

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**IDENTIFICAÇÃO DE *Legionella* spp. EM AMOSTRAS DE
ÁGUA DA ÁREA URBANA E RURAL**

MARISILDA ALBANESE DIAS FERREIRA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Ferreira, Marisilda Albanese Dias.

Identificação de *Legionella* spp. em amostras de água da área urbana e rural / Marisilda Albanese Dias Ferreira.

– São Paulo, 2015.

119 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação. Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema**. Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Edviges Maristela Pituco.

Versão do título para o inglês: Identification of *Legionella* spp. samples of water in urban and rural area

1. *Legionella* 2. Água 3. Saúde Pública 4. Isolamento em cultura 5. PCR

I. Ferreira, Marisilda Albanese Dias II. Pituco, Edviges Maristela III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2015/006



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E
ABASTECIMENTO**

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaís Garcia da Silva

**Título: IDENTIFICAÇÃO DE *Legionella* spp. EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DA ÁREA URBANA E
RURAL**

Orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof^a Dr^a: Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof^a Dr^a: Márcia Zorello Laporta

Instituição: Centro Universitário Fundação Santo André, Colegiado de Ciências Biológicas

Assinatura:

Prof^a Dr^a: Líria Hiromi Okuda

Instituição: Instituto Biológico

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a minha família, em especial...
Minha amada mãe, meu exemplo de vida.
Meu marido Rafael, meu amor, companheiro e amigo.
Meu filho Caio, quem me ensinou o verdadeiro significado da palavra amor.
E meu sobrinho Igor, por estar sempre ao meu lado.
Sem eles, nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, mostrando o caminho nas horas incertas.

À minha mãe, **Isildinha**, pelo amor incondicional, compreensão, carinho, apoio, e acima de tudo, por seu exemplo de dignidade e superação.

Ao meu marido, **Rafael**, pela paciência, compreensão e amor dedicados todos esses anos que estamos juntos, e por nunca desistir de mim.

Ao meu filho, **Caio**, por me proporcionar tantos momentos de felicidade.

Ao meu sobrinho, **Igor**, por me dar força todas as vezes que seu olhar demonstrava orgulho diante das minhas escolhas.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. **Edviges Maristela Pituco**, pela oportunidade dada, e confiança depositada durante a realização deste trabalho. Exemplo de pesquisadora.

À Prof^a. Dra. **Márcia Zorello Laporta**, docente do Centro Universitário Fundação Santo André, membro da banca examinadora, pelos ensinamentos e sugestões dadas. Exemplo de docente.

À pesquisadora Dra. **Liria Hiromi Okuda**, pesquisadora do Laboratório de Víroses de Bovídeos, membro da banca examinadora, pelos ensinamentos, ajuda, e esforços em contribuir no desenvolvimento deste trabalho. Pessoa admirável.

À Prof^a. Dra. **Eliana Scarcelli Pinheiro**, pesquisadora do Laboratório de Bacteriologia de Doenças da Reprodução, membro suplente da banca.

À Prof^ª. Dra. **Alessandra Figueiredo de Castro Nassar**, pesquisadora do Laboratório de Bacteriologia, membro suplente da banca.

À equipe do **Laboratório de Vírus de Bovídeos**, pela convivência, e por contribuírem com alguma etapa do desenvolvimento deste trabalho.

As amigas queridas do Laboratório de Vírus de Bovídeos, **Michele dos Santos e Simone Fabris**, pela convivência compartilhada no decorrer deste trabalho. Pessoas incríveis, que me ajudaram de alguma maneira, sempre que possível.

À família Thomé, **Roberto e Eduardo**, pela oportunidade, confiança e apoio, não só na realização deste trabalho, como também no meu crescimento profissional.

À equipe da **Microambiental**, pela convivência, e por contribuírem com alguma etapa do desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas queridas da Microambiental, **Aline Gomes, Cristiane Garcia, Olga, Batista**, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo amor, carinho, paciência, pelas brigas, risadas, lágrimas compartilhadas, pelo aprendizado e convivência.

Às primas queridas, **Flávia Albanese e Veronika Albanese**, pelo amor, carinho, paciência e por fazerem parte da minha história.

Às minhas queridas companheiras de pesquisa, **Danielle Padoim, Danielle Guerino, Fernanda Jorge, Bárbara Tomache, Milana Brito, Iza Maria e Bruna Fernandes** pelo companheirismo, apoio, e por estarem do meu lado, durante a realização deste trabalho. Meninas admiráveis.

Ao Dr. **François W. Paradis**, da PARADN Biotechnologie S.A., pela contribuição durante a realização deste trabalho.

Ao **Instituto Biológico de São Paulo**, funcionários, coordenadores e colegas de curso, que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio**, do Instituto Biológico, pela oportunidade de realização do curso, pelo aprendizado e pela dedicação de seus pesquisadores em compartilhar seus conhecimentos.

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”. (George Bernard Shaw)

RESUMO

DIAS_FERREIRA, M.A. IDENTIFICAÇÃO DE *Legionella* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA ÁREA URBANA E RURAL. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

A *Legionella* é uma importante bactéria de veiculação hídrica encontrada em todo o mundo, em diferentes ambientes aquáticos naturais e artificiais. São bactérias capazes de sobreviver em condições ambientais hostis por longos períodos, o que contribui para a sua fácil disseminação. Em ambientes aquáticos naturais, podem colonizar rios, lagos, nascentes e solo úmido. De todas as espécies, a *Legionella pneumophila* tem sido a mais estudada, podendo causar dois tipos de doenças: a Doença dos Legionários, uma pneumonia grave, e a febre de Pontiac, uma infecção respiratória moderada. A infecção depende do grau de contaminação dos reservatórios de água, da susceptibilidade da pessoa exposta e da intensidade da exposição. Transmite-se por via respiratória a partir de aerossóis de água contaminada com este agente. Este trabalho resulta de um estudo realizado a partir de 212 amostras de água coletadas em ambientes urbanos, provenientes de reservatórios, chuveiros, torneiras, lavatórios, banheiras, aquecedores, ares-condicionados e torres de resfriamento, de hospitais, indústrias, hotéis e shoppings, das regiões da Grande São Paulo e Interior do Estado, no período de junho a outubro de 2014, pela empresa Microambiental Lab. Com. e Serv. em Água Ltda., e de 21 amostras de água, coletadas no período de fevereiro e agosto de 2014, de nascentes, poços artesianos, torneiras e chuveiros, de 9 propriedades rurais do município de Sarapuí, São Paulo, ligado à COLAF (Cooperativa dos Produtores de Leite e Demais Produtos da Agricultura Familiar). Com o objetivo de identificar a *Legionella* spp. em amostras de água, tanto da área urbana, quanto da área rural, realizou-se: (I) Isolamento da bactéria em cultura e enumeração. (II) PCR. (III) Comparação dos resultados obtidos nos métodos utilizados. (IV) Avaliar a qualidade microbiológica da água na área rural. Pelo isolamento em cultura detectou-se na área urbana 34% (73/212) de amostras positivas para *Legionella* spp. Na área rural, foram encontrados 38% (8/21) de amostras positivas para *Legionella* spp. Além disso, evidenciou-se a má

qualidade da água utilizada para consumo humano, em 67% (14/21) das amostras analisadas, com presença de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli*. Pelo método PCR detectou-se, na área urbana, 12% (25/212) das amostras positivas para *Legionella* spp., sendo 2% (4/212) *Legionella pneumophila*. Na área rural, foram detectados 76% (16/21) das amostras positivas para *Legionella* spp., sendo 48% (10/21) *Legionella pneumophila*. Quando se comparam os resultados do isolamento em cultura e do PCR, constatou-se baixo grau de concordância entre os métodos. O presente estudo demonstrou a necessidade de aplicação de sistema alternativo de cloração para o tratamento de água destinado para consumo humano e animal na área rural e, pela importância que a Doença dos Legionários representa em Saúde Pública, deixou claro que é fundamental a pesquisa da *Legionella* em amostras de água de diversos ambientes, utilizando métodos de detecção do agente confiáveis, e assim estabelecer monitoramento periódico nesses locais onde há perigo da permanência desta bactéria, de modo que ações específicas de vigilância e preventivas possam ser implementadas para mitigar o risco de disseminação e evitar a infecção de pessoas e suas consequências.

Palavras-chave: *Legionella*, Água, Saúde Pública, Isolamento em cultura, Área urbana, Área rural.

ABSTRACT

DIAS_FERREIRA, M.A. IDENTIFICATION OF *Legionella* spp. SAMPLES OF WATER IN URBAN AND RURAL AREA. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Legionella bacteria is an important waterborne found throughout the world, in different natural and artificial aquatic environments. Bacteria are able to survive in harsh environmental conditions for long periods, which contributes to its easy spreading. In natural aquatic environments, can colonize rivers, lakes, springs and moist soil. Of all the species, *Legionella pneumophila* has been the most studied, may cause two types of diseases: Legionnaires' disease, a severe pneumonia, and Pontiac fever, a mild respiratory infection. Infection depends on the degree of contamination of water reservoirs, susceptibility of the exposed person and the intensity of exposure. It is transmitted through the respiratory tract from contaminated water aerosols with this agent. This work results from a study from 212 water samples collected in urban environments, from reservoirs, showers, faucets, sinks, baths, heaters, air conditioners and cooling towers, hospitals, industries, hotels and shopping malls, the regions of São Paulo and the Interior, in the period from June to October 2014, the microenvironmental Lab company. Com. and Serv. Water in Ltda., and 21 water samples collected between February and August 2014, springs, wells, taps and showers, 9 farms in the municipality of Sarapuí, São Paulo, linked to COLAF (Cooperative Producers of Milk and Other Products of Family Agriculture). In order to identify the *Legionella* spp. in water samples, both the urban area, the rural area, it took place: (I) Isolation of bacteria in culture and enumeration. (II) PCR. (III) Comparison of the results obtained in the methods used. (IV) To evaluate the microbiological quality of water in rural areas. By isolation in culture was detected in urban areas 34% (73/212) of samples positive for *Legionella* spp. In rural areas, they found 38% (8/21) of samples positive for *Legionella* spp. In addition, it was evidenced the poor quality of water used for human consumption in 67% (14/21) of the samples with the presence of heterotrophic bacteria, total coliforms and *Escherichia coli*. By PCR method was detected in the urban area, 12% (25/212) of samples positive for *Legionella* spp., and 2%

(4/212) *Legionella pneumophila*. In rural areas, were detected 76% (16/21) of samples positive for *Legionella* spp., 48% (10/21) *Legionella pneumophila*. When comparing the results of the isolation in culture and PCR, there was a low degree of concordance between the methods. This study demonstrated the need for alternative system application of chlorination for the treatment of water intended for human and animal consumption in rural areas and for the importance of the Legionnaires' disease in Public Health, made it clear that research is essential *Legionella* in water samples from different environments, using trusted agent detection methods, and thus establish periodic monitoring in those places where there is danger of the permanence of this bacterium, so that specific actions surveillance and prevention can be implemented to mitigate the risk of dissemination and prevent infection of people and their consequences.

Keywords: *Legionella*, Water, Public Health, Culture isolation, Urban area, Rural area.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 – <i>Legionella</i> : flagelo polar	7
Fotografia 2 a 4 – Locais de coleta das amostras de água, área urbana	25
Fotografia 5 a 7 – Locais de coleta das amostras de água, area rural	26
Fotografia 8 – Sistema de filtração tipo manifold	27
Fotografia 9 – Colônia de <i>Legionella</i> spp.	29
Fotografia 10 – Colônia típica de <i>Legionella</i> spp.	30
Fotografia 11 – Expressão dos resultados: placa BCYE e BCYE-Cys	31
Fotografia 12 – Colônias típicas e atípicas de coliformes	39
Fotografia 13 – Caldo lauril triptose	40
Fotografia 14 – Caldo verde brilhante	40
Fotografia 15 – Caldo EC Medium Mug	40
Fotografia 16 – Resultado da PCR para <i>Legionella</i> spp. e <i>L. pneumophila</i>	46
Fotografia 17 – Clorador de pastilhas	86
Fotografia 18 – Colônia de <i>L. pneumophila</i> ATCC®33152 no Ágar BCYE	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécie e subespécies do gênero <i>Legionella</i>	6
Tabela 2 – Concordância: técnica de isolamento e PCR, área urbana	50
Tabela 3 – Concordância: técnica de isolamento e PCR, área rural	51
Tabela 4 – Identificação e dados das amostras de água, área urbana	89
Tabela 5 – Identificação e dados das amostras de água, área rural	94

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição do número de amostras de água para pesquisa de <i>Legionella</i> de junho a outubro de 2014, área urbana	41
Gráfico 2 – Distribuição do número de amostras com resultado presuntivo para <i>Legionella spp.</i> segundo o local de coleta.	42
Gráfico 3 – Distribuição do número de amostras com resultado presuntivo para <i>Legionella spp.</i> segundo o ponto de coleta, área urbana	42
Gráfico 4 – Distribuição do número de amostras de água para pesquisa de <i>Legionella</i> , área rural	43
Gráfico 5 – Distribuição do número de amostras com resultado presuntivo para pesquisa de <i>Legionella spp.</i> segundo o ponto de coleta, área rural	44
Gráfico 6 – Total de amostras com resultado presuntivo para <i>Legionella spp.</i> , área rural.	44
Gráfico 7 – Presença de bactérias acima do valor permitido na água para consumo humano, área rural	46
Gráfico 8 – Detecção de <i>Legionella</i> pelo método PCR , área urbana	47
Gráfico 9 – Distribuição do número de amostras com resultado para <i>Legionella</i> , pela técnica de PCR, segundo o ponto de coleta, área urbana	47
Gráfico 10 - Distribuição do número de amostras com resultado para <i>Legionella</i> , pela técnica de PCR, segundo o local de coleta, área urbana	48
Gráfico 11 – Detecção de <i>Legionella</i> pelo método PCR , área rural	48
Gráfico 12 - Distribuição do número de amostras com resultado para <i>Legionella</i> , segundo o ponto de coleta, área rural.	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Doses recomendadas dos antibióticos	19
Quadro 2 – Reagente para amplificação	33
Quadro 3 – Iniciadores, <i>primers</i>	33
Quadro 4 – Ciclo de amplificação da PCR para <i>Legionella</i>	33
Quadro 5 – Cepas bacterianas utilizadas como controle positivo e negativo	34
Quadro 6 – Resultados microbiológicos das amostras coletadas na área rural	45
Quadro 7 – Resultados obtidos pela técnica de isolamento em cultura e PCR em amostras de água, oriundas da área urbana (regiões da Grande São Paulo) e área rural (cidade de Sarapuí, interior do Estado)	49
Quadro 8 – Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice <i>Kappa</i>	50
Quadro 9 - Níveis de ações quando isolado <i>Legionella</i> em amostras de água, conforme o ACOP L8	87
Quadro 10 - Microrganismo utilizado como controle de qualidade	88

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Solução tampão ácido (HCl/KCl)	73
Anexo B – Bufferd Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar	74
Anexo C – <i>Legionella</i> suplemento seletivo (GVPC)	76
Anexo D – L-cisteína (4%) e pirofosfato férrico (2,5%)	78
Anexo E – Bufferd Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar - Cys	79
Anexo F – PCA (Plate Count Agar)	80
Anexo G – Agar m-Endo	81
Anexo H – Caldo lauril triptose	82
Anexo I – Caldo lactosado verde brilhante e bile 2%	83
Anexo J – Caldo EC médium com Mug	84
Anexo K – Center for Disease Prevention and Control, CDC	85
Anexo L – Sistema simples de cloração	86
Anexo M - Níveis de ações quando isolado <i>Legionella</i> em amostras de água, conforme o ACOP L8	87

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Processo de infecção de uma célula por <i>Legionella</i> spp.	9
Esquema 2 – Representação do método de espalhamento <i>spread plate</i>	28
Esquema 3 – Técnica de esgotamento do inóculo por estria	30
Esquema 4 – Representação do método de semeadura <i>pour plate</i>	36

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A – Microrganismos utilizados como controle de qualidade	88
Apêndice B – Identificação e dados das amostras de água, área urbana	89
Apêndice C – Identificação e dados das amostras de água, área rural	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<1	=	Ausente, não detectado
>5700	=	Incontável
®	=	Marca Registrada
µL	=	Microlitro
ACOP	=	Código de Prática Aprovados (do inglês, Approved Code of Practice)
ANVISA	=	Agência de Vigilância Sanitária
APHA	=	American Public Health Association
AWWA	=	American Water Works
BCYE	=	Buffered Charcoal Yeast Extract
CBH	=	Contagem de Bactérias Heterotróficas
CDC	=	Centers for Disease Control and Prevention
COLAF	=	Cooperativa dos Produtores de Leite e Demais Produtos da Agricultura Familiar do Município de Sarapuí e Região.
DATASUS	=	Sistema de Informática do SUS (Sistema Único de Saúde)
DL	=	Doença dos Legionários
<i>E.coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
ELDSNET	=	Regime de Vigilância Européia para a Doença dos Legionários (do inglês, European Disease Surveillance Network)
EPA	=	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês, United States Environmental Protection Agency)
EUA	=	Estados Unidos da América
EWGLI	=	Grupo Europeu para Estudo de Infecções por <i>Legionella</i> (do inglês, European Working Group for <i>Legionella</i> Infections)
EWGLINET	=	Regime de Vigilância Européia para a Doença dos Legionários, associada à viagens (do inglês, European Surveillance scheme for travel associated Legionnaires's disease)
HSE	=	Saúde e Segurança no Trabalho (do inglês, Health and Safety Executive).
L	=	Litro
<i>L. pneumophila</i>	=	<i>Legionella pneumophila</i>
mL	=	Mililitro
mg	=	Miligrama
°C	=	Grau Celsius
OMS	=	Organização Mundial da Saúde

pb	=	Pares de base
PCR	=	Reação em cadeia pela polimerase
pH	=	Potencial Hidrogeniônico
rpm	=	Rotação por minuto
SUS	=	Sistema Único de Saúde
UFC	=	Unidade Formadora de Colônia
WEF	=	Water Environment Federation
WHO	=	Organização Mundial da Saúde (do inglês, World Health Organization)

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FOTOGRAFIAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE QUADROS	xvi
LISTA DE ANEXOS	xvii
LISTA DE ESQUEMAS	xviii
LISTA DE APÊNDICES	xix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xx
SUMÁRIO	xxii
1 INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico.....	3
2.2. Taxonomia.....	5
2.3. Características gerais da bactéria.....	7
2.3.1 <i>Legionella</i> spp.....	7
2.3.2 <i>Legionella pneumophila</i>	8
2.3.3 Ciclo de vida da <i>Legionella</i>	9
2.4 Ocorrência da <i>Legionella</i>	10
2.4.1 Ocorrência na água.....	10
2.4.2 Ocorrência no solo.....	11
2.4.3 Ocorrência no ar.....	12
2.4.4 Ocorrência em animais.....	12
2.4.4.1 Epidemiologia, patogenicidade e prevenção de animais.....	13
2.4.5 Distribuição mundial.....	13
2.5 Aspectos Regulamentadores.....	14
2.5.1 Grupo Europeu para o Estudo de Infecções por <i>Legionella</i> (EWGLI).....	14
2.5.2 Executivo de Saúde e Segurança (HSE) – Grã-Bretanha.....	15
2.5.3 Portaria nº1071/98 de 31 de Dezembro (Portugal).....	16
2.5.4 Portaria nº3.523/98, Ministério da Saúde e Resolução nº9 ANVISA (Brasil).....	17
2.6 Legionelose.....	17
2.7 Tratamento.....	18
2.8 Epidemiologia, Patogenicidade e Prevenção.....	20

2.8.1 Epidemiologia	20
2.8.2 Patogenicidade	20
2.8.3 Prevenção.....	21
2.8.3.1 Superaquecimento da água	21
2.8.3.2 Ionização com cobre e prata	22
2.8.3.3 Hipercloração da água	22
2.9 Técnicas para detecção da <i>Legionella</i>	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Geral	24
3.2 Específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Coleta	25
4.2 Isolamento em cultura e enumeração de <i>Legionella</i>	26
4.2.1 Concentração das amostras pelo método de membrana filtrante.....	27
4.2.2 Tratamento ácido com solução tampão ácido HCl/KCl.....	27
4.3 Semeadura das amostras pela técnica <i>spread plate</i>	28
4.4 Período de incubação	29
4.5 Colônias típicas de <i>Legionella</i>	29
4.5.1 Confirmação de colônias típicas de <i>Legionella</i>	30
4.6 Expressão dos resultados	31
4.7 Análise molecular	31
4.7.1 Extração do DNA	32
4.7.2 Amplificação do DNA	32
4.7.3 Análise do amplificado	34
4.8 Análises microbiológicas nas amostras de água da área rural	34
4.8.1 Contagem de bactérias heterotróficas.....	36
4.8.1.1 Inoculação em profundidade pelo método <i>pour plate</i>	36
4.8.1.2 Contagem de unidades formadora de colônias	37
4.8.2 Coliformes totais, termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	38
4.8.2.1 Concentração das amostras de água pelo método de membrana filtrante.....	38
4.8.2.2 Avaliação presuntiva para Coliformes	38
4.8.2.3 Teste para confirmação de colônias típicas de coliformes.....	39
5. RESULTADOS	41
5.1 Resultados obtidos pela técnica de isolamento.....	41
5.1.1 Área urbana	41
5.1.2 Área rural.....	43
5.2 Resultados obtidos pela técnica de PCR	46

5.2.1 Área urbana	47
5.2.2 Área rural	48
5.3 Comparação entre as técnicas de isolamento em cultura e PCR	49
5.3.1 Área urbana	50
5.3.2 Área rural	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso essencial à sobrevivência de todos os seres vivos, e o seu fornecimento em quantidade e qualidade é fundamental para a perfeita manutenção da vida. (SHIKLOMANOV, 1997). Suas funções no abastecimento público, industrial e agropecuário, na preservação da vida aquática, na recreação, e no transporte demonstram essa importância vital. (GUILHERME; SILVA; OTTO, 2000).

Aliadas à falta de água potável estão à má distribuição e contaminação dos recursos hídricos. Atualmente cerca de 1,4 bilhões de pessoas não têm acesso à água tratada e cerca de 80% das enfermidades no mundo são contraídas devido à água contaminada. (LEITE et al., 2003).

No meio rural, o risco de ocorrência de surtos de doenças de veiculação hídrica é alto, em função de muitas vezes a água ser captada de poços inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais. (STUKEL et al., 1990). As principais fontes de abastecimento de água são os poços rasos e as nascentes, locais bastante suscetíveis à contaminação. (AMARAL et al., 2003). Atualmente, mais de 50% da água utilizada pelos produtores rurais brasileiros não passa por nenhum tipo de desinfecção (RIBEIRO; BENEDETTI, 2012).

A *Legionella* é uma importante bactéria de veiculação hídrica encontrada em todo o mundo, em diferentes ambientes aquáticos naturais e artificiais. (WHO, 2007). São bactérias amplamente distribuídas, capazes de sobreviver em condições ambientais hostis por longos períodos, o que contribui para a sua fácil disseminação. (MANSILHA et al., 2007).

Pode causar infecções em humanos resultante da transmissão do microrganismo pelo ar, provenientes de fontes ambientais. Não se reconhece transmissão de pessoa a pessoa e contágio por ingestão de água contaminada (LEE; JOSEPH, 2002).

