



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA- UniCEUB  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE- FACES  
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA- PIC/UniCEUB**

**ALINE ROCHA DE OLIVEIRA  
MARCELLA MOREIRA ALVES**

**Detecção de *Legionella pneumophila* em fontes de águas ornamentais no  
Distrito Federal**

**BRASÍLIA  
2023**



**ALINE ROCHA OLIVEIRA  
MARCELLA MOREIRA ALVES**

**Detecção de *Legionella spp.* em fontes de água da comunidade em Brasília,  
Distrito Federal**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.  
Orientação: Fernanda Nomiyama Figueiredo

**BRASÍLIA  
2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à nossa orientadora Fernanda Nomiya Figueiredo por ter aceitado nos conduzir nesse trabalho, à nossa professora Fabíola Fernandes dos Santos Castro por idealizar essa pesquisa e finalmente, às nossas famílias, por sempre nos apoiar nessa trajetória, sem eles nada disso seria possível.

Além disso, não poderíamos deixar de agradecer à equipe do LABOCIEN e da Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa por disponibilizar as ferramentas que permitiram aprimorar esse projeto.

**Detecção de *Legionella spp.* em fontes de água da comunidade em Brasília,  
Distrito Federal**

**Aline Rocha Oliveira – UniCEUB, PIC voluntário**

aline.rocha@sempreceub.com

**Marcella Moreira Alves – UniCEUB, PIC bolsista**

marcellamoreiraalves@sempreceub.com

**Fernanda Nomiya Figueiredo- UniCEUB, professor orientador**

fernanda.nomiya@ceub.edu.br

**Resumo**

*Legionella* é uma bactéria Gram-negativa, não fermentadora de carboidratos, aeróbicas, em formato de bacilo, responsável pela Doença dos Legionários, com quadro predominante de pneumonia, e uma forma respiratória não pneumônica, denominada Febre de Pontiac ou “Legionelose não pneumônica”. É um bacilo de fonte ambiental que possui a água como seu principal reservatório e sua transmissão ocorre por meio da inalação de aerossóis de fontes de água contaminada. Esse tema foi selecionado em razão da limitação de pesquisas ambientais preexistentes no Distrito Federal e na literatura acerca do assunto, além da relevância e gravidade das doenças respiratórias causadas por essa bactéria. O objetivo deste trabalho foi pesquisar e identificar possíveis fontes de *Legionella spp.* em fontes de água da comunidade em Brasília, DF. Foram selecionados pontos de coleta onde houvesse grande circulação de pessoas. Para a realização das atividades propostas, foram coletadas 11 amostras de 1 litro de água em recipiente de polipropileno estéril. Transferiu-se água de cada amostra para provetas de 100 mL para a medição precisa de 10 mL de água, que em seguida, foi colocada em dois béqueres de vidro, sendo em um deles, adicionada a solução acidificante contido no Kit Legionelabac (Probac). Essas amostras foram inoculadas nas 3 faces do laminocultivo presente no kit contendo ágar BCYE, seletivo para *Legionella*, e incubado a 37°C por 14 dias. Após a análise, foram realizados testes confirmatórios para verificar se as colônias que cresceram eram de fato o alvo da pesquisa,

utilizando-se coloração Gram e semeadura em ágar sangue. confirmou-se a presença da bactéria em três amostras (27,27%). A coloração de Gram revela bacilos Gram negativos finos e o resultado indicativo esperado é a ausência de crescimento em meio ágar sangue, pois essa bactéria não é capaz de se desenvolver em meios sem a suplementação adequada. Em conclusão, foi possível perceber que o tratamento da água nem sempre é totalmente eficiente, alertando a população sobre os possíveis riscos oferecidos e retratando a necessidade de um controle microbiológico da água mais eficaz para esse micro-organismo. Também identificamos a oportunidade para novas pesquisas a respeito do tipo de Legionella encontrada, o que não foi possível realizar devido à limitação dos testes utilizados, pouco disponíveis no Brasil.

