica Gramado/RS 2008

Helder Yudji Etto, Maria Tereza Pepe Razzolini
**Ocorrência de bactérias do gênero *Legionella* sp. em amostras de água
de sistemas de ar condicionado.**
Anais ISSN 1983-9073

Ocorrência de bactérias do gênero *Legionella* sp. em amostras de água de sistemas de ar condicionado.

Helder Yudji Etto, Maria Tereza Pepe Razzolini.

A partir de 1960, é cada vez maior o número de pessoas trabalhando em edifícios, onde a distribuição do ar é feita através de dutos, fazendo com que o ar circule várias vezes dentro do edifício, resultando em pouca renovação do ar e concentração de agentes tóxicos, trazendo prejuízos à saúde.

Uma bactéria que tem causado problemas nesses ambientes é a *Legionella*, causadora da legionelose, que pode ser adquirida pela inalação do microrganismo suspenso no ar, ou em aerossóis, provenientes de sistemas de ar condicionado.

Devido à importância da *Legionella*, como agente causador de doenças, e um crescente número de casos da doença, estar relacionados à permanência em ambientes fechados, este trabalho teve como objetivo determinar a presença de *Legionella* em água de bandejas e torres de resfriamento de sistemas de ar condicionado, uma vez que esses locais foram identificados como propícios à proliferação desse microrganismo.

Para este trabalho, foram realizadas análises de amostras de água provenientes de bandejas de ar condicionado. As amostras de água foram coletadas em dois hospitais (HO1 e HO2), um centro de ensino superior e um centro comercial, totalizando 42 amostras.

As amostras foram processadas de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th edition (APHA, 2000), onde volumes de 1L foram concentrados em membrana de polícarbonato (0,45µm/47mm), seguida de tratamento ácido. Alíquotas da amostra tratada e não tratadas com ácido, foram então inoculadas em meio Agar BCYE-α com e sem adição de antibióticos. As cepas isoladas foram submetidas a teste sorológico para identificação.

Das amostras analisadas, apenas 4 (9,5%) apresentaram resultado positivo para *Legionella* sp.; uma no centro comercial e três no HO1, as quais foram submetidas a teste sorológico e uma foi identificada como *Legionella* sorogrupo 1 e três como seis prováveis espécies: *L. longbeachae*, *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*.

Os resultados comprovam a presença de *Legionella* sp. nos sistemas de ar condicionado, e a importância de se implementar um programa de monitoramento ambiental, por se tratar de uma questão de interesse de saúde pública, além de fornecer dados para a manutenção dos sistemas de ar condicionado e de boas condições nos ambientes climatizados.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)