De todas as espécies, a *Legionella pneumophila* tem sido a mais estudada, pois pode causar dois tipos de doenças: a Doença dos Legionários, uma pneumonia grave, e a febre de Pontiac, uma infecção respiratória moderada. (PELCZAR 1996). Embora haja atualmente 16 sorogrupos de *L. pneumophila*,

82% de todos os casos de legioneloses são causados pela *L. pneumophila* sorogrupo 1. Aproximadamente, metade das espécies de *Legionella* tem sido associada com doença humana, e é provável que a maioria das espécies possa causar doenças humanas sob certas condições, no entanto, estas infecções são pouco relatadas, por serem raras e por falta de disponibilidade métodos de diagnóstico validados. (RICE et al., 2012).

Nos últimos anos, o número de casos notificados de legionelose tem aumentado substancialmente nas regiões onde o teste está disponível, como por exemplo, Estados Unidos, Europa e Japão. Porém, a fonte e o modo de transmissão para os casos esporádicos são muitas vezes desconhecidos. (SAKAMOTO et al., 2009).

Segundo Rocha (1998), o comportamento epidemiológico no Brasil é semelhante ao do resto do mundo, portanto, se forem buscados dados na literatura em relação à letalidade por essa bactéria, podemos esperar mais de 6.000 óbitos por ano no país em decorrência de pneumonias causadas por *Legionella pneumophila*, comparável ao número de casos da tuberculose e maior do que o da meningite.

No Brasil, as pneumonias são as primeiras causas de morte entre as doenças respiratórias, ocupa o quarto lugar na mortalidade geral. Estima-se que cerca de 1.900.000 casos de pneumonias ocorram anualmente e, segundo a escassa literatura a esse respeito, *Legionella pneumophila* pode ser a causa de 6% dessa morbidade. (ROCHA, 1998; FERREIRA; DA CUNHA, 2007).

No entanto, apesar da morbidade e mortalidade associada à Doença dos Legionários e à Febre de Pontiac serem uma realidade no Brasil, o número de afetados é de difícil cálculo, principalmente porque grande parte das ocorrências, esporádicas ou epidêmicas, não é corretamente diagnosticada ou notificada e, portanto, não constam das estatísticas de Saúde Pública. (MANSILHA et al., 2007).

Devido ao significativo aumento das doenças pulmonares com causas ainda pouco esclarecidas, e considerando que a *Legionella* está amplamente distribuída no ambiente, incluindo o fornecimento de água tratada, informações adicionais são necessárias para instituir a prevenção ideal e as medidas de controle para que se possa minimizar a morbidade e mortalidade associadas à *Legionella*. (EPA, 2001).

A escolha do método para o processamento de amostras de água, depende do grau esperado de contaminação total bacteriana de uma determinada amostra. Água potável geralmente tem baixas concentrações bacterianas, podendo ser cultivada diretamente, ou concentrada em membrana filtrante de 0,2µm, para a detecção de *Legionella*. Já a água não potável geralmente não necessita de concentração em membrana filtrante, por apresentar concentrações elevadas de bactérias, porém também pode ser concentradas em membrana filtrante. A concentração das amostras pode ser por filtração ou centrifugação, sendo a filtração usada com mais frequência e sucesso (RICE, et al., 2012).

Desta forma, o estudo tem como objetivo verificar a ocorrência da *Legionella* em amostras de água de diversas procedências da área urbana e área rural das regiões da Grande São Paulo e Interior, no período de junho a outubro 2014, e fevereiro e agosto de 2014, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O isolamento e identificação da *Legionella* foi resultado de uma intensa pesquisa sobre doenças respiratórias, realizada pelo *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC dos Estados Unidos, acerca de um surto de pneumonia que afetou os participantes da Convenção da Legião Americana do Estado da Pensilvânia, que haviam se reunido de 21 a 24 de julho de 1976, no Hotel Bellevue Stratford na Filadélfia, EUA. (FRASER et al., 1977; McDADE et al., 1977). Quando a Convenção estava próxima do encerramento, alguns dos participantes adoeceram, e quase todos atribuíram o fato ao intenso programa da Convenção. (MOPECE, 2010). Ao voltar para suas respectivas cidades, no entanto, alguns se queixavam de dor de cabeça, febre alta, calafrios, tosse seca e dores musculares, sintomas de uma doença infecciosa aguda. Em 27 de julho de 1976, um legionário idoso faleceu em Athens, Pensilvânia, mas não

se prestou muita atenção ao caso porque o indivíduo era portador de problemas cardíacos. Contudo, na sexta-feira 30 de julho, já haviam falecido mais cinco legionários e outros haviam sido hospitalizados em todo o estado. Durante o final de semana, morreram outros cinco legionários. (MOPECE, 2010). Na manhã de segunda-feira, 2 de agosto, o epidemiologista do estado da Pensilvânia entrou em contato com o chefe da unidade do CDC, e contou que havia sido declarada situação de alerta em todo o estado. "Foram registrados 11 óbitos por pneumonia, e todas as pessoas que faleceram haviam participado da Convenção da Legião Americana na Filadélfia". (MOPECE, 2010).

Nessa mesma época, o país estava se preparando para combater uma possível epidemia de gripe suína, e as autoridades de saúde pública de todos os estados estavam fazendo os preparativos para iniciar um programa federal de vacinação em massa. Os epidemiologistas pensaram imediatamente na gripe suína e iniciaram as investigações epidemiológicas recomendadas pelo Centro de Controle de Doenças em Atlanta, Georgia. A busca contou com a participação de centenas de pessoas de diversas profissões. (MOPECE, 2010).

Essa intensa investigação documentou 239 casos e 34 mortes devido a uma pneumonia de causa até então desconhecida. (BREIMAN, 1993).

No final de dezembro de 1976, os pesquisadores Joseph E. McDade e Charles C. Shepard, da Divisão de Hanseníase e Rickettsias do CDC, realizaram uma grande descoberta, examinando algumas das amostras de tecidos preparadas na época da epidemia. O resultado dessa descoberta foi publicado em janeiro de 1977, quando oficialmente o CDC anunciou a descoberta do agente etiológico, um bacilo Gram negativo. (McDADE et al., 1977; McDADE et al., 1979).

Devido à associação histórica com a Convenção da Legião Americana, a doença foi chamada de Doença dos Legionários (DL), e o seu agente etiológico de *Legionella pneumophila*, classificado na família *Legionellaceae*. (ROWBOTHAM, 1980).

Os pesquisadores do CDC também assumiram a teoria de aerossolização, ou seja, de que a DL poderia ser contraída pela inalação de aerossóis de água contaminada. Tal teoria foi sustentada durante outra investigação sobre um surto de DL, ocorrido na cidade de Memphis, EUA, em

1978, no qual trinta e nove pessoas apresentaram DL hospitalar. Apenas quatro delas haviam tido contato limitado com locais fora do ambiente hospitalar, sendo, então, o surto associado ao sistema de ar condicionado utilizado no local. (DONDERO et al., 1980).

Após a identificação desse agente etiológico, de doença em humanos, até então desconhecido, foi possível verificar que esse microrganismo tem baixa atividade endêmica durante o ano, dentro de uma ampla distribuição geográfica, e que alguns surtos de doenças respiratórias anteriores a 1976, haviam sido provocados pela *L. pneumophila*. (RIFFARD et al., 1998).

É o caso da primeira epidemia documentada da DL, que ocorreu em uma fábrica de embalagens de carne em Minnesota, em 1957. (STOUT; YU, 1997; GOLDMAN; BENNET, 2001). Outro caso bastante interessante, ocorrido na cidade de Pontiac, no estado americano de Michigan, investigado em 1977, nove anos depois da identificação do agente, foi uma epidemia ocorrida no ano de 1968, caracterizada por febre, dores de cabeça e musculares, afetando a saúde de 114 pessoas, 100 delas funcionários de um edifício do departamento de saúde local. A doença passou a ser chamada de febre de Pontiac, em referência ao nome da cidade. Os soros dos doentes foram testados, procurando a bactéria responsável pela DL, e na maioria desses soros foi possível provar que a Febre de Pontiac fora causada pelo mesmo agente. (BARBAREE, 1993).

2.2 Taxonomia

Embora algumas características fenotípicas, como coloração de Gram, ácidos graxos da membrana celular, conteúdo de ubiquinona (coenzima Q10), morfologia e crescimento em meios específicos possam ser utilizados para reconhecer bactérias do Gênero *Legionella*, métodos analíticos mais específicos para detecção da bactéria são necessários para diferenciar espécies individuais. Os melhores métodos para isso são a análise de DNA e análise antigênica de várias proteínas e peptídeos. (EPA, 2001).

Atualmente, o Gênero *Legionella* inclui 62 espécies distintas, incluindo 3 subespécies (DSMZ, 2014), classificadas na família *Legionellaceae* (Tabela 1). Apresenta 71 diferentes sorogrupos, sendo 16 sorogrupos pertencentes à espécie *Legionella pneumophila*. O número de espécies dessa família *Legionellaceae* continua a crescer. (LA SCOLA et al., 2004; WHO, 2007).

Tabela 1: Espécies e subespécies do gênero *Legionella*.

Gênero <i>Legionella</i>		
	62 espécies e 3 subespécies	
	<i>adelaidensis</i>	<i>gormanii</i>
	<i>anisa</i>	<i>hackeliae</i>
	<i>beliardensis</i>	<i>impletisolii</i>
	<i>birminghamensis</i>	<i>israelensis</i>
	<i>bozemananae</i>	<i>jamestowniensis</i>
	<i>bozemanii</i>	<i>jordanis</i>
	<i>brunensis</i>	<i>lansingensis</i>
	<i>busanensis</i>	<i>londiniensis</i>
	<i>cardiaca</i>	<i>longbeachae</i>
	<i>cherrii</i>	<i>lytica</i>
Espécies	<i>cincinnatiensis</i>	<i>maceachernii</i>
	<i>drancourtii</i>	<i>massiliensis</i>
	<i>dresdenensis</i>	<i>micdadei</i>
	<i>drozanskii</i>	<i>moravica</i>
	<i>dumoffii</i>	<i>nagasakiensis</i>
	<i>erythra</i>	<i>nautarum</i>
	<i>fairfieldensis</i>	<i>oakridgensis</i>
	<i>fallonii</i>	<i>parisiensis</i>
	<i>feeleii</i>	<i>pittsburghensis</i>
	<i>geestiana</i>	<i>pneumophila</i>
	<i>gratiana</i>	<i>pneumophila subsp. fraseri</i>
	<i>gresilensis</i>	<i>pneumophila subsp. pascullei</i>
		<i>pneumophila subsp. pneumophila</i>
		<i>quateirensis</i>
		<i>quinlivanii</i>
		<i>rowbothamii</i>
		<i>rubrilucens</i>
		<i>sainthelensi</i>
		<i>santicrucis</i>
		<i>shakespearei</i>
		<i>spiritensis</i>
		<i>steelei</i>
		<i>steigerwaltii</i>
		<i>taurinensis</i>
		<i>tucsonensis</i>
		<i>tunisiensis</i>
		<i>wadsworthii</i>
		<i>waltersii</i>
		<i>worsleiensis</i>
		<i>yabuuchiae</i>

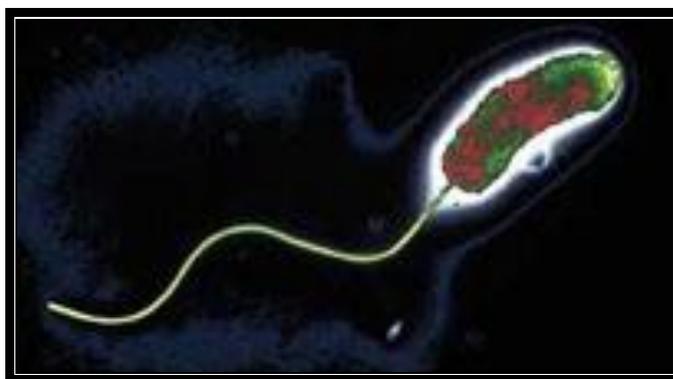
Fonte: Disponível em: <<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>>. Acesso em: 11 jul. 2014. Adaptado.

2.3 Características gerais da bactéria

As bactérias do gênero *Legionella* são bactérias gram-negativas, aeróbicas, em forma de bastonetes. As dimensões da célula são 0,3-0,9 μm de largura por 1 a 20 μm de comprimento. (BRENNER; FEELEY; WEAVER, 1984).

Possuem flagelo polar, subpolar ou lateral (Fotografia 1), que lhe confere mobilidade, e não são formadores de esporos. (BRENNER; FEELEY; WEAVER, 1984).

Fotografia 1 - *Legionella*: flagelo polar



Fonte: Disponível em: <www.pml.tno.nl/en/diac/layer_2/bsl2.html>. Acesso em: 11 jul. 2014.

São parasitas intracelulares facultativos, que podem invadir e se replicar no interior de protozoários e, em humanos, no interior de macrófagos. (FERREIRA; SOUSA, 2000). Utilizam aminoácidos como fonte de carbono e de energia, e não oxidam ou fermentam carboidratos. Requerem a presença do aminoácido L-cisteína e de íons de ferro para crescer. (BENSON; FIELDS, 1998; PARK et al., 2003).

2.3.1 *Legionella* spp.

Legionella spp. estão onipresentes em ambientes aquosos, onde parasitam e se multiplicam em protozoários. Várias amebas e alguns protozoários ciliados são conhecidos por serem potenciais hospedeiros ambientais dessa bactéria.

(ABU et al., 1998). Essa interação parasita-hospedeiro tem sido extensivamente estudada, e é considerado o elo fundamental para a ecologia e patogênese da *Legionella*. A associação do microrganismo com protozoários é um importante fator que regula a presença dessas bactérias no ambiente, pois a célula do protozoário é favorável ao crescimento da *Legionella*, mesmo quando as condições do ambiente aquoso são desfavoráveis: eles aumentam a resistência desses organismos a condições ambientais adversas. (ABU et al., 1997).

2.3.2 *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila é uma bactéria ubíquitária em sistemas naturais e de distribuição de água, conhecida por sua capacidade de causar pneumonia em seres humanos. A sobrevivência e a proliferação dependem da sua capacidade de se replicar dentro células fagocíticas. (FIELDS, 2008; MOLINER; FOURNIER; RAOULT, 2010; NEWTON et al., 2010).

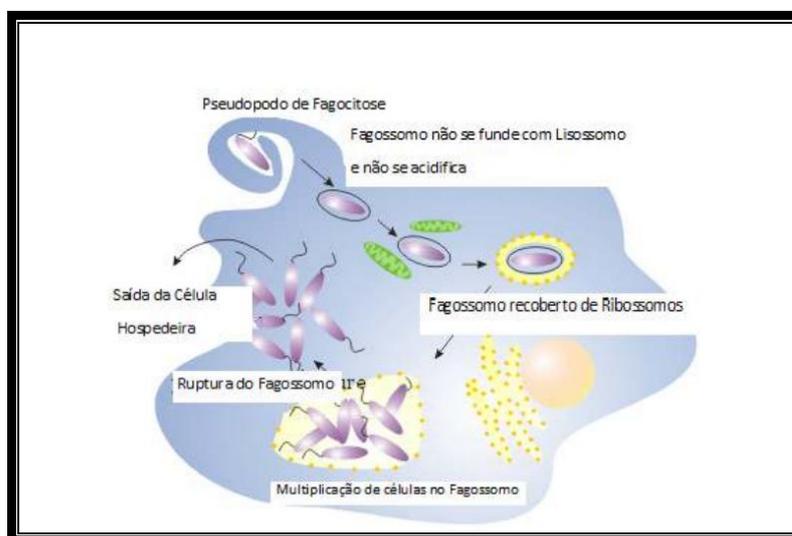
Em humanos, a *L. pneumophila* atinge os pulmões após a inalação de gotículas de aerossóis contaminados. Nos pulmões, é fagocitada por macrófagos alveolares que são o principal local para a replicação dessa bacteriana. (FIELDS, 2008; MOLINER; FOURNIER; RAOULT, 2010; NEWTON et al., 2010). As estirpes virulentas e as não virulentas são fagocitadas, permanecendo intactas no interior dos macrófagos (WHO, 2002) e se multiplicando, porque bloqueiam a fusão fagossoma-lisossoma, além de também inibirem a geração de radicais livres. (FERREIRA; SOUSA, 2000).

No interior do macrófago, as bactérias produzem citotoxinas, destroem os macrófagos e são liberadas no meio extracelular, recomeçando o ciclo infeccioso intracelular em outro macrófago. (SCHULZ et al., 2005; STOUT et al., 2007).

2.3.3 Ciclo de vida da *Legionella*

As bactérias do Gênero *Legionella* entram no fagócito por um processo denominado fagocitose (Esquema 1). Após esse processo, as bactérias alojam-se num único fagossoma. O processo de fusão com os lisossomos é inibido, bem como a sua acidificação. No interior da célula, as bactérias iniciam a sua multiplicação. Uma diferença fenotípica entre estirpes de *Legionella* virulentas e as não virulentas corresponde à presença de flagelos. Foram descritas duas fases de crescimento para a bactéria. Uma fase replicativa, seguida por uma fase infecciosa ou transmissível. A fase replicativa apresenta bactérias sem motilidade com uma toxicidade baixa ou inexistente. A fase infecciosa ocorre após uma transformação que leva a uma forma bacilar menor, mais grossa. Essa nova forma é móvel, devido à presença de flagelos, e é muito mais tóxica para o hospedeiro. (BYRNE; SWANSON, 1998; FIELDS; BENSON; BESSER, 2002; HILBI et al., 2010).

Esquema 1 - Processo de infecção de uma célula por *Legionella* spp.



Fonte: Disponível em: < file:///C:/Users/st/Downloads/HelderEtto%20(4).pdf >. Acesso em: 20 mar. 2015.

2.4 Ocorrência da *Legionella*

Pelo fato do monitoramento ambiental de rotina para *Legionella* não ser uma prática comum, a ocorrência dessa bactéria é muitas vezes indicada por surtos ou casos esporádicos da DL, ou seja, qualquer doença causada por *Legionella*. (EPA, 2001).

2.4.1 Ocorrência na água

Tem seu habitat generalizado na natureza, independentemente da estação do ano, multiplicando-se massivamente quando se conjugam determinados fatores. São bactérias capazes de sobreviver numa ampla gama de condições ambientais que incluem, por exemplo, variações de temperatura, de 5°C a 63°C, e pH, de 5,5 a 8,9. (FIELDS; BENSON; BESSER, 2002).

Colonizam os mais variados tipos de ambientes, como rios, lagos, nascentes e solo úmido. (BARTRAM et al., 2007). É uma bactéria que se desenvolve no interior de outros organismos e, como tal, pode ser considerada um parasita intracelular. Tem sido descoberta uma forte associação, possivelmente uma relação simbiótica, relativamente ao crescimento da *Legionella* em alguns protozoários, como *Hartmanella vermiformis*, *Tetrahymena thermophila* e *Acanthamoeba castellanii*. (MIGUEL, 2007). De fato, tem sido sugerido que, na ausência destes protozoários, não se verifica o crescimento desta bactéria, permitindo classificar os protozoários como reservatórios naturais de *Legionella* no ambiente. (WHO, 2002).

As *Legionellas* colonizam redes de abastecimento e distribuição de água, redes prediais de água quente e água fria, ar condicionado e sistemas de arrefecimento, como torres de refrigeração, condensadores evaporativos e umidificadores, existentes em edifícios, hospitais, hotéis, termas e centros comerciais. Surgem ainda em fontes ornamentais e tanques recreativos, como banheiras de hidromassagem. (BARTRAM et al., 2007). Nesses ambientes, as condições ótimas de crescimento compreendem uma temperatura da água

entre 32 e 45°C, estagnação, presença de sedimentos, assim como a presença de biofilmes e de protozoários. (HASSENZAHN, 2002). Propagam-se em zona de elevada concentração de ferrugem, algas e partículas orgânicas; têm a capacidade de sobreviver, durante pelo menos um ano, em água da torneira à temperatura ambiente. (MIGUEL, 2007).

Fatores que têm demonstrado grande importância para proliferação da *Legionella* são a formação de biofilmes em sistemas de distribuição de água e sistemas de climatização artificial (PIAO et al., 2006) e a presença de protozoários, amebas e outros, com os quais a bactéria pode associar-se, estabelecendo uma relação de parasitismo. (MASTRO et al., 1991). A presença de biofilmes, associada a uma temperatura propícia, nesses sistemas, explica a concentração de *Legionella* em níveis infectantes para o homem. Se existir na instalação um mecanismo produtor de aerossóis, a bactéria pode dispersar-se no ar e penetrar, por inalação, no aparelho respiratório. (EPA, 2001). Em ambiente aquático, dado que protozoários alimentam-se do biofilme, o modo de entrada da *Legionella* nesses organismos ocorre por ingestão. Uma vez no interior, a bactéria prolifera e rompe a membrana citoplasmática do protozoário, sendo libertada para a água. Ressalta-se que o mecanismo de infecção da *Legionella* nesses organismos é semelhante ao modo de infecção nas células fagocitárias humanas. (HASSENZAHN, 2002).

2.4.2 Ocorrência no solo

Embora a água seja a fonte mais documentada de *Legionella* no ambiente, essa bactéria tem sido isolada de lama, solo úmido e solo envasado. (EPA 1985). A espécie *Legionella longbeachae* foi capaz de persistir durante sete meses em duas misturas de solo envasado à temperatura ambiente. Solo, em vez de água, pode ser o habitat natural dessa espécie e pode ser uma fonte de contaminação humana. (EPA, 2001).

2.4.3 Ocorrência no ar

A *Legionella* pode ser transmitida da água para o ar por sistemas de geração de aerossol, como torres de resfriamento, condensadores evaporativos, equipamentos para canalização, com torneiras e chuveiros, tanques de água quente, umidificadores, aparelhos de terapia respiratória, como nebulizadores e banheiras de hidromassagem. A inalação de aerossóis contendo *Legionella* é uma fonte importante de contaminação das pessoas a ela expostas. (EPA 1985).

2.4.4 Ocorrência em animais

Na literatura, são poucos os casos referentes a animais diagnosticados com pneumonia, cuja infecção pudesse ter sido ocasionada pela *Legionella pneumophila*. Embora investigações tenham sido realizadas, com animais domésticos (bovinos, equinos, suínos, ovinos, caprinos, cães e coelhos) e selvagens (antílopes, búfalos, camelos e pombos), a fim de detectar uma evidência sorológica da infecção, os resultados não foram conclusivos. Entre todos os animais investigados, os cavalos foram os que produziram maior prevalência de anticorpos para *Legionella*. Culturas de *Legionella* normalmente não são realizadas na rotina veterinária, para o diagnóstico de síndromes respiratórias dos animais. (FABBI et al., 1998).

O primeiro caso documentado de pneumonia causado por *Legionella pneumophila*, foi relatado em um bezerro de um rebanho leiteiro, localizado no norte da Itália, em 1998. Os sintomas clínicos consistiam de diarreia, hipertermia, anorexia e dispneia intensa. Os achados patológicos e histológicos foram muito semelhantes aos observados na legionelose humana. Dos pulmões do bezerro foram isolados *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 (SG1) e sorogrupo 10 (SG10) e, do fígado, apenas o sorogrupo 1 (SG1), também encontrado no tecido pulmonar por imunofluorescência e exames de imunohistoquímica. A *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 (SG1) também foi isolada

de um velho aquecedor de água elétrico que abastecia o reservatório de água quente, destinado à alimentação dos bezerras. (FABBI et al., 1998).

2.4.4.1 Epidemiologia, patogenicidade e prevenção de animais

A distribuição generalizada da *Legionella* é contrastante com a surpreendente falta de relatórios clínicos de infecções causadas por *L. pneumophila* em animais. Provavelmente, os animais atuam como hospedeiros acidentais para *Legionella*, da mesma forma como ocorre em seres humanos. (FABBI et al., 1998).