**Palavras-Chave:** *Legionella spp.* Comunidade. Água. Legionelose.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
3. METODOLOGIA.....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
REFERÊNCIAS.....	19

## 1. INTRODUÇÃO

*Legionellaceae* é uma família de bactérias Gram-negativas, não fermentadora de carboidratos, aeróbicas, não formadora de esporos, com formato de bastonetes (bacilos). Atualmente, o gênero *Legionella* inclui mais de 60 espécies e aproximadamente 70 sorogrupos distintos, muitos dos quais considerados patogênicos. Destas espécies e sorogrupos a *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 é a responsável pela maior parte dos casos de infecções (cerca de 95%) detectados (DIEGUES; MARTINS, 2013). Esta é considerada a espécie de maior relevância, a qual passa por um ciclo de vida bifásico fenotipicamente distinto que alterna entre uma fase imóvel, replicativa e uma fase virulenta, flagelada e transmissível (MERCANTE; WINCHELL, 2015).

As bactérias do gênero *Legionella spp.* são consideradas bactérias ambientais, as quais estão em circulação e canalizações envelhecidas (PEARSON; YU, 2002). São capazes de sobreviver numa ampla gama de condições ambientais que incluem, por exemplo, variações de temperatura dos 5°C aos 63°C e de pH dos 5,5 encontradas na natureza, independentemente da estação do ano (DELGADO-VISCOGLIOSI et al., 2005). Colonizam ambientes aquáticos naturais nomeadamente rios, lagos, nascentes e solo úmido e ambientes artificiais, tais como, sistemas de distribuição de água potável, principalmente em edifícios com grande volume de água aos 8,9 (FIELDS, et al., 2002), multiplicando-se rapidamente entre 20°C e 45°C (HARRISON; TAYLOR, 1988).

A infecção por *Legionella spp.* pode originar duas entidades clínicas e epidemiologicamente distintas: a Doença dos Legionários, também denominada pneumonia dos Legionários ou “Legionelose pneumónica” (CID-10: A48.1), com quadro predominante de pneumonia, a qual frequentemente justifica internamento hospitalar; e uma forma respiratória não pneumónica, autolimitada e que se assemelha a uma síndrome gripal e que se denomina Febre de Pontiac ou “Legionelose não pneumónica” (CID-10: 48.2) (CORREIA et al., 2001; MARQUES et al., 2003).

A infecção transmite-se por inalação de aerossóis de água de gotículas de vapor de água contaminada por *Legionella spp.* (CUF, 2018), de dimensões tão pequenas (<5,0 µm) que veiculam a bactéria para os pulmões, possibilitando a sua deposição nos alvéolos pulmonares. As pessoas também podem contrair a doença

ao respirar gotículas pulverizadas por um sistema de água (como dispositivos de arrefecimento, tanques de água quente, sistemas de encanamento ou chafarizes), que não tenham sido limpos ou desinfetados adequadamente (MARQUES et al., 2003).

A doença dos legionários pode ter complicações pulmonares, principalmente em imunocomprometidos e levar à óbito, por isso deve ser diagnosticada rapidamente a fim de iniciar a terapia específica com antibióticos, tais como eritromicina, rifampicina associada com doxiciclina ou trimetoprim-sulfametoxazol (KONEMAN, 2014).

No Brasil e Distrito Federal, os estudos realizados sobre a existência da *Legionella spp.* em fontes de água ainda são escassos, não existindo informações relevantes sobre a epidemiologia da presença dessa bactéria e surtos ocorridos. Sendo, por vezes, uma doença autolimitada, a ocorrência de subnotificação de casos é possibilitada. Todavia, o Brasil já possui a norma ABNT NBR 16824, na qual há regularização do controle da *Legionella spp.* A norma incita a prevenção da legionelose a partir de orientações para o gerenciamento de riscos e boas práticas associadas a sistemas de distribuição de água em edificações industriais, comerciais, de serviços, públicas e residenciais. Ela ainda prescreve que a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para o controle de *Legionella spp.* deve ser realizada com periodicidade máxima de 2 anos. Para edificações com riscos identificados, recomenda-se que seja realizada pelo menos 1 vez ao ano (NSF, 2020).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### Histórico