2.4.5 Distribuição mundial

Casos de legioneloses têm sido descritos na América do Norte, América do Sul, Ásia, Austrália, Nova Zelândia, Europa e África. A incidência da DL é difícil de determinar porque a identificação dos casos requer vigilância adequada. O reconhecimento da DL depende da conscientização do profissional da saúde sobre a doença e opções de análise para confirmação da presença do agente. Apesar de a legionelose ser amplamente distribuída geograficamente por todo o mundo, a maioria dos casos foi relatado em países industrializados. Os nichos ecológicos que suportam *Legionella*, como os complexos de sistemas de recirculação de água e água quente mantida a 35-55°C, não são tão comuns nos países em desenvolvimento, de modo que a incidência da Doença dos Legionários pode ser comparativamente baixa nestes países. No entanto, a maior parte da variação geográfica na incidência da Doença dos Legionários é, provavelmente, devido à deficiência nos métodos para detecção da bactéria, sistemas de vigilância ou de apresentação de dados. (EPA, 2001).

Programas de vigilância nacionais são realizados atualmente nos Estados Unidos, em 24 países europeus, na Austrália e na Nova Zelândia. Em 1996, foram notificados casos da Doença dos Legionários em todos esses países europeus, incluindo a Inglaterra, País de Gales e Escócia. A taxa média europeia foi de 4,45 casos por milhão de habitantes em 1995. Com o aumento da população, passou-se a ser de quase um caso por milhão de habitantes em 1996. Esse aumento foi atribuído, principalmente, a um grande surto na Espanha, em 1996. Na Austrália, em 1991, também ocorreram 1.041 notificações da Doença dos Legionários. (EPA, 2001). Em Portugal, a Doença dos Legionários foi descrita pela primeira vez, em 1979. (MANSILHA, 2007).

No Brasil, há poucos casos da Doença dos Legionários descritos na literatura. (SCHULZ et al., 2005).

2.5 Aspectos regulamentadores

Existem alguns grupos de pesquisadores com interesse em gerar conhecimento e informação sobre os aspectos clínicos (e ambientais) epidemiológicos e microbiológicos da Doença dos Legionários.

2.5.1 Grupo Europeu para o estudo de infecções por *Legionella* (EWGLI)

Instituído em 1986, o Grupo Europeu para o Estudo de Infecções por *Legionella*, *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLI), formado por cientistas, com um objetivo em comum, o de assegurar a vigilância da Doença dos Legionários na Europa, o que foi possível por meio de fiscalização internacional da doença, bem como da evolução dos métodos de diagnóstico, manejo e tratamento. Um ano após a formação do EWGLI, foi criado o Regime de Vigilância Europeia para a Doença dos Legionários associada às viagens, *European Surveillance scheme for travel associated Legionnaires' disease* (EWGLINET), que elaborou algumas diretrizes

européias, como *European Guidelines*. Posteriormente, o Regime de Vigilância (EWGLINET) foi renomeado Regime de Vigilância Europeia para a Doença dos Legionários, *European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet), que pode ser acessado no seguinte endereço eletrônico, <<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Pages/Index.aspx>>.

O ELDSNet, coordenado pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças, *Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) em Estocolmo, Suécia, é responsável pela fiscalização da Doença dos Legionários em todos os Estados-Membros da União Europeia (EU), Islândia e Noruega. Destina-se a identificar os riscos relevantes de saúde pública, reforçar a prevenção de casos e acompanhar as tendências epidemiológicas.

2.5.2 Executivo de Saúde e Segurança (HSE) - Grã-Bretanha

Atualmente, a Grã-Bretanha tem um dos melhores desempenhos em matéria de Saúde e Segurança no Trabalho do mundo.

A estratégia do Executivo de Saúde e Segurança, *Health and Safety Executive* (HSE), é reconhecer que um mundo em mudança coloca novos desafios ao Sistema de Saúde e Segurança no seu conjunto, e é necessário preparar-se para vencê-los. Globalmente, o HSE zela pela aplicação da legislação em matéria de Saúde e Segurança no Trabalho nos locais de trabalho industriais, enquanto mais de 400 autoridades locais asseguram essa tarefa em locais de trabalho comerciais.

O HSE trabalha em estreita colaboração com uma série de interessados, autoridades e organismos locais nacionais e internacionais. Publica orientações, sob a forma de folhetos, livros e páginas na web, além de Códigos de Prática Aprovados (ACOPs) que oferecem conselhos para ajudar a entender como cumprir a lei. Os ACOPs descrevem métodos recomendados que possam ser utilizados, ou Normas a serem cumpridas, para que seja possível atender aos Regulamentos e os Deveres impostos pela Lei descrita pela Saúde e Segurança no Trabalho. Estas orientações, por sua vez, são emitidas pelo

HSE. Cada ACOP é aprovado pelo Executivo de Saúde e Segurança, com o consentimento do Secretário de Estado.

O HSE do Reino Unido atualizou as regras de segurança que lidam com o controle de riscos da *Legionella*, com uma extensa revisão de seu ACOP L8, juntamente com um documento de orientação que abrange a gestão da Doença dos Legionários e o controle de bactérias do Gênero *Legionella* em sistemas de água. O sistema formal de controle da *Legionella* agora inclui o ACOP L8 atualizado e um novo documento de orientação abrangente, HSG274, dividido em três partes: Parte 1 - Sistemas de resfriamento de água; Parte 2 - Sistemas de água quente e fria e Parte 3 - Outros sistemas de risco. É possível adquirir cópias (versões completas) do novo ACOP L8 do HSE e HSG274 partes 1, 2 (atualmente em revisão) e 3, acessando o endereço: < <http://legionellacontrol.com/downloads/ACOP-L8-4th-Edition-Compliments-Legionella-Control-International.pdf>>.

2.5.3 Portaria nº 1071/98 de 31 de dezembro (Portugal)

O primeiro caso de DL conhecido em Portugal foi publicado por Levi et al., 1981. A doença é considerada Doença de Declaração Obrigatória (DDO) desde 1999. Em 2004, foi implementado o Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da DL. Considerou-se fundamental introduzir de forma sistemática o componente laboratorial, levando em conta o baixo número de notificações clínicas, que se acreditava não corresponderem ao número real de casos de doença. A introdução da obrigatoriedade da notificação pelos laboratórios quando confirmada a presença da *Legionella* em material clínico, foi uma tentativa para aumentar o número de casos conhecidos. Em 1986, Portugal integrou-se ao EWGLI, Grupo Europeu para o Estudo de Infecções por *Legionella*. (DA SILVA CUNHA, 2013).

2.5.4 Portaria nº 3.523/98, Ministério da Saúde e Resolução nº 9 ANVISA (Brasil)

O primeiro conjunto de regras destinado a para garantir a qualidade do ar em ambientes climatizados foi a Portaria 3.523/98, do Ministério da Saúde, após a morte do ex-ministro das Comunicações, Sérgio Motta, ocasionada pela *Legionella*. Esta Portaria estabelece uma rotina de procedimentos para a limpeza em sistemas de refrigeração de grande porte. A orientação é que empresas e condomínios contratem técnicos ou um estabelecimento especializado para realizar limpezas periódicas. Em 24 de outubro de 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, publicou a Resolução RE/ANVISA nº 176, definindo padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados de uso público e coletivo e os procedimentos a serem utilizados pelas vigilâncias sanitárias no que compete à fiscalização da qualidade do ar. Posteriormente, considerando a necessidade de revisar e atualizar a RE/ANVISA nº 176, a ANVISA publicou a Resolução – RE nº 09, em 16 de janeiro de 2013.

2.6 Legionelose

A legionelose é reconhecida como uma doença bacteriana aguda com duas manifestações clínico-epidemiológicas, a Doença dos Legionários e a Febre de Pontiac. (MOPECE, 2010).

A Doença dos Legionários é traduzida como uma pneumonia severa, com tempo de incubação de 2 a 10 dias, e uma taxa de mortalidade de 15%. Constitui a manifestação clínica mais expressiva da infecção por *Legionella*, e os sintomas mais específicos desta doença são, inicialmente, dor de cabeça, dores musculares, febre acima de 39°C e calafrios associados à transpiração, logo seguidos por tosse seca e pulmões congestionados. (WHO, 2002). Tem-se registrado, igualmente, diarreia e vômitos em um terço dos casos, assim como comportamentos confusos e delirantes em 50% dos casos. As formas

mais graves resultam em pneumonia aguda ou infecção grave extrapulmonar que pode ser fatal. (AKBAS; YU, 2001).

Por sua vez, a febre de Pontiac não se associa à pneumonia ou à morte e os pacientes se recuperam de modo espontâneo entre 2 a 5 dias sem tratamento. Representa mais uma reação alérgica ao inalar um antígeno, do que uma invasão bacteriana propriamente dita. (MOPECE, 2010). Apresenta tempo de incubação de 1 a 7 dias, é uma doença autocontrolada, um tipo de gripe, caracterizada por um acesso súbito e agudo de febre, tremores, mal-estar, dores de cabeça e musculares, mas sem complicações, e que não requer tratamento específico. (WHO, 2007).

Ambas as doenças são transmitidas por via aérea, por meio de aerossóis de água contaminada com estirpes virulentas de *Legionella*, ou seja, a bactéria utiliza o ar como via de propagação e, por isso, basta uma simples inalação para que ocorra o contágio. Ressalta-se que não se reconhece transmissão de pessoa a pessoa, contágio por ingestão de água contaminada (LEE, et al., 2002), e quaisquer animais como reservatórios relevantes para a saúde pública. (BLATT et al. 1994, STOUT; YU, 1997).

2.7 Tratamento

Atualmente, as diretrizes de tratamento empírico, ou seja, o tratamento iniciado apenas com base nos sintomas das pneumonias da comunidade inclui antibióticos com cobertura para *Legionella*. Historicamente, a eritromicina era o fármaco de primeira linha para esta infecção, mas foi preterida face à intolerância gastrointestinal, à ototoxicidade e ao fato de exigir grande volume na administração endovenosa. Os novos macrólidos, preferencialmente a azitromicina, mas também claritromicina, fosomicina e roxitromicina, têm melhor atividade *in vitro* e melhor penetração intracelular e pulmonar. As quinolonas, ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, têm ainda melhor atividade *in vitro*, e melhor penetração intracelular e pulmonar, do que os macrólidos, e são os preferidos em doentes transplantados, porque os

macrólidos, assim como a rifampicina, interagem com os fármacos imunossupressores. A rifampicina é altamente ativa *in vivo* e *in vitro*, sendo uma alternativa válida para doentes muito graves e resistentes a outro tratamento, em combinação com um macrólido ou uma quinolona. As tetraciclina, doxiciclina e minociclina também são ativas contra a *Legionella*. Alguns estudos revelam ainda alguma eficácia para imipenem, cotrimoxazol, ofloxacina e clindamicina. As doses aconselhadas (Quadro 1) são as mesmas utilizadas em outras pneumonias. (LEMOS, et al., 2010).

Quadro 1 - Doses recomendadas dos antibióticos

Doses recomendadas dos antibióticos	
Antibiótico	Doses
Azitromicina	500 mg q24h, ev ou <i>per os</i>
Claritromicina	500 mg q24h, ev ou <i>per os</i>
Roxitromicina	300 mg q24h, <i>per os</i>
Eritromicina	1 g q6h ev ou 500 mg q6h <i>per os</i>
Levofloxacina	500 mg q24h, ev ou <i>per os</i>
Ciprofloxacina	400 mg q8h ev ou 750 mg q12h <i>per os</i>
Ofloxacina	400 mg q12h, ev ou <i>per os</i>
Doxiciclina	100 mg q12h, ev ou <i>per os</i>
Minociclina	100 mg q12h, ev ou <i>per os</i>
Tetraciclina	500 mg q6h, ev ou <i>per os</i>
Cotrimoxazol	960 mg q8h ev ou 960 mg q12h <i>per os</i>
Rifampicina	300 a 600 mg q12h, ev ou <i>per os</i>
Legenda – ev: endovenoso; q24h (exemplo): a cada 24 horas; <i>per os</i> : do latim, pela boca.	

Fonte: Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol17/vol17_2010_n4_228_236.pdf>.
Acesso em: 12 set. 2014. Adaptado.

A terapêutica em meio hospitalar é administrada por via parenteral até se obter resposta clínica, ficando a maioria dos doentes apiréticos em 72 horas. A seguir, utiliza-se a via oral. A duração do tratamento com antibiótico varia de 10 a 14 dias para a maioria dos casos, recomendando-se 21 dias nos imunodeprimidos ou naqueles com doença muito extensa; e de 5 a 10 dias, quando utilizada a azitromicina. (STOUT; YU, 1997; MARRIE, et al., 1996;

AMSDEN, 2005; RATHORE, 2007; BLASQUEZ, ESPINOSA, ALEMANY et al., 2005). Indivíduos com doença sem gravidade e capazes de cumprirem a terapêutica e a vigilância adequadas podem ser tratados em ambulatório. (STOUT; YU, 1997; RATHORE, 2007). Já a Febre de Pontiac requer apenas tratamento sintomático. (LEMOS et al., 2010).

2.8 Epidemiologia, Patogenicidade e Prevenção

2.8.1 Epidemiologia

A infecção depende do nível de contaminação da água, virulência da bactéria, eficácia da formação e disseminação de aerossóis (direção do vento, umidade relativa do ar), tempo de exposição e fatores de risco do hospedeiro. (WHO, 2002).

2.8.2 Patogenicidade

A patogenicidade da *Legionella* depende da susceptibilidade do hospedeiro: crianças e adultos saudáveis têm baixa probabilidade de adoecer, considerando que têm boas condições de defesa, não permitindo que a bactéria atinja os pulmões e os colonize. Indivíduos de maior idade (geralmente acima dos 50 anos), homens (cujo risco de contrair a doença é três vezes superior ao da mulher), fumantes, assim como indivíduos com sistema imunitário debilitado devido a HIV, diabetes, falha crônica renal, cancro, alcoolismo, transplantes de órgãos, tratamento com esteróides, entre outros, apresentam um risco significativo de contrair a Doença dos Legionários. Contrariamente, a Febre Pontiac afeta tão frequentemente crianças e adultos saudáveis, bem como indivíduos com sistema imunitário debilitado. (WHO, 2002).

2.8.3 Prevenção

O entendimento do modo de transmissão da *Legionella* dos seus reservatórios naturais para humanos é fundamental para a adoção de medidas preventivas da Doença dos Legionários. A contaminação por *Legionella* é comumente facilitada por equipamentos que produzem aerossóis, como condensadores de evaporação, umidificadores do ar, torres de resfriamento, chafarizes e aerossóis de água potável formados nos chuveiros e nos sistemas de ar condicionado. Fontes de água parada ou de sedimentos em reservatórios de água precisam ser eliminadas e os umidificadores do ar devem ser limpos regularmente. Assim, um modo de reduzir o potencial de transmissão da *Legionella* é evitar a formação de aerossóis que constituem um meio primário de transmissão aos humanos. (WHO, 2002).

Nos últimos 13 anos, vários métodos de desinfecção dos sistemas de distribuição de água têm sido testados com relativo sucesso. Os três métodos atualmente utilizados são: superaquecimento da água, instalação de unidade de ionização com cobre e prata e hipercloração da água. (STOU; YU, 1997).

2.8.3.1 Superaquecimento da água

Locais onde a temperatura é utilizada como controle, a água quente deve ser armazenada em uma temperatura mínima de 60°C, e distribuída de modo que ela atinja uma temperatura mínima de 50°C. E em instalações da área da saúde distribuída a uma temperatura mínima de 55°C. Temperaturas muito mais altas devem ser evitadas devido ao risco de queimaduras. A 50°C, o risco de queimaduras é pequeno para a maioria das pessoas, mas o risco aumenta rapidamente com temperaturas mais altas e para tempos de exposição mais longos, especialmente para crianças, idosos ou pessoas com deficiência. (ACOP L8, 2013).

2.8.3.2 Ionização com cobre e prata

Ionização é o termo dado para a geração eletrolítica de íons de cobre e prata que fornecem uma liberação contínua de íons na água. Estas são geradas por passagem de uma baixa corrente elétrica entre dois eletrodos, um de cobre e um de prata. Esse método de controle quando utilizado corretamente, tem sido bastante eficaz no controle da *Legionella*, pois consegue penetrar em biofilmes já estabelecidos em sistemas de água. Porém, um controle rigoroso e regular da água deve ser mantido para assegurar que o nível de cobre não exceda 2,0 mg/ L, e a prata não seja superior a 0,1 mg/L. (ACOP L8, 2013).

2.8.3.3 Hipercloração da água

O cloro é um agente bactericida amplamente utilizado para desinfecção de sistemas de água. É adicionado durante o tratamento, com o objetivo de eliminar bactérias e outros microrganismos que podem estar presentes na água. Porém, a maioria das fontes de alimentação de água podem conter um baixo nível de cloro residual (0,1 e 0,5 mg/L) até o ponto onde a água está sendo recebida. Este nível de cloro pode não ser suficiente para inibir o crescimento da *Legionella* dentro do sistema. (ACOP L8, 2013). Nesse caso, o aumento da dosagem de cloro (6,0 a 8,0 mg/L) pode auxiliar no controle da *Legionella*. (STOU; YU, 1997).

2.9 Técnicas para detecção da *Legionella*

O isolamento e a identificação da *Legionella* baseiam-se em vários 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; EDELSTEIN, 1993; PELIZZARI et al., 1995; CARVALHO et al., 2007).

Em amostras ambientais, diferentes métodos têm sido aplicados para a detecção de espécies de *Legionella*. O cultivo em meio de cultura seletivo é um método padrão e certificado para a determinação de bactéria do gênero *Legionella*. (KOZIOL-MONTEWKA et al., 2008). Permite o isolamento e a quantificação da bactéria, porém apresenta desvantagens como o tempo de até 10 dias \pm 02 para obtenção dos resultados, além da possibilidade de haver perda de células durante o processo de concentração, ou durante o tratamento ácido, além de existir também a possibilidade de bactérias oportunistas de crescimento mais rápido impedirem seu crescimento. (FIELDS et al., 2002; TRONEL; HARTEMANN, 2009).

Deste modo, têm-se desenvolvido métodos moleculares adequados para as amostras ambientais que permitem analisar, de um modo mais rápido e preciso os microrganismos existentes. Esse é o caso da técnica de PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) que permite, a partir de um pequeno fragmento do DNA de interesse, específico de um dado microrganismo, a sua amplificação até um número detectável. (SOINI; MUSSER, 1994).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação de *Legionella* spp. em amostras de água da área urbana e área rural das regiões da Grande São Paulo e Interior do Estado.

3.2 Específicos

- Identificar a *Legionella* spp. em ambientes aquáticos naturais, como nascentes (lagos, poços artesianos), e em ambientes aquáticos artificiais (torneiras, chuveiros, ares condicionados, torres de resfriamentos), tanto na área urbana da grande São Paulo e Interior do Estado, quanto da área rural, do município de Sarapuí, São Paulo, ligado à COLAF (Cooperativa dos Produtores de Leite e Demais Produtos da Agricultura Familiar).
- Revisar as metodologias de isolamento em cultura recomendados, como International Standard ISO 11731-2 e Standard Methods, ambos por membrana filtrante, para melhor diagnóstico laboratorial.
- Comparar os resultados dos métodos utilizados, isolamento e enumeração em cultura e PCR.
- Avaliar a qualidade microbiológica da água na área rural.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

As coletas das amostras de água foram realizadas de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd edition, Washington, APHA AWWA, WEF, 2012 – 9060A Collection. (RICE et al., 2012). As amostras foram coletadas em frascos estéreis de polipropileno de 1000 mL e, quando necessário, em frascos estéreis de polipropileno de 250 mL. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas, durante o transporte até o Laboratório Microbiológico da empresa Microambiental Laboratório Comércio e Serviços em Água Ltda., localizado em São Caetano do Sul, São Paulo, SP.

Na área urbana, foram coletadas 212 amostras de água, de diferentes origens, como chuveiros, torneiras, ares condicionados e amostras de torres de resfriamento (Fotografias 2 a 4), de hospitais, indústrias, shoppings e hotéis, das regiões da Grande São Paulo, no período de junho de 2014 a outubro de 2014.

Fotografias 2 a 4 – Locais de coleta das amostras de água, área urbana.



Fotografia 2 - Chuveiro



Fotografia 3 - Torneira



Fotografia 4 – Reservatório

Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda., 2014.

Na área rural, foram coletadas 21 amostras de água, de diferentes origens, como amostras de nascentes, amostras de poços artesianos, amostras de torneiras e amostras de chuveiros (Fotografias 5 a 7), de 9 propriedades rurais, situadas na Cidade de Sarapuí, São Paulo, ligadas à COLAF (Cooperativa dos Produtores de Leite e Demais Produtos da Agricultura Familiar do Município de Sarapuí e Região), nos meses de Fevereiro e Agosto de 2014.

Fotografias 5 a 7 – Locais de coleta das amostras de água, área rural.



Fotografia 5 - Nascente



Fotografia 6 - Nascente



Fotografia 7 - Nascente

Fonte: Marisilda Albanese, 2014.

4.2 Isolamento em cultura e enumeração de *Legionella*

Para o isolamento em cultura e enumeração da *Legionella* tanto para as amostras da área urbana, quanto para as amostras da área rural, utilizou-se o método padrão de referência de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition, Washington. APHA

AWWA, WEF, 2012 – 9260 Detection of pathogenic bacteria - J. *Legionella*. (RICE et al., 2012).

4.2.1 Concentração das amostras pelo método de membrana filtrante

As amostras foram concentradas pelo método de membrana filtrante, com o auxílio de uma bomba de vácuo, e um sistema de filtração tipo manifold (Fotografia 8), em membrana filtrante de 0,2 μm .

Fotografia 8 - Sistema de filtração tipo manifold



Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2014.

A membrana filtrante foi inserida cuidadosamente em um tubo estéril tipo Falcon, de 50 mL, contendo 5 mL de água estéril. Em seguida, o tubo foi homogeneizado, durante 30 segundos, em agitador, tipo Vórtex, em velocidade máxima (3000rpm), para que bactérias livres e material orgânico pudessem ser desprendidos da membrana.

4.2.2 Tratamento ácido com solução tampão ácido HCl/KCl

Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão bacteriana foi transferida para um tubo tipo Falcon, de 50 mL, contendo 1,0 mL de solução tampão ácido HCl/KCl

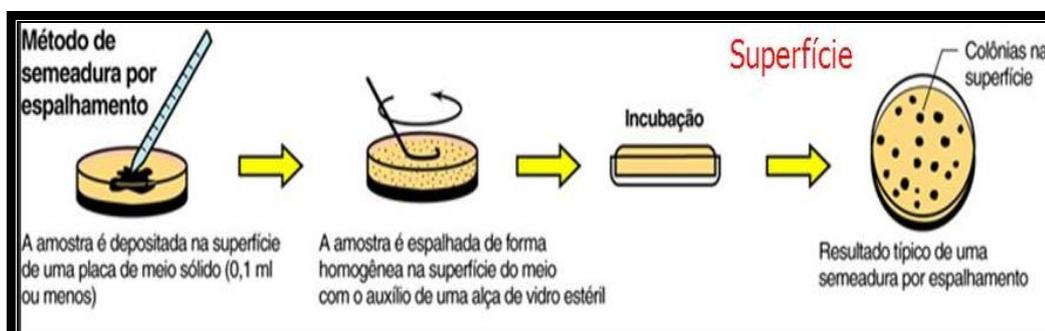
(Anexo 1), homogeneizada e incubada à temperatura ambiente, durante 15 minutos. O tratamento com ácido em amostras é rotineiramente usado pois, para algumas amostras de água com elevadas concentrações bacterianas, é necessário recorrer a um processo seletivo para reduzir o número de bactérias não *Legionella* antes da cultura.

4.3 Semeadura das amostras pela técnica *spread plate* (semeadura por espalhamento)

Para semeadura das amostras pela técnica *spread plate* (semeadura por espalhamento), foram utilizados volumes de 100µL da amostra com tratamento ácido, e 100µL da amostra sem tratamento ácido (Esquema 2). Os volumes foram inoculados em placas de Petri 90 mm x 15 mm, em triplicata, contendo os meios de cultura Ágar BCYE e GVPC, descritos nos Anexos B e C, respectivamente. O tampão presente nos meios de cultura é capaz de neutralizar a amostra, por essa razão a amostra com tratamento ácido também foi inoculada diretamente nos meios de cultura Agar BCYE e GVPC.

Após a inoculação dos volumes, com o auxílio de uma alça de Drigalski as amostras foram espalhadas por toda superfície da placa de maneira homogênea, até a sua completa absorção.

Esquema 2 - Representação do método de semeadura por espalhamento (*spread plate*).



Fonte: Disponível em: < <http://slideplayer.com.br/slide/359687/>>. Acesso em: 04 mar.2015.

4.4 Período de incubação

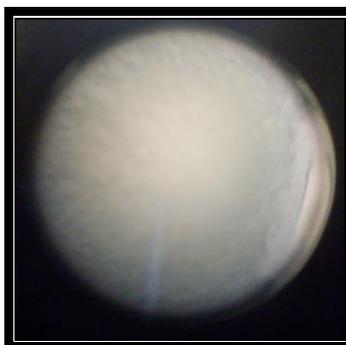
As amostras permaneceram na estufa bacteriológica durante o período de 10 dias, a uma temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pois colônias de *Legionella* requerem aproximadamente 72 horas, ou seja, 03 dias de incubação, para serem visualizadas em meio de cultura BCYE, podendo exigir até 07 dias ou mais, para o seu desenvolvimento.

As placas foram examinadas, com o auxílio de um microscópio, em duas ocasiões, no 4º dia e no 10º dia.

4.5 Colônias típicas de *Legionella*

Após 4 dias aproximadamente de incubação, as colônias típicas de *Legionella* apresentam-se com 2 a 4 mm de diâmetro, são normalmente convexas, com bordas inteiras arredondadas, de superfície lisa e brilhante (Fotografia 9). Observadas à lupa (40x) sob luz incidente, tem um aspecto característico semelhante a “vidro moído”. O centro da colônia é geralmente de cor branca brilhante. Em algumas espécies, a colônia pode ser limitada com um halo azul, roxo, verde ou vermelho com autofluorescência. (RICE, et al., 2012).

Fotografia 9 – Colônia de *Legionella*

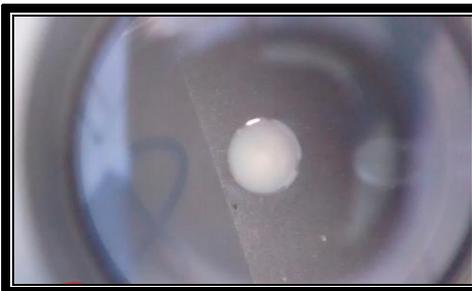


Fonte: PARADN Biotechnologia S.A.

Disponível em: <<https://www.facebook.com/PARADN>>. Acesso em: Set. 2014.

Colônias típicas de *Legionella* podem ser identificadas presuntivamente com base na sua necessidade de L-cisteína (Anexo D) por subcultura em Agar BCYE. (RICE, et al., 2012). Portanto, colônias típicas (Fotografia 10) desenvolvem-se, tanto no Agar BCYE, quanto no Agar GVPC, após o período de incubação.

Fotografia 10 – Colônia típica de *Legionella*

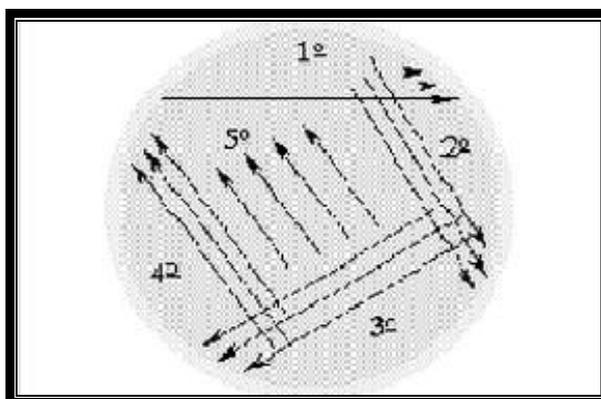


Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2015.

4.5.1 Confirmação de colônias típicas de *Legionella*

Após serem evidenciadas, as colônias típicas de *Legionella* foram semeadas cuidadosamente, com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, pela técnica do esgotamento do inoculo por estrias (Esquema 3), nas placas de petri 90 mm x 15 mm, contendo os meios de cultura Ágar BCYE (Anexo B) e Ágar BCYE-Cys (Anexo E), simultaneamente. Em seguida, as placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 03 dias.

Esquema 3 – Técnica do esgotamento do inóculo por estrias



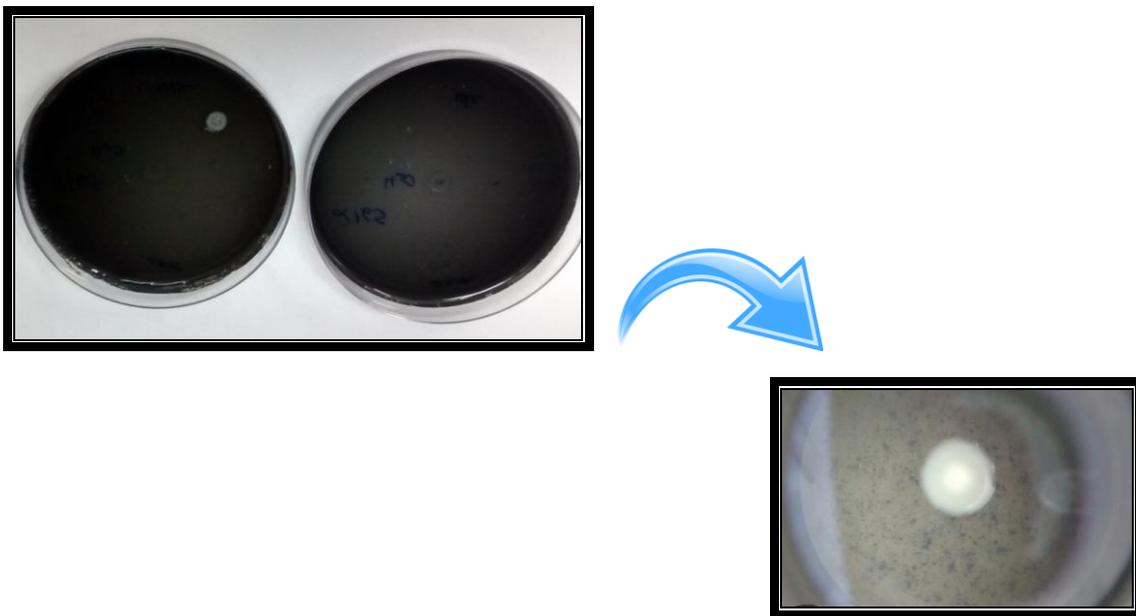
Fonte: Disponível: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABNZMAF/relatorio-aula-pratica-microbiologia>>.

Acesso em: 04 mar. 2015.

4.6 Expressão dos resultados

Após o período de 3 dias de incubação, considerou-se amostra positiva para *Legionella* spp. quando houve crescimento bacteriano no meio Agar BCYE e não houve crescimento bacteriano no meio Agar BCYE-CYS. Foi considerada amostra negativa para *Legionella* spp. quando houve crescimento bacteriano no meio Agar BCYE e no meio Agar BCYE-CYS (Fotografia 11).

Fotografia 11 – Expressão de resultado: placa BCYE e BCYE-Cys



Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2014.

4.7 Análise molecular

Para análise molecular, utilizou-se os kits comerciais descritos abaixo, tanto para as amostras da área urbana, quanto para as amostras da área rural.

4.7.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA das amostras de água, foi utilizado o protocolo de extração do kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification kit Promega, para Gram negativa. Adicionou-se 1 mL de amostra (água) em um tubo tipo eppendorf; centrifugou-se por 2 minutos, a 14.000 x g; removeu-se o sobrenadante; adicionou-se 600 µL de *Nuclei Lysis Solution*; incubou-se a 80°C por 8 minutos em Termomix (Eppendorf[®]); adicionou-se 3 µL de *RNase Solution*; homogeneizou-se suavemente por inversão; incubou-se a 37°C por 30 minutos em Termomix (Eppendorf[®]); adicionou-se 200 µL de *Protein Precipitation Solution*; homogeneizou-se em agitador tipo vórtex por 20 segundos; incubou-se em gelo por 5 minutos; centrifugou-se por 3 minutos, a 14.000 x g; removeu-se o sobrenadante e transferiu-se para um novo tubo tipo eppendorf, contendo 600µL de isopropanol a temperatura ambiente; homogeneizou-se gentilmente por inversão; centrifugou-se por 2 minutos a 14.000 x g; removeu-se o sobrenadante; adicionou-se 600µL de etanol 70% à temperatura ambiente; homogeneizou-se suavemente por inversão; centrifugou-se por 2 minutos a 14.000 x g; removeu-se o sobrenadante e secou-se o pellet; adicionou-se 100 µL de *DNA Rehydration Solution*; o extraído foi incubado em *overnight* à 4°C; as amostras foram armazenadas em freezer 20°C negativos até a etapa de amplificação.

4.7.2 Amplificação do DNA

Para a amplificação do DNA bacteriano extraído das amostras de água foi utilizado o kit comercial Platinum[®] Taq DNA Polymerase.

Para volume total de 25 µL, preparou-se 22,5 µL da seguinte mistura dos reagentes para amplificação 2,5 µL do DNA da amostra extraída, conforme descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Reagentes para amplificação.

Reagentes	Volume para uma amostra (µL)	Concentração final
Nuclease water free	18	-
10X PCR Buffer	2,5	1X
50mM MgCl ₂	0,75	1,5mM
10mM dNTP	0,625	0,25mM
Primers <i>Legionella</i> Mix (10pmol/µL)	0,5	0,6U/reacção
Taq DNA (5U/uL)	0,125	0,2µM
DNA	2,5	-
Volume total	25,0	-

Para o presente estudo foram empregados dois conjuntos de primers (Quadro 3), um que detecta o gênero *Legionella* e o outro detecta a espécie *L.pneumophila*, adquiridos da empresa PARADN Biotechnologia S.A., e que amplificam, respectivamente 259 e 179 pb.

Quadro 3 – Iniciadores, primers .

Primers	Tamanho do fragmento (pB)
F2/R2 - <i>Legionella</i> spp.	259
F3/R3 - <i>Legionella pneumophila</i>	179
Legenda: pB = pares de base.	

Fonte: François W. Paradis, 2014.

Os ciclos de amplificação da PCR de *Legionella* estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4 - Ciclo de amplificação da PCR para *Legionella*

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	94	7 minutos
45	94	30 segundos
	55	45 segundos
	72	45 segundos
1	72	7 minutos
Hold	4	∞

Fonte: François W. Paradis, 2014.

Os controles, positivo e negativos utilizados na PCR, estão descritos no quadro 5.

Quadro 5 – Cepas bacterianas utilizadas como controles positivo e negativo.

Controles	Microrganismo
Positivo	ATCC [®] 33152 <i>Legionella pneumophila</i>
Negativo	ATCC [®] 25922 <i>Escherichia coli</i> (Gram negativa)
Negativo	ATCC [®] 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram negativa)
Negativo	ATCC [®] 29212 <i>Enterococcus faecalis</i> (Gram positiva)
Negativo	ATCC [®] 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positiva)

Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2015.

4.7.3 Análise do amplificado

O produto de cada amplificação foi aplicado em gel de agarose a 1%, preparado em tampão TBE 1X e submetido à eletroforese com uma voltagem constante de 100 V por 1 hora. A presença de amplicons foi evidenciada após coloração com mistura de GelRed[®] 1:150 (Biotium) e tampão de carregamento Loading Dye 6x (Thermo Scientific) e visualização em transluminador sob luz ultravioleta (320nm). O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA ladder de 100 pb – Thermo Scientific[®]). O tamanho esperado foi, respectivamente, de 259 pb (*L. spp*) e 179 pb (*L. pneumophila*).

4.8 Análises microbiológicas nas amostras de água da área rural

Para as amostras da área rural foi analisada a qualidade da água destinada para o consumo humano, e os parâmetros analisados foram contagem de bactérias heterotróficas, presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.

As bactérias heterotróficas são bactérias que utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono, estando incluídas neste grupo tanto bactérias patogênicas como aquelas pertencentes ao grupo dos coliformes. Entretanto, de acordo com estudos epidemiológicos, foi concluído que, na ausência de contaminação fecal, não há uma associação direta entre as concentrações de bactérias heterotróficas na água de consumo humano e efeitos à saúde na população geral. (BARTRAM, 2003). As bactérias heterotróficas estão presentes em todos os tipos de água, nos alimentos, no solo, na vegetação e no ar. Sua contagem pode fornecer uma indicação geral sobre a qualidade microbiológica da água tratada e, quando realizada regularmente, pode demonstrar alterações devido ao armazenamento (recrescimento, formação de biofilme), eficiência dos métodos de tratamento, integridade e limpeza do sistema de distribuição. (WHO, 2003).

O grupo dos coliformes é composto por vários gêneros de bactérias que compartilham semelhanças metabólicas. Mais especificamente, pela definição da Organização Mundial da Saúde, coliformes são bactérias Gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativos, oxidase negativas, capazes de se desenvolver em presença de sais biliares ou tensoativos, capazes de fermentar a lactose a 37°C com produção de ácido, gás e aldeído em até 48 horas, não formadoras de esporos, e que apresentam atividade da enzima β -galactosidase. (WHO, 2003). O grupo dos coliformes é vasto, e apesar de conter diversas espécies encontradas no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, também agrupa um grande número de outras espécies que possuem origem ambiental, sendo estas encontradas em águas limpas, frutos do mar, e até mesmo em vegetais. Dentre os diversos gêneros que compõe o grupo dos coliformes, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* destacam-se por estar presentes em grandes quantidades nas fezes de animais e, por esta razão, têm sido extensivamente utilizadas como indicadores de contaminação fecal. (LECLERC et al., 2001).

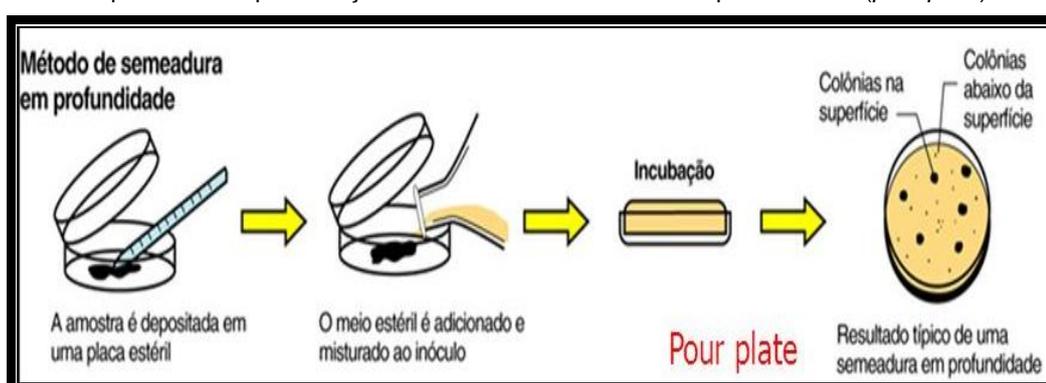
4.8.1 Contagem de bactérias heterotróficas

Nesse estudo, para a contagem de bactérias heterotróficas, as amostras de água da área rural foram analisadas pelo método *pour plate* de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition, Washington. APHA AWWA, WEF, 2012 – 9215 B. Pour plate method. (RICE et al., 2012).

4.8.1.1 Inoculação em profundidade pelo método *pour plate*

Para contagem de bactérias heterotróficas foi inoculado 1 mL de cada amostra de água, em placa de petri 90 mm x 15 mm, e em duplicata, e acrescentou-se 10 mL do meio de cultura Ágar Plate Count - PCA (Anexo F). Em seguida, homogeneizou-se o inóculo e o meio de cultura PCA contidos na placa de petri, com movimentos circulares, em forma de oito, aproximadamente dez vezes consecutivas (Esquema 4). As placas foram incubadas durante 48 horas a uma temperatura de 35°C.

Esquema 4 - Representação do método de semeadura em profundidade (*pour plate*).



Fonte: Disponível em: < <http://slideplayer.com.br/slide/359687/>>. Acesso em 04 mar. 2015.

4.8.1.2 Contagem de unidade formadora de colônias

Após o período de incubação, com o auxílio de um contador de colônias, foi realizada a contagem de bactérias heterotróficas, em unidades formadoras de colônias (UFC), de cada placa de petri inoculada.

Foram consideradas as situações descritas a seguir durante a contagem. Nas placas de petri com contagens inferiores a 300 UFC, contaram-se as colônias em toda a área da placa de petri; placas de petri com contagens superiores a 300 UFC foram consideradas três situações:

1º situação: placas com menos de 10 UFC por cm^2 : para cada uma das placas contaram-se as colônias de 19 quadrados representativos do contador e multiplicou-se a soma por 3;

2º situação: placas de petri com 10 a 100 UFC por cm^2 : para cada uma das placas contaram-se as colônias de 4 quadrados representativos do contador, calculou-se a média dos 4 quadrados (contagem de 4cm^2) e multiplicou-se o resultado pela área da placa de petri 57 cm^2 ;

3º situação: placas de petri com contagens superiores a 100 UFC por cm^2 , considerou-se como >5700 , ou seja, incontável.

Nas placas de petri que não apresentaram UFC, considerou-se como <1 , ou seja, não houve desenvolvimento de unidade formadora de colônia.

Para o resultado final, foi calculada a média aritmética entre as duplicatas de cada amostra de água, e foram considerados os seguintes arredondamentos: quando os resultados das médias das placas apresentaram-se superiores a 100 UFC, arredondou-se para 02 algarismos significativos. Exemplos: média = 142, o resultado final considerado foi 140; média = 155, o resultado final considerado foi 160; média = 1349, o resultado final considerado foi 1300; média = 1350, o resultado final considerado foi 1400. Quando os resultados das médias das placas se apresentaram inferiores a 100 UFC, não houve necessidade de arredondamento. Exemplo: média = 35, o resultado final considerado foi 35.

4.8.2 Coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*

Nesse estudo, todas as amostras foram concentradas pelo método de membrana filtrante para as detecções de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition, Washington. APHA AWWA, WEF, 2012 – 9222 B. Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure, 9222 D. Fecal Coliform Membrane Filter Procedure. (RICE et al., 2012).

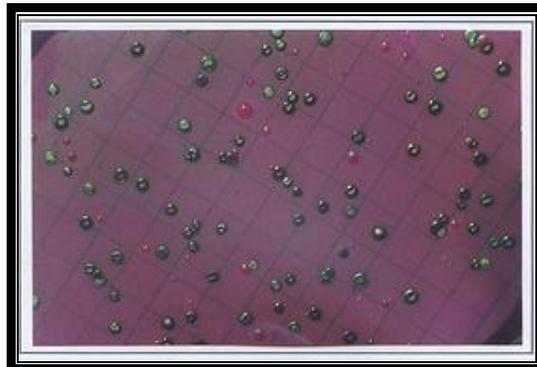
4.8.2.1 Concentração das amostras de água pelo método de membrana filtrante

As amostras foram concentradas pelo método de membrana filtrante, com o auxílio de uma bomba de vácuo e um sistema de filtração tipo manifold (Fotografia 8), em membrana filtrante de 0,45 µm. Após a concentração da amostra, a membrana foi inserida cuidadosamente sobre o meio de cultura Ágar m-Endo (Anexo G). As placas de petri contendo o meio de cultura e a membrana foram incubadas por 48 horas a uma temperatura de 35,0°C.

4.8.2.2 Avaliação presuntiva para coliformes

Após o período de incubação, as colônias típicas de coliformes que apresentam uma coloração de rosa a vermelho-escuro, com brilho metálico na superfície (Fotografia 12), passaram por um teste de confirmação.

Fotografia 12 - Colônias típicas e atípicas de coliformes



Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2014.

4.8.2.3 Teste para confirmação de colônias típicas de coliformes

As colônias típicas de coliformes foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura caldo lauril triptose com púrpura de bromocresol (Anexo H), para confirmação. Os tubos de ensaio inoculados foram incubados a uma temperatura de 35,0°C, durante 48 horas. Foram consideradas amostras positivas presuntivas para coliformes aquelas que apresentarem formação de gás no tubo de Durham invertido dentro do tubo de ensaio e meio de cultura acidificado (Fotografia 13). Os inóculos foram transferidos para os meios de cultura caldo lactosado com verde brilhante e bile 2% (Anexo I) e caldo EC médium com Mug (Anexo J), meios utilizados para confirmação de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, respectivamente. Para confirmação de coliformes termotolerantes, os tubos inoculados foram incubados a uma temperatura de 35,0°C, durante 48 horas e, para confirmação de *Escherichia coli*, os tubos inoculados foram incubados a uma temperatura de 44,5°C, durante 48 horas.

Foram consideradas amostras positivas para coliformes termotolerantes aquelas que apresentaram formação de gás no tubo de Durham invertido dentro do tubo de ensaio, e ou acidificação do meio de cultura caldo lactosado com verde brilhante e bile 2% (Fotografia 14). Para *Escherichia coli* foram

consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram formação de gás no tubo de Durham invertido dentro do tubo de ensaio, e ou acidificação do meio de cultura caldo EC médium com Mug e fluorescência quando expostas a luz ultravioleta a um comprimento de onda de 365 nm (Fotografia 15).

Fotografia 13: Caldo lauril triptose



Fotografia 14: Caldo verde brilhante



Fotografia 15: Caldo EC Médium Mug



Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2014.

5 RESULTADOS

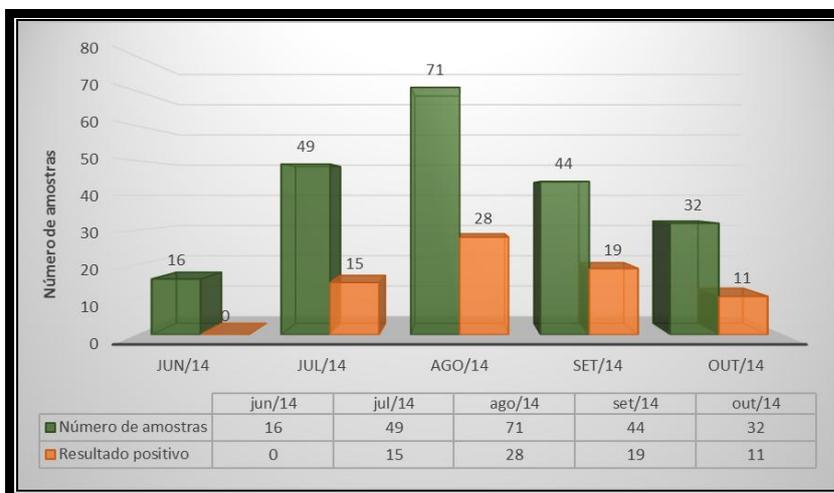
Neste trabalho, foram coletadas amostras de água de diversas procedências tanto da área urbana, quanto da área rural das regiões da Grande São Paulo e Interior do Estado. A identificação e dados das amostras de água estão representados nos Apêndices B e C.