A amostra inicial da *Legionella pneumophila* foi isolada por Joseph McDade em 1977, após um surto de pneumonia por um patógeno ainda desconhecido na Filadélfia, em 1976, no *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC), na qual resultou em 29 mortes e 182 casos de pneumonia (STOUT; YU, 1997, GOLDMAN; BENNETT, 2001). Tal amostra foi obtida a partir de necropsias de casos fatais, inoculando-se fragmentos de pulmões em cobaias e realizando-se esfregaços de baço, fígado e peritônio dos animais, após cerca de seis dias da inoculação, obtendo visualização microscópica de numerosos bacilos pequenos, fracamente



gram-negativos, apresentando flagelo polar. Apesar de ter sido isolada pela primeira vez em 1977, foi apenas em 1979 que esse patógeno foi denominado como *Legionella pneumophila* e essa doença nomeada de doença dos legionários, com manifestações sistêmicas e pneumonia dominante no quadro clínico. Atualmente, esse isolamento da espécie é feito em meio de cultura sólido, à base de BCYE (*Blood Charcoal Yeast Extract* – Ágar-carvão extrato de levedura), contendo extrato de levedura em meio tamponado, L-cisteína e ácido cetoglutárico, acrescido de antibióticos (cefalotina, colistina, cefomandole e cicloexamida), incubado em meio aeróbio e úmido, na presença de pequena concentração de CO<sub>2</sub> (2,5%), à 35°C. Após cerca de quatro dias, pequenas colônias mucóides são visualizadas e apresentam-se microscopicamente bacilos gram-negativos delgados e longos, às vezes com aspecto filamentoso (VERONESI, 2015).

### **Patogenia**

A *Legionella pneumophila* é uma bactéria aeróbia gram-negativa de multiplicação intracelular facultativa, em macrófagos humanos e em protozoários que atuam como reservatórios (PAIXÃO et al., 2019). Além disso, possuem motilidade positiva por um ou mais flagelos polares, oxidase negativas, urease positivas, reduzem nitrato, são auxotróficas, quimiorganotróficas e possuem crescimento lento, de três a sete dias, sendo possível a análise e identificação das colônias somente em meios específicos (OPLUSTIL et al. 2000).

No meio ambiente, a bactéria é parasita de protozoários e amebas, os quais contribuem para o aumento da resistência destas em condições adversas, como no sistema de águas aquecidas. As amebas podem ser deslocadas a longas distâncias, podendo ser inaladas e causar infecção nos seres humanos, resultando na grande liberação de bactérias após sua morte no trato respiratório (O,BRIEN; BHOPAL, 1993).

Sua capacidade inata de se replicar em diferentes protozoários, promoveu aptidão destas de se multiplicarem nestas células de defesa alveolares humanas. A bactéria multiplica-se no interior de macrófagos alveolares, podendo também possuir as células epiteliais alveolares, como sítio alternativo de multiplicação, contribuindo para a gravidade da pneumonia, além do envolvimento de fagócitos inflamatórios e células dendríticas do hospedeiro (NEWTON, et al., 2010).

Segundo os modelos que caracterizam relação entre *L. pneumophila* e tipos celulares, após a internalização pela célula hospedeira através da fagocitose, o vacúolo bacteriano LCV (*Legionella containing vacuole*) se associa transitoriamente com mitocôndrias e adquire características de retículo endoplasmático, secretando vesículas do tipo COP II. Nas horas seguintes o LCV mantém interação com essas vesículas e a bactéria se replica no interior de um vacúolo rodeado por membranas que se assemelham ao retículo endoplasmático rugoso (NEWTON, et al., 2010).

Além de possuir determinantes patogênicos tradicionais como lipopolissacarídeos, flagelos, sistema de secreção tipo II (T2SS), pili e outras proteínas de membrana, a *L. pneumophila* apresenta arsenal especial que processa a habilidade de manipular a célula hospedeira a partir de um vacúolo intracelular. Esse fator de virulência inclui o sistema de secreção tipo IV (T4SS) que transloca cerca de 200 proteínas efetoras as quais atuam em diversas vias da célula hospedeira (NEWTON, et al., 2010).

A doença dos legionários possui maior associação com ambientes aquáticos artificiais que contêm água a altas temperaturas (NEWTON, et al., 2010). Condições adequadas para o crescimento de legionelas incluem fontes de água à temperatura de 20 a 50 graus Celsius, pH entre 5 e 8 e zonas de estagnação de água, como tubulações prediais, reservatórios e tanques de arrefecimento. O crescimento de algas e protozoários, presença de matéria orgânica, sais de ferro e zinco, 1-cisteína, materiais porosos e derivados de silicone também compõem fatores de risco para desenvolvimento de *Legionella pneumophila* nos sistemas de distribuição de água (FERREIRA; CUNHA, 2007).