5.1 Resultados obtidos pela técnica de isolamento

5.1.1 Área urbana

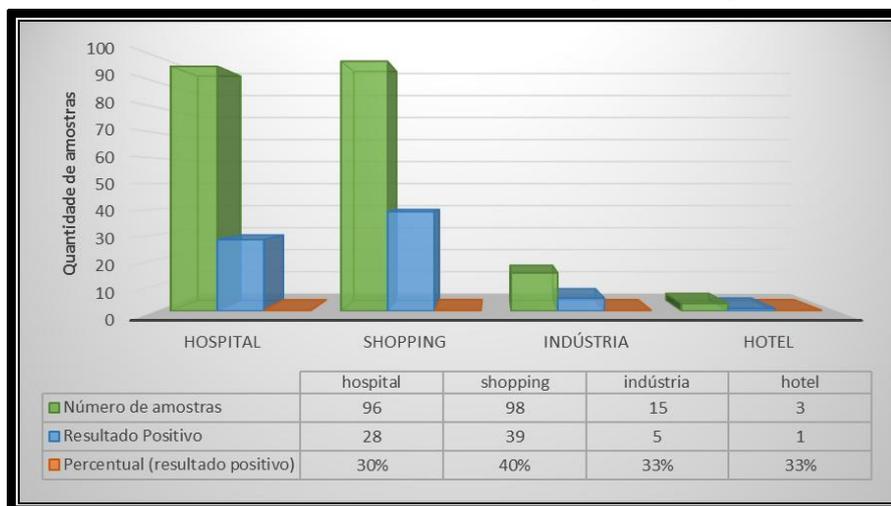
Na área urbana foram coletadas 212 amostras de água de diversos pontos de coleta como reservatórios, chuveiros, torneiras, lavatórios, banheiras, aquecedores, ares-condicionados e torres de resfriamento, presentes em diferentes locais, como hospitais, shoppings, indústrias e hotéis, no período de junho a outubro de 2014, na região da grande São Paulo e Interior do Estado. Das 212 amostras de água analisadas pela técnica de isolamento em cultura, 34% (73/212) foram consideradas presuntivas (positivas) para *Legionella* spp. A distribuição do número de amostras está representada no Gráfico 1.

Gráfico 1- Distribuição do número de amostras de água para pesquisa de *Legionella* de junho a outubro de 2014, área urbana.



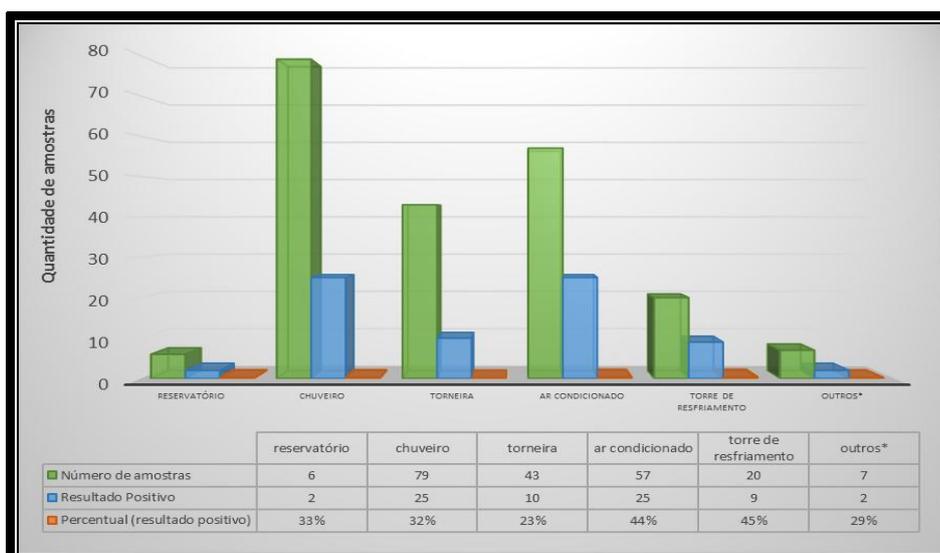
A distribuição e o percentual do número de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp., segundo o local de coleta estão representados no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Distribuição do número de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp., segundo o local de coleta.



A distribuição e o percentual do número de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp., segundo o ponto de coleta está representado no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Distribuição do número de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp. (segundo o ponto de coleta).

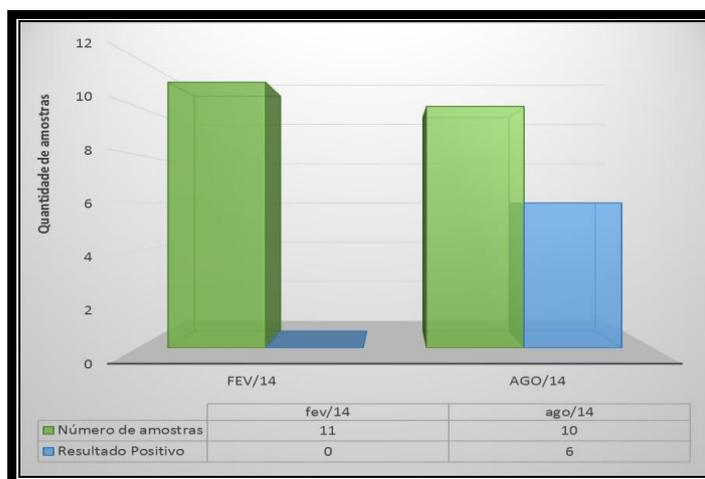


No Gráfico 3, outros corresponde aos seguintes pontos de coleta: 2 amostras de lavatório, 1 amostra de banheira, 1 amostra de aquecedor e 3 amostras de fonte chafariz.

5.1.2 Área rural

Na área rural foram coletadas 21 amostras de água, de 9 propriedades rurais, ligadas à COLAF (Cooperativa dos Produtores de Leite e Demais Produtos da Agricultura Familiar), do município de Sarapuí - São Paulo, no período de fevereiro e agosto de 2014. Os pontos de coleta foram nascentes, poços artesianos, chuveiros e torneiras. A distribuição do número de amostras está representada no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Distribuição do número de amostras de água para pesquisa de *Legionella*, área rural

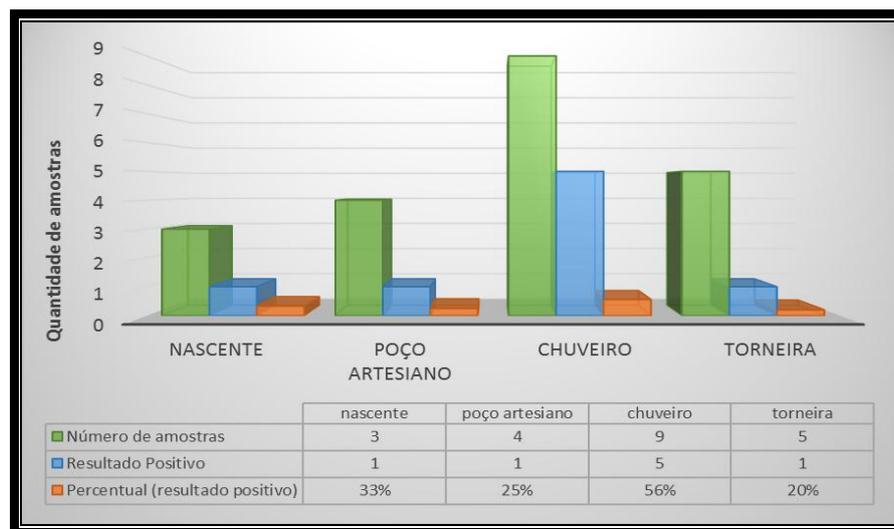


Em fevereiro de 2014, utilizou-se o método de isolamento INTERNACIONAL STANDARD ISO 11731-2 (01/05/2004). Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*. Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts. Já em agosto de 2014, utilizou-se o método de isolamento STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER 22th edition, Washington. APHA, AWWA, WEF, 2012 – (9260 Detection of pathogenic bactéria – J. *Legionella*). Porém, as

amostras de fevereiro de 2014, não foram repetidas para a metodologia empregada em agosto de 2014.

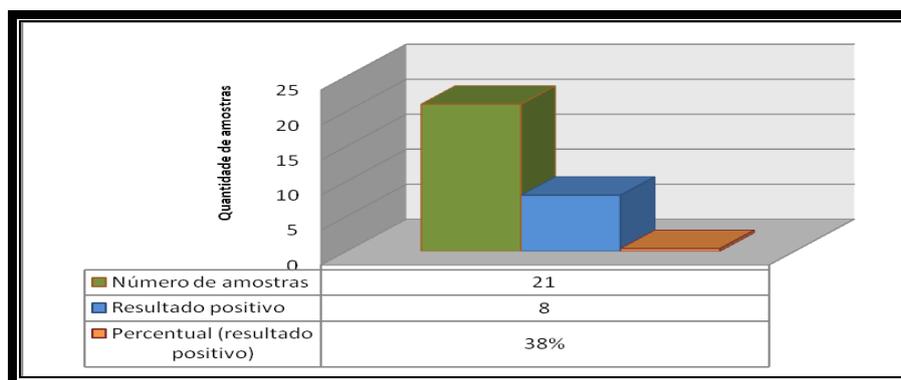
A distribuição e o percentual do número de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp., segundo o ponto de coleta está representado no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Distribuição do número de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp. (segundo o ponto de coleta).



O total 38% (8/21) de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp., está representado no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Total de amostras com resultado presuntivo para *Legionella* spp., área rural



Também, foi possível identificar a má qualidade da água destinada para o consumo humano em 67% (14/21) das amostras analisadas nessas propriedades, conforme estabelecido na PORTARIA No 2.914, DE 12 DE

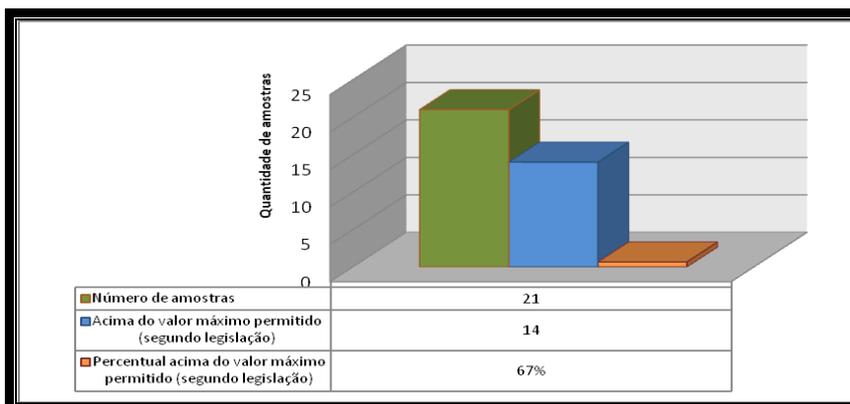
DEZEMBRO DE 2011, que dispões sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Os valores máximos permitidos por essa portaria são, para contagem de bactérias heterotróficas, até 500 UFC, Coliformes totais e *E. coli*, devem ser ausentes. Os resultados estão disponíveis no Quadro 6, e representados no Gráfico 7.

Quadro 6 - Resultados microbiológicos das amostras coletadas na área rural.

Registro amostra	Município	Propriedade	Ponto coleta	Mês coleta	Temperatura (°C)	pH	CBH (UFC)	Coliformes Totais (UFC)	<i>E.coli</i> (UFC)
rural1.14	Sarapuí	1	nascente	fev/14	NI	NI	>5700	100	100
rural2.14	Sarapuí		chuveiro		NI	NI	>5700	35	<1
rural3.14	Sarapuí		torneira		NI	NI	>5700	10	<1
rural4.14	Sarapuí	2	chuveiro		NI	NI	>5700	48	<1
rural5.14	Sarapuí		poço		NI	NI	1600	10	<1
rural6.14	Sarapuí	3	nascente		NI	NI	1900	<1	<1
rural7.14	Sarapuí		chuveiro		NI	NI	>5700	<1	<1
rural8.14	Sarapuí	4	poço		NI	NI	>5700	120	<1
rural9.14	Sarapuí		chuveiro		NI	NI	2500	100	100
rural10.14	Sarapuí	5	nascente		35,0	7,0	1900	200	<1
rural11.14	Sarapuí		chuveiro	35,0	7,0	430	200	<1	
rural12.14	Sarapuí	6	poço	ago/14	20,0	7,0	610	200	200
rural13.14	Sarapuí		chuveiro		23,0	7,0	>5700	<1	<1
rural14.14	Sarapuí		torneira		18,0	7,0	130	<1	<1
rural15.14	Sarapuí	7	poço		35,0	7,0	97	<1	<1
rural16.14	Sarapuí		torneira		17,0	7,0	3700	50	<1
rural17.14	Sarapuí	chuveiro	29,0		7,0	160	<1	<1	
rural18.14	Sarapuí	8	torneira		19,0	7,0	160	2	<1
rural19.14	Sarapuí		chuveiro		27,0	7,0	270	<1	<1
rural20.14	Sarapuí	9	torneira		17,0	7,0	260	<1	<1
rural21.14	Sarapuí		chuveiro		26,0	7,0	450	<1	<1

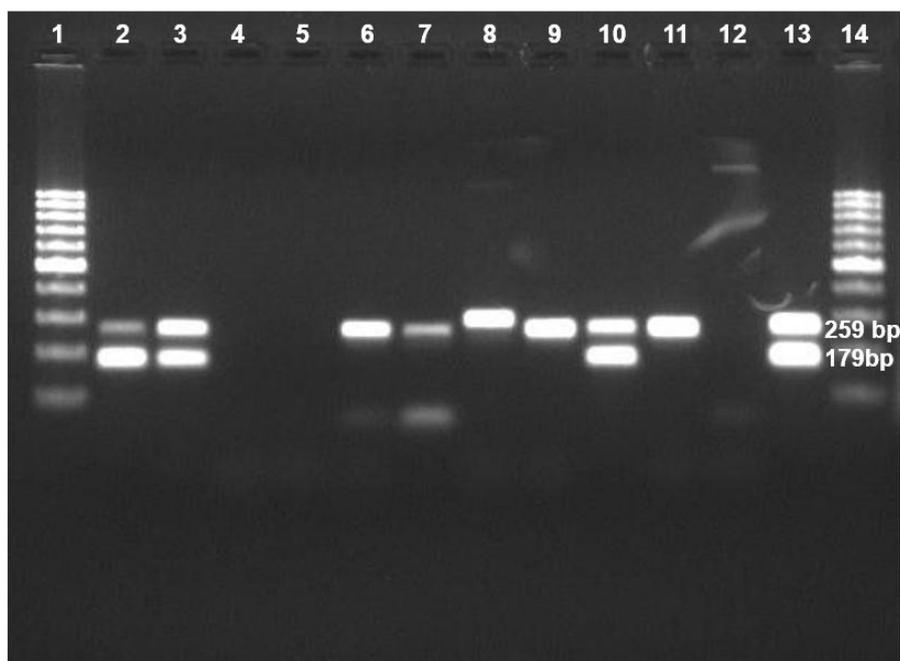
Legenda: °C: graus Celsius; CBH: contagem de bactérias heterotróficas; UFC: unidade formadora de colônia; *E.coli*: *Escherichia coli*; >5700: unidade formadora de colônia incontável; <1: ausente; NI: não identificado.
PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011: valores máximos permitidos: Contagem de bactérias heterotróficas = 500 UFC; Coliformes totais = <1; *E. coli* = <1.

Gráfico 7 – Presença de bactérias acima do valor permitido na água destinada para consumo humano, área rural.



5.2 Resultados obtidos pela técnica de PCR

Pelo método de PCR detectaram-se amostras positivas para *Legionella* spp. (banda na altura de 259 bp) e *Legionella pneumophila* (banda na altura de 179 bp), tanto na área urbana, quanto na área rural, conforme representado na Fotografia 16.

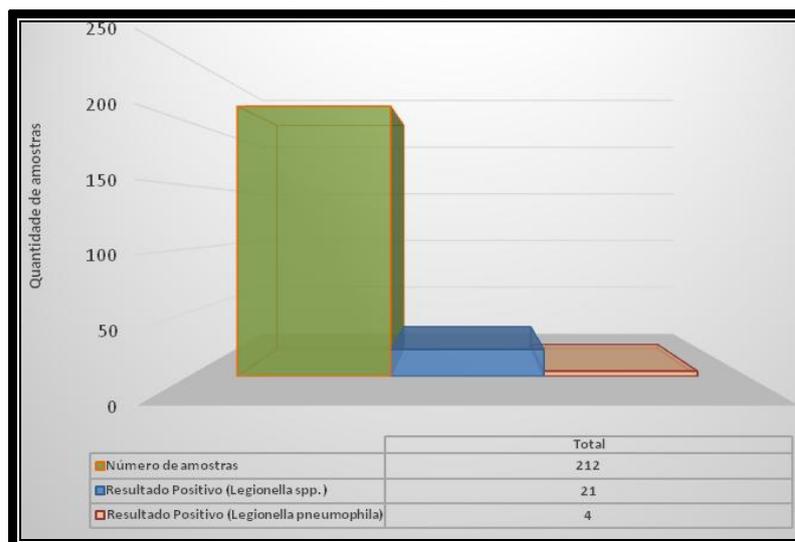
Fotografia 16: Resultado da PCR para *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* em amostras de água.

Legenda: canaletas 1 e 14 = peso molecular 100bp; canaletas 2, 3 e 10 = positivas para *L. pneumophila*; canaletas 6, 7, 8, 9 e 11 = positivas para *L. spp.*; canaletas 4 e 5 = amostras negativas canaleta 12 = controle negativo; canaleta 13 = controle positivo.

5.2.1 Área urbana

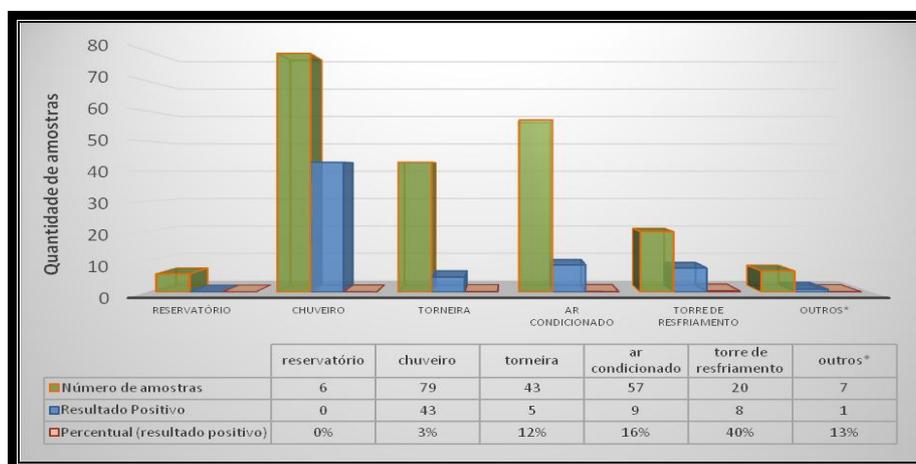
Na área urbana, detectou-se 12% (25/212) de amostras positivas para *Legionella* spp., sendo 2% (4/212) *Legionella pneumophila*. Os resultados estão representados no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Detecção de *Legionella* pelo método PCR, área urbana.



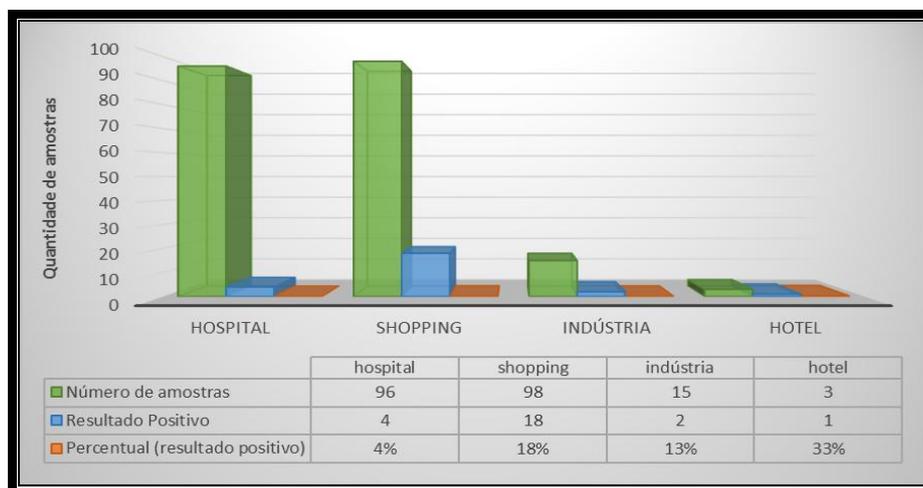
A distribuição e o percentual do número de amostras com resultado positivo para *Legionella*, segundo o ponto de coleta está representado no Gráfico 9.

Gráfico 9 – Distribuição do número de amostras com resultado para *Legionella*, pela técnica de PCR, segundo o ponto de coleta.



A distribuição e o percentual do número de amostras com resultado positivo para *Legionella*, segundo o local de coleta estão representados no Gráfico 10.

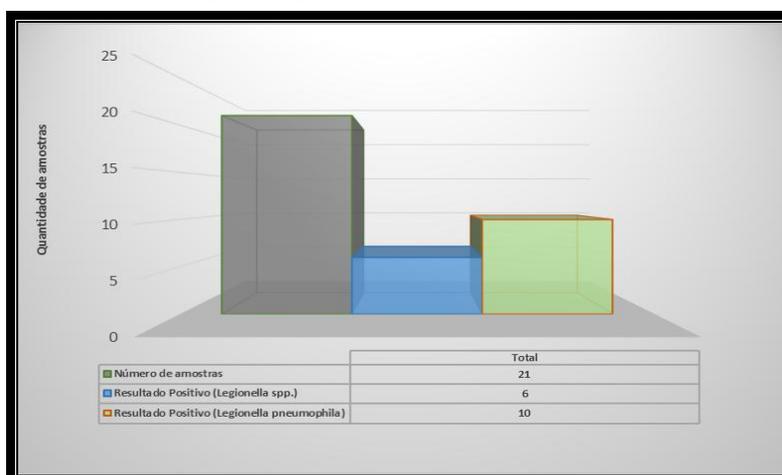
Gráfico 10 – Distribuição do número de amostras com resultado para *Legionella*, pela técnica de PCR, segundo o local de coleta.



5.2.2 Área rural

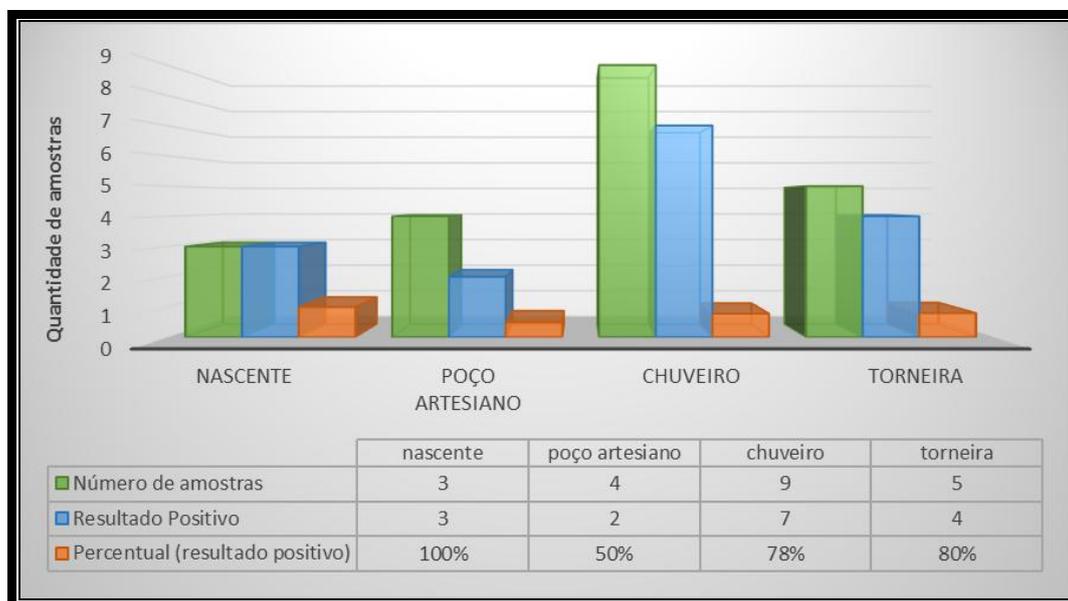
Na área rural, detectou-se 76% (16/21) de amostras positivas para *Legionella* spp., sendo 63% (10/21) *Legionella pneumophila*, conforme resultados representados nas fotografias 24 e 25 e representação no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Detecção de *Legionella* pelo método PCR, área rural



A distribuição e o percentual do número de amostras com resultado positivo para *Legionella* segundo o ponto de coleta estão representados no Gráfico 12.

Gráfico 12 – Distribuição do número de amostras com resultado para *Legionella*, segundo o ponto de coleta, área rural.



5.3 Comparação das técnicas de isolamento em cultura e PCR

Os resultados obtidos pela técnica de isolamento em cultura e PCR estão representados no Quadro 7.

Quadro 7 – Resultados obtidos pela técnica de isolamento em cultura e PCR em amostras de água, oriundas da área urbana (regiões da Grande São Paulo) e área rural (cidade de Sarapuí, interior do Estado).

Técnica	Área urbana	Área rural
Isolamento em cultura	34% (73/212)	38% (8/21)
PCR	12% (25/212) <i>Legionella</i> spp.	76% (16/21),
	2% (4/212) <i>Legionella pneumophila</i>	63% (10/21) <i>Legionella pneumophila</i>

5.3.1 Área urbana

Das vinte e uma amostras analisadas pela técnica de isolamento em cultura e PCR, 9,9% (21/212 = 9,9%) foram positivas pelas duas técnicas, conforme demonstrado na Tabela 2. Considerando os resultados positivos e negativos de ambos os métodos, quando comparados pelo índice *Kappa*, constatou-se baixo grau de concordância entre os métodos (0,31) conforme demonstrado no Quadro 8.

Tabela 2 – Concordância entre as técnicas de isolamento e PCR, área urbana.

Isolamento	PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	21 9,9%	52 24,5%	73 34,4%
Negativo	4 1,9%	135 63,7%	139 65,6%
Total	25 11,8%	187 88,2%	212 100%

Coeficiente Kappa = 0,310.

O grau de concordância do coeficiente *Kappa* é dividido em seis categorias por Landis e Koch, 1977, conforme demonstrado no Quadro 8.

Quadro 8 – Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice Kappa.

Valores índice Kappa	Grau de concordância
< 0	Pobre
0 – 0,2	Desprezível
0,2 – 0,4	Baixo
0,4 – 0,6	Moderado
0,6 – 0,8	Substancial
0,8 - 1	Quase perfeito

5.3.2 Área rural

Das vinte e uma amostras analisadas pela técnica de isolamento em cultura e PCR, 38,0% (8/21 = 38,0%) foram positivas pelas duas técnicas, conforme demonstrado na Tabela 3. Considerando os resultados positivos e negativos de ambos os métodos, quando comparados pelo índice *Kappa*,

constatou-se baixo grau de concordância entre os métodos (0,31) conforme demonstrado no Quadro 8.

Tabela 3 – Concordância entre as técnicas de isolamento e PCR, área rural.

Isolamento	PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	8 38,0%	0 0%	8 38,0%
Negativo	8 38,0%	5 23,8%	13 61,9%
Total	16 76,2%	5 23,8%	21 100%

Coeficiente Kappa = 0,31.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por este estudo revelaram a ocorrência da *Legionella*, tanto na área urbana 12% (25/212), como na área rural 76% (16/21) da região Grande de São Paulo e Interior do Estado. Sendo

Na área urbana, o gênero *Legionella* e a espécie *Legionella pneumophila* foram isolados a partir de uma ampla variedade de pontos de coleta de água, provenientes de hospitais (4), indústrias (2), hotéis (1) e shoppings (18). Esses resultados corroboram os resultados encontrados por Pellizari. (PELLIZARI, et al., 1995).

No Brasil, há poucos trabalhos na literatura, que evidenciam o isolamento de *Legionella*, de uma ampla variedade de pontos de coleta de água, provenientes de hospitais, indústrias, hotéis e shoppings. Contudo, há três trabalhos que foram concordantes com os dados deste estudo.

Os resultados encontrados por Pellizari e colaboradores, 1995 (São Paulo); Ferreira, 2004 (Rio de Janeiro), Etto e colaboradores, 2011 (São Paulo), os quais isolaram a *Legionella*, desses variados locais de coleta.

Além disso, vários autores têm descrito o isolamento de *Legionella* spp em chuveiros, torneiras, torres de resfriamento e ares condicionados (MANSILHA et al., 2007; ETTO; RAZZOLINI, 2011), o que está de acordo com os resultados do presente estudo, já que o maior número de amostras positivas foi de bandejas de ar condicionado (9), seguido das torres de resfriamento (8), torneiras (5), chuveiros (2) e fonte (chafariz) (1).

Relatos na literatura têm demonstrado que a colonização de sistemas de ar condicionado e torres de resfriamento, não só são excelentes meios de crescimento para a *Legionella* spp., mas também são meios eficazes de disseminação dessa bactéria. (TÜRETGEN; SUNGUR; COTUK, 2005; NGUYEN, et al., 2006). Os dados obtidos por este estudo reiteram a necessidade de produção de conhecimento com a finalidade de fundamentação científica para amparar as autoridades do Ministério da Saúde e Vigilância Sanitária, ANVISA, para que se possa atualizar e aprimorar as diretrizes de controle de qualidade do ar interior em ambientes climatizados de

uso coletivo, além de fiscalização para avaliar o desempenho das ações definidas de limpeza em sistemas de refrigeração.

Na área rural, o gênero *Legionella* e a espécie *Legionella pneumophila* foram isolados a partir de uma ampla variedade de pontos de coleta de água, provenientes de poços artesianos (2), chuveiros (7), torneiras (4) e nascentes (3), em contraste com os resultados anteriores descritos na literatura por PELLIZARI et al., 1995, em que *Legionella* spp. não foi detectada em reservatórios naturais de água doce (nascentes).

No Brasil, não há casos de isolamento de *Legionella*; ou casos de diagnósticos com pneumonia, cuja infecção pudesse ter sido ocasionada pela *L. pneumophila*, na área rural disponíveis na literatura. Os resultados obtidos por esse estudo evidenciam a ocorrência de *Legionella*, em ambientes naturais (nascentes e poços), locais possivelmente de alta concentração destas bactérias, ainda pouco conhecidas.

Diante destas circunstâncias, tais resultados sinalizam para a importância de melhor entendimento da *Legionella* em ambientes rurais, para que ações preventivas possam ser implementadas, para a redução dos riscos nas propriedades rurais.

Embora a *Legionella* possa sobreviver em uma grande variedade de habitat, essa bactéria pode ser muito difícil de isolar. Isolamento em cultura e enumeração de *Legionella*, a partir de fontes ambientais, envolvem vários passos, incluindo a concentração e ressuspensão das bactérias, pré-tratamentos seletivos e o uso de meios suplementados, tornando bastante crítico a escolha de um método de isolamento adequado para determinar se a *Legionella* está presente em uma amostra. Considerando essas dificuldades, foi que resolveu-se estudar e comparar os métodos disponíveis e, também participar de programa de ensaio de proficiência, a fim de comparar o desempenho de vários laboratórios semelhantes, sendo este um ótimo mecanismo de controle da qualidade dos resultados. Neste sentido há o Programa ELITE de proficiência do Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, Estados Unidos que coordena ensaios de proficiência para exames de *Legionella*. Esse programa foi criado como uma forma de testar técnicas de isolamento de *Legionella* utilizadas pelos laboratórios, por meio de amostras padronizadas. Os laboratórios que

identificam corretamente *Legionella* a partir das amostras testes recebem um certificado de proficiência e são listados entre os membros do Programa ELITE, disponível no endereço: <https://wwwn.cdc.gov/elite/Public/MemberList.aspx>. Atualmente, dois laboratórios no Brasil estão listados entre os membros do Programa ELITE, sendo o laboratório microbiológico de empresa Microambiental um deles (Anexo K).

Na última rodada de ensaios, que ocorreu durante o mês de junho de 2014, foi possível avaliar duas metodologias reconhecidas: a INTERNACIONAL STANDARD ISO 11731-2 (01/05/2004). Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*. Part 2: Direct Membrane filtration method for waters with low bacterial counts e a STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 22th edition, Washington. APHA AWWA, WEF, 2012 – (9260 Detection of pathogenic bacteria - J. *Legionella*). Os resultados obtidos demonstraram melhor desempenho no isolamento de *Legionella*, quando utilizado o método STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 22th edition, Washington. APHA AWWA, WEF, 2012 – (9260 Detection of pathogenic bacteria - J. *Legionella*). Bem como, os resultados do presente. O fator que pode ter influenciado negativamente nos resultados quando utilizado o método recomendado pela ISO 11731-2 - Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*, foi o tratamento ácido do volume total das amostras, com solução acid buffer (HCl/KCl), com o intuito de minimizar o desenvolvimento dos microrganismos competidores, ou seja, não-*Legionella*. Muito provavelmente, além dos competidores, a solução poderia estar impedindo o desenvolvimento do próprio microrganismo de interesse, no caso a *Legionella*. Diferentemente, o método STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 22th edition, Washington. APHA AWWA, WEF, 2012 – (9260 Detection of pathogenic bacteria - J. *Legionella*), que reserva uma fração da amostra sem tratamento ácido pode possibilitar um melhor desempenho no isolamento de *Legionella*. O fato de terem sido isoladas colônias de *Legionella* em amostras que não foram submetidas ao tratamento ácido, pode sugerir que o processo com tratamento ácido seja desnecessário, ou ainda, que seja um possível fator de estresse, resultando na perda da capacidade de crescimento da *Legionella*.

Na área urbana, pela técnica de isolamento em cultura, 34% (73/212) das amostras foram consideradas presuntivas para *Legionella*. No entanto, quando submetidas à técnica molecular, apenas 12% (25/212) confirmaram o resultado para *Legionella*, sendo 2% (4/212) *Legionella pneumophila*. Já na área rural, pela técnica de isolamento, 38% (8/21) das amostras foram consideradas presuntivas para *Legionella*, mas quando submetidas à técnica molecular, 76% (12/21) confirmaram o resultado para *Legionella*, sendo 48% (10/21) *Legionella pneumophila*. Com os resultados obtidos, a concordância entre os métodos pôde ser avaliada pelo índice *Kappa* (0,31), e evidenciou-se baixa concordância entre os métodos, tanto na área urbana, quanto na área rural.

Em virtude da água utilizada na área urbana ser uma água tratada, ou seja, possuir adição de cloro, cal ou soda, sulfato de alumínio, cloreto férrico e flúor, muito provavelmente, a técnica de PCR foi menos sensível, devido a presença de potenciais inibidores nas amostras analisadas. Esse resultado corrobora com o descrito por Mullis; Faloona (1987), a PCR é altamente sensível e específica, altamente confiável e reproduzível, mas possui algumas desvantagens que são alto custo e os fatores inibidores da amplificação do ácido nucléico. Diferentemente, da área rural, que utiliza água sem nenhum tipo de tratamento.

Outros métodos estatísticos deverão ser empregados para avaliação do grau de concordância entre as amostras, pelo mesmo método analítico.

O mais importante é que os resultados produzidos sejam precisos e exatos, pois resultados incorretos, ou inexatos, podem conduzir a interpretações equivocadas, que podem ter consequências sérias, como prejuízos financeiros, porque ações preventivas e corretivas devem ser tomadas.

Muito países possuem legislações para o controle dos riscos de *Legionella*, contudo destacamos o Reino Unido, reconhecido como modelo. O assunto é tratado por normas produzidas pelo Health and Safe Executive (HSE) entidade responsável pela saúde ambiental de organizações britânicas (UK) para controle de infecções nosocomiais via hídrica, o ACOP L8 que define alguns níveis de ações quando isolado *Legionella* em amostras de água, com diferentes concentrações conforme descritos no Anexo M.

Analisando os resultados positivos para *Legionella* obtidos no presente estudo, verificou-se concentrações sempre abaixo de 100 UFC/mL. Por se

tratar de uma bactéria fastidiosa, pode ser que a concentração da *Legionella* conforme definida pelo ACOP L8 não seja relevante para avaliação de riscos e níveis de ação. Ou seja, qualquer que seja a quantificação de *Legionella* spp deve-se recomendar ações preventivas. Tal observação corrobora com o descrito na literatura por Stout e Yu, 2003, que afirmam que a concentração de *Legionella* spp. não é relevante para a avaliação de risco de surtos, e sim a presença desse patógeno associado à extensão da área colonizada pela bactéria. (STOUT; YU, 2003).

No Brasil ainda não existe legislação específica para a água sobre o controle de *Legionella*. Considerando o presente estudo, verifica-se a necessidade da atenção de diversos profissionais, tanto da área legislativa, como da área da saúde, em elaborar procedimentos e leis que possam reger o controle e prevenção da *Legionella* no Brasil. Pois, apesar da impossibilidade de erradicar as múltiplas fontes de infecção, é possível reduzir o risco, desenhando adequadamente as canalizações, realizando limpeza e desinfecção periódicas das instalações, e manutenção de equipamentos produtores de aerossóis, procedendo com aplicação de biocidas apropriados, e controlando a temperatura da água.

Além disso, com esse estudo foi possível avaliar a qualidade da água utilizada pelos agricultores familiares para consumo humano, conforme definido na Portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

No presente estudo, foi possível identificar a má qualidade da água destinada para o consumo humano na área rural em 67% (14/21) das amostras analisadas, que apresentaram valores de contagem de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli*, acima do valor máximo permitido pela legislação, Portaria nº 2.914.

Moradores da zona rural ficam ainda mais vulneráveis ao contato com água contaminada devido à ausência de um sistema de tratamento público. (ASSUNÇÃO et al., 2009). Baseado nas poucas informações em nosso país sobre a qualidade da água de fontes privadas no meio rural, na inexistência de informações sobre a qualidade da água da região estudada, e nos resultados da pesquisa realizada, a implantação, em cada propriedade, de sistemas

simples de cloração, disponíveis no mercado, como clorador de pastilhas (Anexo L) pode reduzir o nível de contaminação das águas utilizadas para consumo humano e para os animais, podendo ser uma boa alternativa.

A qualidade da água, em particular os padrões microbiológicos, possui grande influência sobre a saúde. Se não for adequada, a água pode ocasionar surtos de doenças e causar sérias epidemias, pois quando microbiologicamente contaminada, a água pode transmitir grande variedade de doenças infecciosas. Entre os indicadores microbiológicos utilizados para avaliar a qualidade da água a ser consumida pela população estão os coliformes fecais, que têm tido grande atenção da saúde pública, por estarem associados a um elevado número de patologias isoladas em laboratórios de microbiologia clínica e virtualmente suspeitos da maioria das infecções intestinais humanas conhecidas. (ASSUNÇÃO et al., 2009). No presente trabalho, 58% (12/21) das amostras analisadas apresentaram presença de coliformes.

Além, dos coliformes, também são importantes as bactérias heterotróficas, presentes em todos os tipos de água, nos alimentos, no solo, na vegetação e no ar, e cuja enumeração pode fornecer uma indicação geral sobre a qualidade microbiológica da água tratada. Quando realizada regularmente a contagem de bactérias heterotróficas fora dos padrões permitidos, pode indicar problemas no armazenamento (recrescimento, formação de biofilme), na eficiência dos métodos de tratamento, na integridade e na limpeza do sistema de distribuição. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Para consumo humano, o Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº 2914 estabelece a obrigatoriedade de se manter um teor mínimo de 0,2 mg/L (miligramas por litro) e um teor máximo (recomendável) de 2,0 mg/L de cloro residual livre, sendo o máximo permitido 5,0 mg/L. Na contagem de bactérias heterotróficas, é recomendado que reservatórios e redes de distribuição, como torneiras por exemplo, não ultrapassem 500 UFC/mL, e que sejam constatados Coliformes Totais e *Escherichia coli*.

Para os animais, o artigo 16 da resolução CONAMA 357, de acordo com a classificação da água doce, classe 3, ou seja, água que pode ser destinada para dessedentação de animais. O padrão de qualidade para essa classe de água estabelece teores máximos para padrões microbiológicos, como

coliformes termotolerantes, que não deve exceder 1000 UFC/mL além de diversos padrões físico-químicos, uma vez que se sabe que a quantidade e a qualidade da água são elementos fundamentais para o processo de produção, seja qual for o sistema de criação, já que interfere diretamente na nutrição dos ruminantes pela sua composição, bem como pelo volume ingerido. (BIZINOTO, 2002). Ausência do controle da qualidade da água pode conduzir, fatalmente, a curto ou longo prazos, as infecções com consequências imprevisíveis para o desenvolvimento das criações. (SOUZA et al.,1983). Assim, torna-se essencial o controle da qualidade físico-química e microbiológica da água na saúde animal, bem como implantação na rotina veterinária, de culturas específicas para melhor entendimento do papel da *Legionella*, quando pneumonias são diagnosticadas em animais.

7 CONCLUSÃO

Considerando todos os resultados do presente estudo, entende-se que o tratamento da água e o seu controle, independente do patógeno, ou da área, urbana, ou rural, é de suma importância, tendo vista que se a água estiver fora dos padrões estabelecidos, pode resultar em um problema de saúde pública.

Quanto à *Legionella*, é importante que normas sejam criadas e estabelecidas quanto ao limiar de tolerância de contaminação, para que procedimentos de controle possam ser elaborados. Além disso, é preciso transformar as recomendações em lei, semelhante aos aspectos regulamentadores existentes em outros países, como o Reino Unido, com especial atenção às estruturas de risco, como shoppings, locais de via pública e hospitais. Esta é a única forma de se manter os sistemas de distribuição de água em boas condições, pesquisando frequentemente a presença de *Legionella*, com acompanhamento de laudos técnicos especializados.

Na área rural, medidas de controle da qualidade da água, principalmente para a água destinada ao consumo humano, devem ser implementadas. Sistemas simples de cloração, como clorador de pastilhas, provavelmente auxiliaria nesse controle. Há necessidade de novas pesquisas, tendo em vista que o número analisado de amostras foi bastante baixo.

Quanto à amostragem, na área rural há necessidades de novas pesquisas, tendo em vista que o número analisado de amostras foi bastante baixo.

No isolamento em cultura, recomenda-se a utilização a utilização Standard Methods, já que dados deste estudo reforçam melhor desempenho que aplicado essa metodologia.

Em virtude dos resultados obtidos pelo método da PCR, há necessidade de novas pesquisas, para saber como proceder com a análise de biologia molecular, e investigar os inibidores presentes na água.

REFERÊNCIAS

ABU, K.Y.; GAO, L. Y.; STONE, B. J.; VENKATARAMAN, C.; HARB, O. S. **Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis.** *Applied Environment Microbiology*, n. 64, p. 3127–3133, 1998.

ABU, K.Y.; GAO, L. Y.; HARB, O. S.; STONE, B. J. **Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant.** *Molecular Microbiology*, n. 24, p. 629–642, 1997.

ACOP L8. APPROVED CODE OF PRACTICE. The control of *Legionella* bacteria in water systems, 4. ed., 2013. Disponível em: <<http://legionellacontrol.com/downloads/ACOP-L8-4th-Edition-Compliments-Legionella-Control-International.pdf>>. Acesso em : 20 dez. 2013.

AKBAS, E.; YU, V. L. **Legionnaires' disease and pneumonia.** *Postgraduate Medicine*, vol. 109, n. 5, p.135-147, 2001.

AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. **Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais.** *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 4, p. 510-514, 2003.

AMSDEN, G.W. **Treatment of Legionnaires' disease.** *Drugs*, vol.5, n. 5, p. 605-614, 2005.

ASSUNÇÃO, A.W. DE ALMEIDA; DO AMARAL, L.A.; SATAKE, F.M.; LOPES, L.G. **Práticas rurais como risco à qualidade de água em propriedades situadas na bacia hidrográfica do córrego rico, Jaboticabal/SP.** In: Amazônia Ciências e Cultura, 2009, Manaus, AM. Anais... 61ª Reunião Anual da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência), 2009. Disponível em < <http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/5884.htm>>. Acesso em: 07 set. 2014.

BARBAREE, J. M. **Selecting a subtyping technique for use in investigations of legionellosis epidemics.** In J.M. Barbaree, R.F. Breiman & A.P. Dufour, eds. **Legionella: Current Status and Emerging Perspectives.** American Society for Microbiology, Washington D.C., p.169, 1993.

BARTRAM, J.; CHARTIER, Y.; LEE, J.V.; POND, K.; SURMAN-LEE, S. **Legionella and the prevention of legionellosis.** Geneva, World Health Organization, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2014.

BENSON, R.F. & FIELDS, B.S. **Classification of the genus Legionella.** Seminars in Respiratory Infections, vol.13, n.90, 1998.

BIZINOTO, A. L. **Instalações e equipamentos para bovinos de corte.** In: Simpósio Goiano Sobre Manejo e Nutrição de Bovinos, Goiânia. Anais.... CBNA, 2002. Disponível em: <<http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/viewFile/460/352>>. Acesso em 06 set. 2014.

BLASQUEZ G.R.M.; ESPINOSA, P.F.J.; ALEMANY, F.L. et al. **Antimicrobial chemotherapy for Legionella: levofloxacin versus macrolides.** Clinical Infectious Diseases, vol. 40, n. 6, p. 800-806, 2005.

BLATT, S. P.; DOLAN, M. J.; HENDRIX, C. W.; MELCHER, G.P. **Legionnaires' disease in human immunodeficiency virus-infected patients: eight cases and review.** *Clinical Infectious Diseases*, v.18, p. 227–232, 1994.

BREIMAN, R.F. **State of the art lecture. Modes of transmission in epidemic and nonepidemic Legionella infection: directions for further study.** In J. M. Barbaree, R. F. Breiman, and A.P. Dufour, eds. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 30, 1993.

BRENNER, D.J., FEELEY, J.C.; WEAVER, R.E. **Family VII. Legionellaceae.** In N.R. Krieg & J.G. Holt, eds. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, vol.1, p. 279, 1984.

BSI Document. **Determination of Legionellae in water and related materials. Method for their detection and enumeration.** Draft Document 89/53406, 1989.

BYRNE, B.; SWANSON, M.S. **Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions.** *Infect Immun.*, vol. 66, n.7; p. 3029-3034, 1998

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.** *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 38, p. 743-751, 2007.

CIEVS Rio. **Coordenação de Informação Estratégica em Vigilância e Saúde.** Disponível em: <<http://cievsrio.wordpress.com/2012/06/>>. Acesso em: 04 set. 2014.

DA FONSECA, F.H. B.P. **A *Legionella* e seus riscos.** Disponível em: <http://www.setri.com.br/artigos/07_legionella_seus_%20riscos.pdf>. Acesso em: 04 set. 2014.