A bactéria necessita de um mecanismo de dispersão, como partículas aerossolizadas. Caso as gotículas contendo bactérias tenham cerca de 5  $\mu\text{m}$ , estas podem ser inaladas, estabelecendo um risco iminente de contrair a doença (GEA-IZQUIERDO, 2020). Até fevereiro de 2016, era estabelecido que a infecção por *Legionella pneumophila* era adquirida sobretudo por via inalatória e, eventualmente, por microaspiração de água contaminada. Entretanto, um caso reportado de Portugal em 2019, descreveu provável transmissão interpessoal (PAIXÃO et al., 2019).

## **Epidemiologia da doença**

A doença tem sido identificada nos vários continentes, podendo ocorrer sob a forma de casos esporádicos ou de surtos epidêmicos, sobretudo nos meses de Verão e Outono. A Doença dos Legionários é potencialmente epidêmica, com uma taxa de letalidade elevada (5 a 30% dos casos) e pode apresentar sintomas semelhantes a outras formas de pneumonia, sendo por isso de difícil diagnóstico (DIEGUES; MARTINS, 2013).

Entre 1999 e 2004 ocorreram quatro surtos relevantes da doença na Espanha, Países Baixos, Reino Unido e Austrália, com um total de 1.000 casos e 40 mortes. Por isso, em 1996 a Espanha fez um requerimento para reportar a existência da doença dos Legionários e iniciou um programa de prevenção de saúde específico, com controle de medidas a nível nacional para *Legionella pneumophila* (GEA-IZQUIERDO, 2020).

Foram registrados 65 casos de doença dos legionários associado a viagem, na Europa, em junho de 2017, com prévia estada em Dubai, incluindo casos no Reino Unido, Suécia, Alemanha, Países Baixos, Dinamarca, França, Áustria, Bélgica, República Tcheca, Hungria, Irlanda, Espanha e Suíça (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017).

Ainda na Europa, entre outubro e dezembro de 2014, ocorreu em Vila Franca de Xira, o surto de *Legionella pneumophila* de maiores dimensões em Portugal, com 375 casos notificados e 12 óbitos declarados (DOMINGUES, 2015), afetando sobretudo as freguesias de Vialonga, Póvoa de Santa Ira e Forte da Casa, sendo o terceiro surto com mais casos no mundo. A causa do surto foi associada a sistemas de “*wet cooling*” industriais e fenômenos meteorológicos também podem ter contribuído. Empresas como Adubos de Portugal (AP), General Eletric e outros sete arguidos foram acusados de crimes de infração de regras na construção, falta de fiscalização para monitorar as torres de refrigeração e crimes de ofensa à integridade física por negligência ( DIÁRIO DE NOTÍCIAS, 2022).

Na Europa, Austrália e nos Estados Unidos, são identificados cerca de 10 a 15 casos por milhão de habitantes por ano, entretanto, por ser uma doença muitas vezes de curso benigno e autolimitado, a verdadeira incidência da legionelose provavelmente é subnotificada (NEWSLAB, 2019).

Nos Estados Unidos, no início de 2019, houve um surto em Atlanta, no qual 12 pessoas foram laboratorialmente diagnosticadas com a doença dos legionários depois de terem se hospedado no Sheraton Atlanta Hotel, havendo 1 morte entre

estes e também 61 casos prováveis identificados (GEORGIA DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH, 2019). Ainda no mesmo ano, uma investigação na Carolina do Norte constatou que uma banheira de hidromassagem exibida em uma feira estadual pode ter sido responsável por um surto que contaminou mais de 100 pessoas, nas quais uma veio a óbito. Ademais, secretários de saúde do estado de Michigan abriram uma investigação em um hospital nos subúrbios de Detroit- *McLaren Macomb Hospital*- depois que sete pacientes terem sido diagnosticados e tratados para legionelose (NEWSLAB, 2019).

Já no Brasil, o primeiro caso de insuficiência respiratória aguda com isolamento de *Legionella pneumophila* confirmado sorologicamente, ocorreu em São Paulo em 1988, sendo o caso mais marcante e notificado no país o falecimento do Ministro Sérgio Motta, em 1998, que contraiu legionelose e veio a óbito por pneumonia. Apesar de ser uma doença de declaração obrigatória principalmente em países da União Europeia e nos Estados Unidos, no Brasil a legionelose ainda não é de notificação obrigatória, além de ser subnotificada sendo diagnosticada como pneumonia (DO NASCIMENTO, 2019).