DA SILVA CUNHA, C.I.G. **Estudo da expressão gênica da *Legionella pneumophila* estirpe paris após co-cultura em *Acanthamoeba castellanii*.** 2013. 87 f. Tese (Mestrado). Departamentos de Microbiologia-Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, 2013.

DENNIS, P. J. L. **Isolation of legionellae from environmental specimens.** In Harrison T.G. and Taylor A.C. (eds.). *A Laboratory Manual for Legionella*, John Wiley & Sons Limited, Chichester, 1998.

DONDERO, T.J. JR.; RENDTORFF, R.; MALISSON, G.; WEEKS, R.; LEVY, J.; WONG, E.; SCHAFFNER, W. **An outbreak of Legionnaire's disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower.** *The New England Journal of Medicine*, vol. 302, n. 7, p. 65-370, 1980.

DSMZ. **Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.** Disponível em: <<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>>. Acesso em: 03 julh. 2014.

ECDC, **Center for Disease Prevention and Control.** Disponível em: <<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Pages/Index.aspx>>. Acesso em 04 set. 2014.

EDELSTEIN, P.H.; EDELSTEIN, M.A.C. **Comparison of three buffers used in the formation of buffered charcoal yeast extract medium.** *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 31, p. 3329-3330, 1993.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Legionella: Criteria Document**. Office of Water, Washington, D.C.1985. Disponível em:<file:///C:/Users/mari/Desktop/LEGIONELLA%202014/2009_02_03_criteria_humanhealth_microbial_legionellaha.%20EPA%202001.pdf>. Acesso em: 04 set. 2014.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Legionella: Drinking Water Health Advisory**. Office of Water, Washington, D.C., 2001. Disponível em:<file:///C:/Users/mari/Desktop/LEGIONELLA%202014/2009_02_03_criteria_humanhealth_microbial_legionellaha.%20EPA%202001.pdf>. Acesso em: 04 set.2014.

EWGLI. **The European Working Group for Legionella Infections**. Disponível em: <<http://www.ewgli.org>>. Acesso em: 04 set. 2014.

FABBI, M; PASTORIS, M.C.; SCANZIANI, E; MAGNINO, S.; DI MATTEO, L. **Epidemiological and environmental investigations of Legionella pneumophila infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf**. J. Clin. Microbiol., v. 36, n. 7, p. 1942-1947, 1998.

FERREIRA, A. P.; DA CUNHA, C.de L.N. RECIIS. **Revista Eletrônica de Comunicação Informação e Inovação em Saúde**, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p.208-214, 2007.

FERREIRA, W. F.; SOUSA, J. C. **Microbiologia**. Lidel, Lisboa, 2000.

FIELDS, B. S.; BENSON, R. F.; BESSER, R. E. **Legionella and Legionnaires'disease: 25 years of investigation**. Clinical Microbiology Reviews, vol. 15, n. 3, p. 506-526, 2002.

FIELDS, B.S. *Legionella* in the environment. In HOFFMANN, P.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M.; editors. (ed), ***Legionella pneumophila: pathogenesis and immunity***. Springer, New York, p. 85–91, 2008.

FRASER, D.W.; TSAI, T.F.; ORENSTEIN, W.; PARKIN, W.E.; BEECHAM, H.J.; SHARRAR, R.G.; HARRIS, H.; MALLISON, G.F.; MARTIN, S.M.; McDADE, J.E.; SHEPARD, C.C.; BRACHMAN, P.S. & THE FIELD INVESTIGATION TEAM. **Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia**. The New England Journal of Medicine, p. 297-1189, 1977.

GOLDMAN, L.; BENNET, J.C. **Cecil: tratado de medicina interna**. Guanabara Koogan, ed. 21, 2668 p., 2001.

GUILHERME, E.F.M.; SILVA, J.A.M.; OTTO, S.S. ***Pseudomonas aeruginosa* como indicador de contaminação hídrica**. Higiene Alimentar, v. 14, n. 76, p. 43- 46, 2000.

HASSENZAHN, D.M., et al. ***Legionella* Risk Management Review**, 2002. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf. Acesso em: 12 junh. 2014.

HILBI, H.; JARRAUD, S.; HARTLAND, E.; BUCHRIESER, C. **Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control**. Mol Microbiol., vol. 76, n.1; p. 1-11, 2010.

ETTO, H.Y; RAZZOLINI, M.T.P. **Detecção de bactérias do gênero *Legionella* em amostras de água de sistemas de ar condicionado**. Epidemiologia Serviço Saúde, Brasília, v. 20, n. 4, p. 557-564, 2011.

HSE, **Health and Safety Executive**. Disponível em: <<http://www.hse.gov.uk/index.htm>>. Acesso em: 04set. 2014.

KOZIOL-MONTEWKA, M.; MAGRYS, A.; STOJEK, N.; PALUSINSKA-SZYSZ, M.; DANIELAK, M.; WÓJTOWICZ, M.; et al. **Monitoring *Legionella* species in hospital water systems. Link with disease and evaluation of different detection methods.** Annals of Agricultural and Environmental Medicine, vol. 15, p. 143-147, 2008.

LAPORTA; M.Z., FOGO,M; FUZARI, D. **Manual para elaboração de trabalhos acadêmicos.** 4. ed. rev. e aum. Santo André, 2013 122p.

LA SCOLA, B.; BIRTLES, R.J.; GREUB, G.; HARRISON, T.J.; RATCLIFF, R.M.; RAOULT, D. ***Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amebol pathogen.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 54, p.699-703, 2004.

LECLERC, H. et al. **Advances in the bacteriology of the Coliform Group: Their suitability as markers of microbial water safety.** Annual Review Microbiology, Palo Alto, CA, v. 55, p. 201-234, 2001.

LEE, J.V.; JOSEPH, C., ON BEHALF OF THE PHLS ATYPICAL PNEUMONIA WORKING GROUP. **Guidelines for investigating single cases of legionnaires' disease.** Communicable Disease and Public Health, vol. 5, n. 2, p. 157-162, 2002.

LEITE, M.O.; ANDRADE, N.J.; SOUZA, M.R.; FONSECA, L.M.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; PENNA, C.F.A.M. **Controle de qualidade da água em indústrias de alimentos.** Leite & Derivados, v. 69, p. 38-45, 2003.

LEMONS, J.; VAZ, A.; MELO, E.; MARQUES, A.; ALBUQUERQUE, A.; BARROS, I.; SEQUEIRA, M.; SARAIVA, J.P. **Doença dos Legionários: Revisão temática e casuística hospitalar.** Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna, vol. 17, n. 4, p.228-234, 2010.

LEVIN, A.S.; CAIAFFA FILHO, H.H.; SINTO, S.I.; SABBAGA, E.; BARONE, A.A.; MENDES, C.M. **An outbreak of nosocomial Legionnaires' disease in a renal transplant unit in Sao Paulo, Brazil.** Legionellosis Study Team. J. Hosp. Infect., v.18, n. 3, p. 243-248, 1991.

MANSILHA, C.R.; COELHO, C.A.; REINAS, M.A.; HEITOR, A.M. **Prevalência da *Legionella pneumophila* em águas de diferentes proveniências das regiões norte e centro de Portugal no período de 2000 a 2006.** Vigilância Sanitária, vol. 25, ed. 2, 2007.

MARRIE, T.J.; PEELING, R.W.; FINE, M.J.; SINGER, D.E.; COLEY, C.M.; KAPOOR, W.N. **Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course.** The American Journal of Medicine, vol.101, p. 508-515, 1996.

MASTRO, T.D.; FIELDS, B.S.; BREIMAN, R.F.; CAMPBELL, J.; PLIKAYTIS, B.D.; SPIKA, J.S. **Nosocomial Legionnaire's disease and use of medication nebulizers.** The Journal Infectious Diseases, n. 163, p. 667-671, 1991.

McDADE, J.E.; SHEPARD, C.C.; FRASER, D.W.; TSAI, T.R.; REDUS, M.A.; DOWDLE, W.R. & THE LABORATORY INVESTIGATION TEAM. **Legionnaires' disease: isolation of the bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease.** The New England Journal of Medicine, p. 297-1197, 1977.

McDADE, J.E.; SHEPARD, C.C. **Virulent to avirulent conversion of Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) its effect on isolation techniques.** The Journal Infectious Diseases, v. 139, n.6, p. 707-711, 1979.

MIGUEL, A.L.C.S.F. **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL.** 2007. 93 f. Tese (Mestrado em Engenharia Biológica). IST - Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2007.

MOCEPE. MÓDULO DE PRINCÍPIOS DE EPIDEMIOLOGIA PARA CONTROLE DE ENFERMIDADES. **Módulo 5: Investigação epidemiológica de campo: aplicação ao estudo de surtos.** Organização Pan-Americana da Saúde/OMS, Ministério da Saúde, p. 58-68, 2010.

MOLINER, C., FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. **Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution.** FEMS Microbiology, n. 34, p. 281–294, 2010.

MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. **Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase – catalyzed chain reaction.** Methods in Enzymology, v. 155, p. 335-350, 1987.

NGUYEN, T.M.N.; ILEF, D.; JURRAUD, S.; ROUIL, L.; CAMPESE, C.; CHE, D.; HAEGHEBAERT, S.; GANIAYRE, F.; MARCEL, F.; ETIENE, J.; DESENCLOS, J.C. **A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers-how far can contaminated aerosols spread?** Journal of Infect. Disease, vol. 193, n. 1, p. 102-111, 2006.

NEWTON, H.J., ANG, D.K., VAN DRIEL, I.R., HARTLAND, E.L. **Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*.** Journal of Clinical Microbiology, n. 23, p. 274–298, 2010.

OSHA, **European Agency for Safety and Health at Work.** Disponível em: <https://osha.europa.eu/pt/oshnetwork/focal-points/united-kingdom/index_html>. Acesso em: 04 set. 2014.

PARK, M.Y.; KO, K.S.; LEE, H.K.; PARK, M.; KOOK, Y-H. **Legionella busanensis sp. nov. isolated from cooling tower water in Korea.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, p. 53-77, 2003.

PELCZAR, Michel et al. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações.** Makron Books, São Paulo, vol. 2, ed. 2, p.193–204, 1996.

PELLIZARI, V.H; MARTINS, M.T. **Occurrence of *Legionella* sp in water samples from a man made systems of São Paulo – Brazil.** Brazilian Journal Microbiology, vol. 26, p. 186-191, 1995.

PIAO, Z.; SZE, C.C.; BARYSHEVA, O.; LIDA, K.; YOSHIDA, S. **Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*.** Applied Environment Microbiology, n. 72, p. 1613-1622, 2006.

PINHEIRO, C. A. P. **Perfil Epidemiológico de Pacientes Internados com Pneumonia em um Hospital Público de São Luís - Maranhão.** 2010. 60f. Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Saúde da Família do Instituto Superior de Educação Continuada/Faculdade de Tecnologia da Amazônia, para obtenção do título de Especialização em Saúde da Família.

PORTARIA n° 3.523/98, Ministério da Saúde, de 28 de agosto de 1998.

PORTARIA n° 2.914/11, Ministério da Saúde, de 12 de dezembro de 2011.

RATHORE, M.H. *Legionella* infection. **Emedicine**, 2007.

RESOLUÇÃO n° 9, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, de 16 de janeiro de 2003.

RESOLUÇÃO n° 357, Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA, de 17 de março de 2005.

RIBEIRO, L.; BENEDETTI, E. **A importância da qualidade da água na nutrição de ruminantes**, 2012. Disponível em: < <http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/viewFile/460/352>>. Acesso em setembro 2014.

RICE, E.W.; BAIRD, R.B.; EATON, A.D.; CLESCERI, L.S. Detection of pathogenic bacteria – *Legionella*. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington. APHA AWWA, WEF, ed. 22, p. 28-31, 2012.

RIFFARD, S., F.; LOPRESTI, F.; VANDENESCH, F.; FOREY, M.; REYROLLE & ETIENNE, J. Comparative analysis of infrequent- restriction site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 36, p.161, 1998.

ROCHA, R. T. **Pneumonia adquirida na comunidade: aspectos epidemiológicos, clínicos e radiológicos das pneumonias “atípicas” e “não atípicas”**. 1998. 84 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

ROWBOTHAM, T.J. Pontiac fever explained? **Lancet**, vol. II, n. 69, 1980.
SAKAMOTO, R.; OHNO, A.; NAKAHARA, T.; SATOMURA, K.; IWANAGA, S.; KOUYAMA, Y.; KURA, F.; KATO, N.; MATSUBAYASHI, K.; OKUMIYA, K.; YAMAGUCHI, K. *Legionella pneumophila* in Rainwater on Roads. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n.8, 2009. Disponível em: < http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/8/09-0317_article>. Acesso em agost. 2014.

SEIMI, Serviço de Vacina Acreditado pela Sociedade Brasileira de Imunizações Disponível em:< <http://seimi.com.br/pneumonia/>>. Acesso em set. 2014

SCHULZ , D.; CECONI, T.M.; SCHULZ, A.; BATISTA, C.R.V.; PARUCKER, L. M. B. B. Legionnaire's disease: a review. **RBAC**, vol. 37, n. 4, p. 251-255, 2005.

SCHULZ, D.; CECONI, T.M.; SCHULZ, A.; BATISTA, C.R.V.; PARUCKER, L.M. B. B. SHIKLOMANOV, I. A. Comprehensive assessment of the freshwater resources to the world. **In: Assessment water resources and water availability in the world. WMO/SEI**, p. 85, 1997.

SHIKLOMANOV, I. A. Comprehensive assessment of the Freshwater resources to the world. **In: Assessment water resources and water availability in the world. WMO/SEI**, p.85,1997.

SOINI, H.; MUSSER, J.M. Molecular diagnosis of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2944-2947, 1994.

SOUZA, L.C, IARIA, S.T.; PAIM , G.V.; LOPES, C.A.M. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. **Revista de Saúde Pública**, vol. 17, p. 112-122, 1983.

STOUT, J.E., YU, V.L. **Legionellosis**. N. Eng. J. Med. v. 337, p.682-687, 1997.

STOUT, J.E., YU, V.L. **Hospital-acquired Legionnaires' disease: new developments**. Curr. Opin. Infect. Dis. v. 16, n. 4, p.337-341, 2003.

STOUT, J.E. et al. Role of Environmental Surveillance in Determining the Risk of Hospital-Acquired Legionellosis:A National Surveillance Study With Clinical Correlations. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n.7, p.818-824, 2007.

STUKEL, T.A.; GREENBERG, E.R.; DAIN, B.J.; REED, F.C.; JACOBS, N.J. A longitudinal study of rainfall and Coliform contamination in small community drinking water supplies. **Environmental Science & Technology**, v. 24, p. 571-575, 1990.

TRONEL, H.; HARTEMANN, P. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 48, p. 653-656, 2009.

TÜRETGEN, I.; SUNGUR, E.I.; COTUK, A. Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems. *Environmental Monit. Asses.*, v. 100, p.53-58, 2005.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for Drinking Water Quality, Addendum: Microbiological agents**. In drinking water, Geneva, Second Edition, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob1.pdf>. Acesso em junho 2014.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for Drinking Water Quality. Nottingham**, Chapter 7. Draft. 2003. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/3rd/en/>. Acesso em junho 2014.

WHO, World Health Organization. **Legionella and the prevention of legionellosis**, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf>. Acesso em junho 2014.

ANEXO A

Solução Tampão Ácido (HCl/KCl)

Para o preparo da **Solução Tampão Ácido** (HCl/KCl), foram preparadas duas soluções:

- uma solução de 0,2 mol/L de ácido clorídrico (HCl), definida como **Solução A**;
- uma solução de 0,2 mol/L de cloreto de potássio (KCl), definida como **Solução B**.

Solução A: 0,2 mol/L de KCl

- Foi suspenso 14,9 g de KCl em 1 litro de água reagente.
- Foi esterilizado por autoclavagem a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 ± 1 min.

Solução B: 0,2 mol/L de HCl

- Foi suspenso 17,4 ml de HCl concentrado ($\rho = 1,18$, ensaio mínima 35,4%) em 1 litro de água reagente.

→ Para o preparo da **Solução Tampão Ácido** – 1000 mL

Foram misturadas 18 partes da **solução A** com 01 parte da **solução B**.

ANEXO B

Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar (Agar tamponado extrato de levedura carvão com cisteína)

Atualmente, o meio de cultura Ágar tamponado extrato de levedura carvão com cisteína (BCYE) é considerado o meio de escolha ao quais vários antimicrobianos têm sido adicionados para torná-lo seletivo. (DENNIS, 1988). O extrato de levedura presente no Ágar para *Legionella* fornece fontes de nitrogênio, carbono e vitaminas. O carvão ativado decompõe o peróxido de hidrogênio, um produto metabólico tóxico para a *Legionella* spp. Pode também recolher dióxido de carbono, modificando a tensão superficial. O ACES tampão é adicionado para manter o pH adequado para o crescimento ótimo da bactéria. O α -glutarato estimula o crescimento do organismo e o Ágar é o agente de solidificação. O meio deve ser suplementado com L-cisteína, um aminoácido essencial, e pirofosfato férrico, um suplemento de ferro. Ambos os suplementos são incorporados para satisfazer as necessidades nutricionais específicas da *Legionella* spp.

Para o preparo do meio de cultura BCYE, foram suspendido 18,5g de *Legionella* Ágar Base em 500 mL de água reagente, homogeneizada e aquecida até uma leve ebulição, para dissolução total do meio. O pH foi ajustado em 6,8-6,9 com neutralizador alcalino KOH 1N e, então, autoclavado a 121°C por 15 minutos. O preparo foi realizado conforme instruções do fabricante (Acumedia).

Legionella Agar (For the isolation of *Legionella* spp.) – Composição em 1 L de meio

Yeast Extract	11,5g/L
Charcoal, Activa	1,5g/L
ACES Buffer	6,0g/L
Alpha-Ketoglutarate.....	1,0g/L
Agar	17,0g/L

Após autoclavagem assepticamente, foram adicionados, assepticamente, 10 mL de uma solução de L-cisteína (4%) e 10 mL de uma

solução de pirofosfato férrico (2,5%) ao meio de cultura. Em seguida, foram distribuídos ± 20 mL do meio de cultura BCYE em placas de petri de 90mm x 15mm. As placas foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de 04 semanas (28 dias).

ANEXO C

***Legionella* Suplemento Seletivo (GVPC)**

O meio de cultura GVPC Suplemento Seletivo é baseado na formulação descrita por Dennis et al., 1984. Essa formulação seletiva tem sido relatada como o método *in vitro* mais eficiente para o isolamento de *L. pneumophila* quando usado junto com os pré-tratamentos ácido ou térmico. A cicloheximida é incluída por ter maior atividade sobre os bolores do que a anisomicina, quase exclusivamente ativa contra leveduras. Os bolores ocorrem mais frequentemente do que as leveduras nas águas ambientais analisadas para *Legionella*. Os antimicrobianos Glicina, Vancomicina, e Polimixina inibem a maioria das bactérias Gram Positivas e Gram Negativas. Cicloheximida suprime o crescimento de fungos. (BSI, 1989).

Para o preparo do meio de cultura GVPC foram suspensos 18,5g *Legionella* Ágar Base em 500 mL de água reagente, homogeneizada e aquecida até uma leve ebulição, para dissolução total do meio. O pH foi ajustado em 6,8-6,9 com neutralizador alcalino KOH 1N e, então, autoclavado a 121°C por 15 minutos. O preparo foi realizado conforme instruções do fabricante (Acumedia).

Legionella Ágar Base (For the isolation of *Legionella* spp.) – Composição em 1 L de meio

Yeast Extract	11,5g/L
Charcoal, Activa	1,5g/L
ACES Buffer	6,0g/L
Alpha-Ketoglutarate.....	1,0g/L
Agar	17,0g/L

Suplemento seletivo - For the isolation of *Legionella* spp. Fórmula

Glicina (sem amônia).....	1,5g
Vancomicina HCl.....	0,5mg
Sulfato de Polimixina B	39600UI
Cicloheximida (substituindo a anisomicina)	40,0mg

Após autoclavagem, foram adicionados assepticamente 10 mL de uma solução de L-cisteína (4%), 10 mL de uma solução de pirofosfato férrico (2,5%) e 01 frasco de suplemento seletivo ao meio de cultura. Em seguida, foram distribuídos \pm 20 mL do meio de cultura GVPC em placas de petri de 90mm x 15mm. As placas foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de 04 semanas (28 dias).

ANEXO D

L-cisteína (4%) e Pirofosfato férrico (2,5%)

O preparo da L-cisteína (4%) e do Pirofosfato férrico (2,5%) foi realizado da seguinte maneira:

L-cisteína (4%)

- Foram suspendidos 0,4g de L-cisteína em 10mL de água reagente.
- A solução passou por filtração, através de uma membrana filtrante de éster e nitrato de celulose, com 0,2 μ m de porosidade, para descontaminação da solução.

Pirofosfato Férrico (2,5%)

- Foram suspendidos 0,25 g de pirofosfato férrico em 10mL de água reagente.
- A solução passou por filtração, através de uma membrana filtrante de éster e nitrato de celulose, com 0,2 μ m de porosidade, para descontaminação da solução.

ANEXO E

Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar - Cys (Agar tamponado extrato de levedura carvão sem cisteína)

Para o preparo do meio de cultura BCYE-Cys foi suspenso 18,5g *Legionella* Ágar Base em 500 mL de água reagente, homogeneizada e aquecida até uma leve ebulição, para dissolução total do meio. O pH foi ajustado em 6,8-6,9 com neutralizador alcalino KOH 1N, e então autoclavado a 121°C por 15 minutos. O preparo foi realizado conforme instruções do fabricante (Acumedia).

Legionella Agar (For the isolation of *Legionella* spp.) – Composição para 1 L de meio

Yeast Extract	11,5g/L
Charcoal, Activa	1,5g/L
ACES Buffer	6,0g/L
Alpha-Ketoglutarate.....	1,0g/L
Agar	17,0g/L

Após autoclavagem, foram adicionados, assepticamente, 10 mL de uma solução de pirofosfato férrico (2,5%), ao meio de cultura. E em seguida, foram distribuídos \pm 20 mL do meio de cultura BCYE-Cys em placas de petri de 90mm x 15mm. As placas foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados a $5 \pm 3^\circ\text{C}$, por um período máximo de 04 semanas (28 dias).

ANEXO F
PCA - Plate Count Agar
(Ágar para contagem em placas)

O hidrolisado enzimático de caseína presente no Ágar para contagem em placas fornece aminoácidos e outras substâncias de complexos nitrogenados. O extrato de levedura fornece vitaminas do complexo B. O Plate Count Agar é comercialmente disponível na forma desidratada.

Para o preparo do meio foram suspenso 23,50g em 1000 mL de água reagente, seguido de aquecimento em micro-ondas até a completa dissolução do meio desidratado. Os volumes foram distribuídos em frascos de vidros com boca larga (tipo shott) à prova de vazamento, autoclavável e submetidos ao processo de esterilização em autoclave à 121°C por 15 minutos.

Para utilização do meio de cultura na técnica de inoculação em profundidade, o meio de cultura deve permanecer fundido. Para isso, é mantido em repouso em banho-maria a temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

ANEXO G

Agar m-Endo

O meio de cultura Agar M-Endo é usado para a enumeração de coliformes em água, pelo método de membrana filtrante. O hidrolisado enzimático de caseína, a triptose, a digestão péptica de tecido animal e o extrato de levedura fornecem para os coliformes os nutrientes essenciais, especialmente os nitrogenados. A lactose é o carboidrato fermentável. O sulfito de sódio, o desoxicolato de sódio e a fucsina básica inibem o crescimento de organismos Gram-positivos. Os fosfatos tamponam o meio. Os coliformes fermentam a lactose, e o acetaldeído resultante reage com o sulfito de sódio e com a fucsina básica, formando colônias vermelhas ou de coloração similar a do meio. As bactérias não-fermentadoras de lactose formam colônias incolores. Presuntivos para coliformes produzem colônias verdes-douradas com brilho metálico em 24 horas de incubação a 35°C. O meio de cultura normalmente é comercialmente disponíveis na forma desidratada.

Para o preparo do meio foi suspenso 25,50g em 500 mL de água reagente; adicionou-se 10 mL de álcool absoluto. A ressuspensão foi aquecida em micro-ondas até a completa dissolução do meio desidratado, e em seguida distribuído 10 mL do meio em placas de petri 60 mm x 15 mm. As placas foram armazenadas em refrigerador (2°C a 8°C) até a sua utilização.

ANEXO H

Caldo lauril triptose

Os coliformes são considerados membros da família *Enterobacteriaceae*, que crescem na presença de sais biliares e produzem ácido e gás, derivados da lactose, dentro de 48 horas a 37°C (1). Estas bactérias também podem ser definidas como membros de *Enterobacteriaceae* capazes de crescer a 37°C e por normalmente possuírem a β -galactosidase. O caldo lauril sulfato é usado para a detecção de coliformes em água, laticínios e outros alimentos, como recomendado pela APHA. A triptose fornece as substâncias essenciais para o crescimento, como o nitrogênio e compostos carbônicos, sulfato e elementos-traço. O fosfato de potássio favorece o tamponamento do meio, enquanto o cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. O lauril sulfato sódio inibe outros organismos que não sejam coliformes.

Para o preparo do meio foi suspenso 21,36g em 600 mL de água reagente; adicionou-se 0,006 g de púrpura de bromocresol. A ressuspensão foi aquecida em micro-ondas até a completa dissolução do meio desidratado. Os volumes foram distribuídos em tubos de ensaio com rosca, contendo um tubo de Durham invertido e submetidos ao processo de esterilização em autoclave à 121°C por 15 minutos. Os tubos foram armazenados em refrigerador (2°C a 8°C) até a sua utilização.

ANEXO I

Caldo lactosado verde brilhante e bile 2%

O caldo bile verde brilhante 2% é um dos meios mais utilizados para a detecção de bactérias coliformes na água, esgotos, alimentos leite e derivados. A digestão péptica de tecido animal serve como fonte essencial de nutrientes. A lactose é o carboidrato fermentável. A fermentação da lactose produz ácido que muda a cor do corante verde brilhante para amarelo. O gás produzido durante a fermentação fica retido nos tubos invertidos de Durham. A produção de gás confirma a presença de coliformes. A produção de gás no Caldo EC a 45°C é usado como um confirmatório da presença de coliformes fecais. Os gram-positivos formadores de esporos podem produzir gás se a inibição da bile ou do verde brilhante for enfraquecida pela reação com os alimentos. A bile bovina inibe bactérias gram-positivas enquanto as bactérias gram-negativas são inibidas pelo verde brilhante. Durante a avaliação das amostras de água, o crescimento presuntivo dos tubos positivos que apresentam gás no Caldo Lauril Tryptose é inoculado no caldo bile verde brilhante 2%. A formação de gás entre 48 ± 2 horas confirma o teste presuntivo.

Para o preparo do meio foi suspenso 16,0g em 400 mL de água reagente. A ressuspensão foi aquecida em micro-ondas até a completa dissolução do meio desidratado. Os volumes foram distribuídos em tubos de ensaio com rosca, contendo um tubo de Durham invertido e submetidos ao processo de esterilização em autoclave à 121°C por 15 minutos. Os tubos foram armazenados em refrigerador (2°C a 8°C) até a sua utilização.

ANEXO J

CALDO EC MEDIUM COM MUG

Caldo MUG EC é usado para detecção de *Escherichia coli* em água e amostras de alimentos por método fluorogênico. *Escherichia coli* é membro do grupo de bactérias denominadas coliformes fecais. É membro da flora fecal de animais de sangue quente. A *E. coli* é considerada um indicador específico de contaminação fecal e da possível presença de patógenos entéricos. O MUG permite a rápida detecção de *E. coli* quando o meio é exposto a luz UV para observar a fluorescência. O MUG também detecta linhagens anaerogênicas que podem não ser detectadas pelos métodos convencionais. O MUG é hidrolisado pela enzima β -glucuronidase produzida pela *E. coli* formando um produto final fluorescente 4-metil-umbeliferona. A caseína enzimática hidrolisada fornece os nutrientes essenciais. A lactose é o carboidrato fermentável. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. O meio tem um forte sistema de tamponamento para controle do pH na presença da ação fermentativa. Os sais biliares inibem bactérias gram-positivas, especialmente espécies de *Bacillus* e estreptococos fecais. Geralmente a atividade de β -glucuronidase acontece dentro de 4 horas, mas algumas linhagens com atividade fraca de β -glucuronidase requerem incubação overnight. A fermentação da lactose pelos fermentadores leva à acidificação do meio resultando na queda do pH. Se um grande número de *Proteus vulgaris* estiver presente, é possível que iniba a produção de gás por *E. coli*, contudo, a fluorescência permite a detecção de *E. coli* em culturas puras ou mistas dentro de 4 a 24 horas.

Para o preparo do meio foi suspenso 14,8g em 1000 mL de água reagente. A ressuspensão foi aquecida em micro-ondas até a completa dissolução do meio desidratado. Os volumes foram distribuídos em tubos de ensaio com rosca, contendo um tubo de Durham invertido e submetidos ao processo de esterilização em autoclave à 121°C por 15 minutos. Os tubos foram armazenados em refrigerador (2°C a 8°C) até a sua utilização.

ANEXO K

Center for Disease Prevention and Control, CDC
Certificado de Proficiência do Programa Elite para *Legionella*

CERTIFICATE OF PROFICIENCY**ELITE Program****MICROAMBIENTAL LAB. COM. E SERV. EM ÁGUA LTDA.**

99, SANTO ANTÔNIO, RUA JOSÉ FERRARI
SÃO CAETANO DO SUL, SÃO PAULO 09530-110

Brazil

Member Since: 4/11/2014

Expiration Date: 6/23/2015

**Issued by:**

Environmental *Legionella* Isolation Techniques Evaluation
Respiratory Diseases Branch
National Center for Immunization and Respiratory Diseases
Coordinating Center for Infectious Diseases
Centers for Disease Control and Prevention (CDC)



ANEXO L

Sistema simples de cloração

Sistema simples de cloração, como clorador de pastilhas (Figura 9), disponível no comércio, para redução do nível de contaminação das águas utilizadas para consumo humano. O Ministério da Saúde, por meio da Portaria 2914 estabelece a obrigatoriedade de se manter um teor mínimo de 0,2 mg/L (miligramas por litro) e um teor máximo (recomendável) de 2,0 mg/L de cloro residual livre, sendo o máximo permitido 5,0 mg/L.

Fotografia 23 – Clorador de pastilhas



Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2014.

ANEXO M

Níveis de ações quando isolado *Legionella* em amostras de água, conforme o ACOP L8.

Quadro 8 – Níveis de ações quando isolado *Legionella* em amostras de água, conforme o ACOP L8.

<i>Legionella</i> (UFC/L)	Ações recomendadas
> 100 UFC/L e 1000	<p>- Se a minoria das amostras são positivas, a análise deve ser refeita. Se os resultados semelhantes são encontrados novamente, uma revisão das medidas de controle e de avaliação de riscos deve ser realizada para identificar quaisquer ações corretivas necessárias ou,</p> <p>- Se a maioria das amostras são positivas, o sistema pode estar colonizado, embora a um nível baixo. Uma revisão imediata das medidas de controle e de avaliação de riscos deve ser realizada para identificar qualquer outra ação corretiva necessária. A desinfecção do sistema deve ser considerada.</p>
> 1000 UFC/L	<p>O sistema deve ser refeito e uma revisão imediata das medidas de controle e de avaliação de riscos realizada para identificar quaisquer ações corretivas, incluindo a possibilidade de desinfecção do sistema.</p> <p>Reanálise deverá ter lugar poucos dias depois de desinfecção e com intervalos de frequência depois, até atingir um nível satisfatório de controle.</p>

APÊNDICE A

Microrganismo utilizado como controle de qualidade

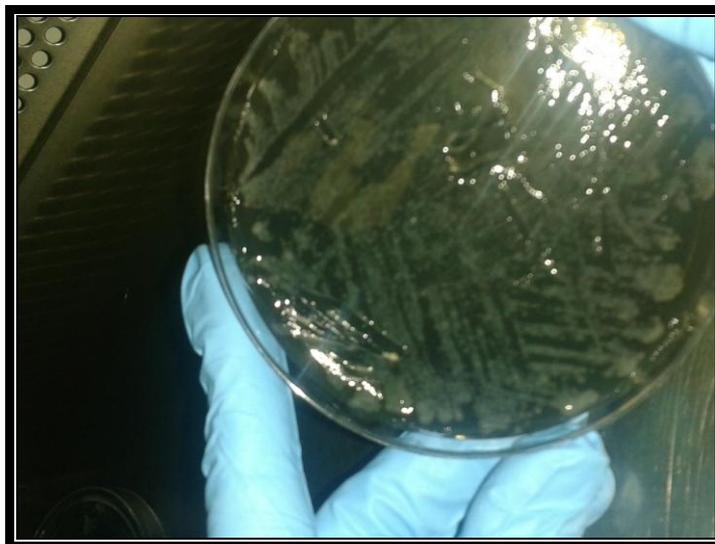
O microrganismo *Legionella pneumophila* ATCC®33152 foi utilizado nos meios de cultura BCYE, BCYE-CYS e GVPC, conforme indicado no Quadro 6.

Quadro 6 - Microrganismo utilizado como controle de qualidade.

Microrganismo	Meios de cultura	Resultado	Controle
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC®33152	BCYE	Crescimento	+
	BCYE-CYS	Ausência de crescimento	-
	GVPC	Crescimento	+

Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2014.

Fotografia 22 – Colônia de *Legionella pneumophila* ATCC®33152, no meio BCYE.



Fonte: Microambiental Serv. Com. Lab. Ltda, 2014.

APÊNDICE B

Tabela 4 - Identificação e dados das amostras de água, área urbana

Nº	Registro amostra	Município	Local coleta	Ponto coleta	Mês coleta
1	micro791314	São Paulo	hospital	chuveiro	jun/14
2	micro791414	São Paulo	hospital	chuveiro	
3	micro853614	São Paulo	hospital	chuveiro	
4	micro730814	São José Rio Pardo	indústria	chuveiro	
5	micro731014	São José Rio Pardo	indústria	torre de resfriamento	
6	micro858714	São José Rio Pardo	indústria	chuveiro	
7	micro859014	Araçatuba	indústria	torre de resfriamento	
8	micro784314	São Paulo	shopping	chuveiro	
9	micro784714	São Paulo	shopping	ar condicionado	
10	micro785214	São Paulo	shopping	ar condicionado	
11	micro785414	São Paulo	shopping	ar condicionado	
12	micro801414	São Paulo	shopping	ar condicionado	
13	micro801714	São Paulo	shopping	reservatório	
14	micro801914	São Paulo	shopping	ar condicionado	
15	micro770314	São Paulo	hotel	fonte	
16	micro871714	São Paulo	hospital	torneira	
17	micro871814	São Paulo	hospital	torneira	jul/14
18	micro907914	São Paulo	hospital	chuveiro	
19	micro908014	São Paulo	hospital	chuveiro	
20	micro908114	São Paulo	hospital	chuveiro	
21	micro899214	São Paulo	hospital	torneira	
22	micro899314	São Paulo	hospital	chuveiro	
23	micro899414	São Paulo	hospital	chuveiro	
24	micro899514	São Paulo	hospital	chuveiro	
25	micro884414	São Paulo	hospital	torneira	
26	micro884514	São Paulo	hospital	torneira	
27	micro884614	São Paulo	hospital	torneira	
28	micro884714	São Paulo	hospital	torneira	
29	micro884814	São Paulo	hospital	banheira	
30	micro977414	São Paulo	hospital	chuveiro	
31	micro977514	São Paulo	hospital	chuveiro	
32	micro977614	São Paulo	hospital	chuveiro	
33	micro977714	São Paulo	hospital	chuveiro	
34	micro978514	São Paulo	hospital	chuveiro	
35	micro984914	São Paulo	hospital	chuveiro	
36	micro985014	São Paulo	hospital	torneira	
37	micro995914	São Paulo	hospital	chuveiro	
38	micro996014	São Paulo	hospital	chuveiro	
39	micro1003614	São Paulo	hospital	chuveiro	

40	micro981914	São José Rio Pardo	indústria	chuveiro	
41	micro944414	São Paulo	shopping	torneira	
42	micro944514	São Paulo	shopping	torneira	
43	micro944614	São Paulo	shopping	torneira	
44	micro944714	São Paulo	shopping	torneira	
45	micro944814	São Paulo	shopping	ar condicionado	
46	micro944914	São Paulo	shopping	ar condicionado	
47	micro945014	São Paulo	shopping	ar condicionado	
48	micro945114	São Paulo	shopping	ar condicionado	
49	micro945214	São Paulo	shopping	ar condicionado	
50	micro945314	São Paulo	shopping	ar condicionado	
51	micro945414	São Paulo	shopping	ar condicionado	
52	micro945514	São Paulo	shopping	ar condicionado	
53	micro945614	São Paulo	shopping	ar condicionado	
54	micro945714	São Paulo	shopping	ar condicionado	
55	micro945814	São Paulo	shopping	torneira	
56	micro985614	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	
57	micro985714	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	
58	micro985914	São Paulo	shopping	reservatório (água reuso)	
59	micro986014	São Paulo	shopping	ar condicionado	
60	micro986114	São Paulo	shopping	ar condicionado	
61	micro986314	São Paulo	shopping	ar condicionado	
62	micro986414	São Paulo	shopping	ar condicionado	
63	micro986614	São Paulo	shopping	ar condicionado	
64	micro986714	São Paulo	shopping	chuveiro	
65	micro942514	São Paulo	hotel	fonte chafariz	
66	micro1034014	São Paulo	hospital	torneira	ago/14
67	micro1034114	São Paulo	hospital	chuveiro	
68	micro1034214	São Paulo	hospital	torneira	
69	micro1047914	São Paulo	hospital	chuveiro	
70	micro1048014	São Paulo	hospital	chuveiro	
71	micro1048114	São Paulo	hospital	chuveiro	
72	micro1048214	São Paulo	hospital	chuveiro	
73	micro1065014	São Paulo	hospital	chuveiro	
74	micro1057314	São Paulo	hospital	chuveiro	
75	micro1057414	São Paulo	hospital	chuveiro	
76	micro1057514	São Paulo	hospital	chuveiro	
77	micro1057614	São Paulo	hospital	chuveiro	
78	micro1090414	São Paulo	hospital	torneira	
79	micro1090514	São Paulo	hospital	torneira	
80	micro1091014	São Paulo	hospital	torneira	
81	micro1091114	São Paulo	hospital	torneira	
82	micro1071614	São Paulo	hospital	chuveiro	
83	micro1122314	São Paulo	hospital	chuveiro	

84	micro1122414	São Paulo	hospital	torneira
85	micro1122514	São Paulo	hospital	torneira
86	micro1122614	São Paulo	hospital	torneira
87	micro1122714	São Paulo	hospital	aquecedor
88	micro11123914	São Paulo	hospital	chuveiro
89	micro11124014	São Paulo	hospital	chuveiro
90	micro11124114	São Paulo	hospital	torneira
91	micro11124214	São Paulo	hospital	torneira
92	micro1132414	São Paulo	hospital	chuveiro
93	micro1132514	São Paulo	hospital	chuveiro
94	micro1139214	São Paulo	hospital	chuveiro
95	micro1053014	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
96	micro1053114	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
97	micro1053214	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
98	micro1053314	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
99	micro1053414	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
100	micro1053514	São Paulo	shopping	torneira
101	micro1053614	São Paulo	shopping	torneira
102	micro1053714	São Paulo	shopping	ar condicionado
103	micro1139114	São Paulo	hospital	torneira
104	micro1078214	São Paulo	indústria	chuveiro
105	micro1078314	São Paulo	indústria	chuveiro
106	micro1078414	São Paulo	indústria	chuveiro
107	micro1078514	São Paulo	indústria	chuveiro
108	micro1078614	São Paulo	indústria	chuveiro
109	micro1115614	São Paulo	indústria	chuveiro
110	micro1115814	São Paulo	indústria	chuveiro
111	micro1066614	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
112	micro1066714	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
113	micro1066814	São Paulo	shopping	torre de resfriamento
114	micro1066914	São Paulo	shopping	reservatório (água reuso)
115	micro1067014	São Paulo	shopping	ar condicionado
116	micro1067114	São Paulo	shopping	ar condicionado
117	micro1067214	São Paulo	shopping	ar condicionado
118	micro1067314	São Paulo	shopping	ar condicionado
119	micro1067414	São Paulo	shopping	ar condicionado
120	micro1067514	São Paulo	shopping	torneira
121	micro1067614	São Paulo	shopping	ar condicionado
122	micro1067714	São Paulo	shopping	chuveiro
123	micro1088214	São Paulo	shopping	ar condicionado
124	micro1088314	São Paulo	shopping	ar condicionado
125	micro1088414	São Paulo	shopping	torneira
126	micro1088514	São Paulo	shopping	lavatório
127	micro1088614	São Paulo	shopping	ar condicionado
128	micro1088714	São Paulo	shopping	torneira

129	micro1088914	São Paulo	shopping	ar condicionado	
130	micro1089014	São Paulo	shopping	ar condicionado	
131	micro1089114	São Paulo	shopping	ar condicionado	
132	micro1089214	São Paulo	shopping	lavatório	
133	micro1089314	São Paulo	shopping	ar condicionado	
134	micro1089414	São Paulo	shopping	ar condicionado	
135	micro1089614	São Paulo	shopping	ar condicionado	
136	micro11392.14	Araçatuba	indústria	chuveiro	
137	micro1174814	São Paulo	hospital	chuveiro	set/14
138	micro1174914	São Paulo	hospital	chuveiro	
139	micro1175014	São Paulo	hospital	chuveiro	
140	micro1175114	São Paulo	hospital	chuveiro	
141	micro1181214	São Paulo	hospital	chuveiro	
142	micro1181314	São Paulo	hospital	chuveiro	
143	micro1251014	São Paulo	hospital	chuveiro	
144	micro1251114	São Paulo	hospital	chuveiro	
145	micro1251214	São Paulo	hospital	chuveiro	
146	micro1250714	São Paulo	hospital	chuveiro	
147	micro1250814	São Paulo	hospital	chuveiro	
148	micro1250914	São Paulo	hospital	chuveiro	
149	micro1273314	São Paulo	hospital	torre de resfriamento	
150	micro1273414	São Paulo	hospital	torre de resfriamento	
151	micro1283114	São Paulo	hospital	torneira	
152	micro1283214	São Paulo	hospital	torneira	
153	micro1283314	São Paulo	hospital	torneira	
154	micro1283414	São Paulo	hospital	chuveiro	
155	micro1284314	São Paulo	hospital	torneira	
156	micro1284714	São Paulo	hospital	torneira	
157	micro1279814	São José Rio Pardo	indústria	chuveiro	
158	micro1273814	São Paulo	shopping	ar condicionado	
159	micro1273914	São Paulo	shopping	ar condicionado	
160	micro1274014	São Paulo	shopping	ar condicionado	
161	micro1274114	São Paulo	shopping	ar condicionado	
162	micro1274314	São Paulo	shopping	ar condicionado	
163	micro1274414	São Paulo	shopping	torneira	
164	micro1274514	São Paulo	shopping	torneira	
165	micro1274914	São Paulo	shopping	ar condicionado	
166	micro1275014	São Paulo	shopping	ar condicionado	
167	micro1275114	São Paulo	shopping	ar condicionado	
168	micro1275214	São Paulo	shopping	ar condicionado	
169	micro1278514	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	
170	micro1278614	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	
171	micro1278714	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	

172	micro1278814	São Paulo	shopping	reservatório (água reúso)	
173	micro1278914	São Paulo	shopping	ar condicionado	
174	micro1279014	São Paulo	shopping	ar condicionado	
175	micro1279114	São Paulo	shopping	ar condicionado	
176	micro1279214	São Paulo	shopping	ar condicionado	
177	micro1279314	São Paulo	shopping	ar condicionado	
178	micro1279414	São Paulo	shopping	torneira	
179	micro1279514	São Paulo	shopping	ar condicionado	
180	micro1266214	São Paulo	hotel	fonte chafariz	
181	micro1362614	São Paulo	hospital	chuveiro	
182	micro1362714	São Paulo	hospital	chuveiro	
183	micro1362814	São Paulo	hospital	chuveiro	
184	micro1355214	São Paulo	hospital	torneira	
185	micro1355314	São Paulo	hospital	chuveiro	
186	micro1355414	São Paulo	hospital	chuveiro	
187	micro1355514	São Paulo	hospital	chuveiro	
188	micro1368514	São Paulo	hospital	chuveiro	
189	micro1444714	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	
190	micro1444814	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	
191	micro1444914	São Paulo	shopping	torre de resfriamento	
192	micro1445014	São Paulo	shopping	reservatório (água reúso)	
193	micro1445114	São Paulo	shopping	ar condicionado	
194	micro1445214	São Paulo	shopping	ar condicionado	
195	micro1445314	São Paulo	shopping	ar condicionado	
196	micro1445414	São Paulo	shopping	ar condicionado	
197	micro1445514	São Paulo	shopping	ar condicionado	
198	micro1445614	São Paulo	shopping	torneira	
199	micro1445714	São Paulo	shopping	ar condicionado	
200	micro1445814	São Paulo	shopping	chuveiro	
201	micro1445914	Araçatuba	indústria	chuveiro	
202	micro1540114	São Paulo	hospital	chuveiro	
203	micro1540214	São Paulo	hospital	chuveiro	
204	micro1540314	São Paulo	hospital	torneira	
205	micro1540414	São Paulo	hospital	chuveiro	
206	micro1544414	São Paulo	hospital	torneira	
207	micro1544514	São Paulo	hospital	chuveiro	
208	micro1544614	São Paulo	hospital	chuveiro	
209	micro1544714	São Paulo	hospital	chuveiro	
210	micro1502914	São Paulo	hospital	chuveiro	
211	micro1503014	São Paulo	hospital	torneira	
212	micro1503114	São Paulo	hospital	reservatório	

APÊNDICE C

Tabela 5 - Identificação e dados das amostras de água, área rural

N°	Registro amostra	Município	Local coleta	Ponto coleta	Mês coleta
1	rural1.14	Sarapuí	Propriedade 1	nascente	fev/14
2	rural2.14			chuveiro	
3	rural3.14			torneira	
4	rural4.14		Propriedade 2	chuveiro	
5	rural5.14			poço	
6	rura6.14		Propriedade 3	nascente	
7	rural7.14			chuveiro	
8	rural8.14		Propriedade 4	poço	
9	rural9.14			chuveiro	
10	rural10.14		Propriedade 5	nascente	ago/14
11	rura11.14			chuveiro	
12	rural12.14		Propriedade 6	poço	
13	rural13.14			chuveiro	
14	rural14.14			torneira	
15	rural15.14		Propriedade 7	poço	
16	rural16.14			torneira	
17	rural17.14			chuveiro	
18	rural18.14		Propriedade 8	torneira	
19	rural19.14			chuveiro	
20	rural20.14		Propriedade 9	torneira	
21	rural21.14			chuveiro	



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