No período de 2007 a 2008, foram realizados estudos no Brasil para avaliar a ocorrência da bactéria *Legionella pneumophila* em 69 amostras de água de residências, hospitais e edifícios públicos em São Paulo, sendo encontradas seis positivas, enquanto que na análise de sistemas torres de resfriamento, clínicas dentárias e reservatórios naturais, das 67 amostras, o gênero *Legionella* foi positivo em nove destas. No Rio de Janeiro, foi coletada a água de cinco hospitais, com resultado revelando presença de *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 em todas as amostras examinadas (ETTO; RAZZOLINI, 2011).

### **Legionelose**

A doença dos legionários ou Legionelose possui o período de incubação de dois a dez dias, manifestando de início apresentação clínica inespecífica com sintomas habitualmente relacionados a este quadro, como mal-estar, febre alta, cefaléia e anorexia. Os sintomas respiratórios incluem tosse, dispneia e dor torácica, surgindo por volta do segundo ao terceiro dia. A tosse é levemente produtiva, podendo haver hemoptise (sugestão de embolia pulmonar), apesar de raro. Sintomas gastrointestinais são frequentes, como náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Ainda pode haver alterações do estado mental, letargia e coma e podendo

ocorrer em 15 a 20% dos casos, choque com insuficiência renal e respiratória, choque séptico e óbito (PAIXÃO et al., 2019; VERONESI, 2015).

A característica principal é a pneumonia, mas o quadro é variado, compreendendo desde febre baixa e sintomas respiratórios discretos até quadros de alta gravidade, com infiltração pulmonar disseminada e comprometimento sistêmico. Formas clínicas extrapulmonares são mais frequentes em pacientes imunodeprimidos e com disseminação hematogênica e apresentam manifestações variadas, incluindo endocardite, pericardite, pancreatite, peritonite, pielonefrite, abscesso perirretal, sinovite, insuficiência renal aguda e colecistite (VERONESI, 2015).

Os fatores de risco abrangem sexo masculino, idade superior ou igual a 50 anos, hábitos tabágicos ou alcoólicos, imunossupressão e doenças crônicas e respiratórias como DPOC, diabetes *mellitus*, doença renal ou oncológica (PAIXÃO et al., 2019).

A taxa de mortalidade mundial é de 8-12%, sendo que 10% corresponde ao continente europeu. Essa taxa pode ser mais elevada para determinados grupos como idosos, fumantes e pacientes com infecção nosocomial ou com atraso no diagnóstico ou tratamento da patologia (PAIS, 2015).

O diagnóstico é feito a partir da detecção da bactéria pela cultura microbiológica e isolamento de *L. pneumophila*. Frequentemente, são utilizadas amostras do trato respiratório baixo, como expectoração, fluido pleural e aspirados. Apesar da expectoração ser a amostra ideal, diversos pacientes acometidos pela Doença dos Legionários não cursam com produção de secreção. As maiores taxas de sucesso no diagnóstico são obtidas quando utilizadas amostras broncoscópicas. A confirmação da infecção é usualmente feita pela pesquisa de antígenos urinários UAT (Teste do antígeno urinário), sendo o mais frequentemente utilizado (70 a 80% dos casos identificados), uma vez que o antígeno é produzido na fase aguda da doença. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método de escolha para os pacientes que produzem expectoração. A pesquisa de anticorpos no soro por imunofluorescência indireta é menos utilizada atualmente pela existência de técnicas mais rápidas. A avaliação clínica deve incluir hemograma, função hepática, função renal, dosagem de eletrólitos e radiografia de tórax para avaliação da gravidade e a extensão da doença (PAIS, 2015).

### **Pneumonia Adquirida na Comunidade e diagnósticos diferenciais**

A pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é uma infecção aguda do parênquima pulmonar que ocorre em pacientes fora do ambiente hospitalar, potencialmente grave, constituindo-se como principal causa de óbito entre as doenças infecciosas (CHAUVET et al, 2010).

A PAC pode ser causada por uma grande variedade de microorganismos, embora os agentes etiológicos mais comumente encontrados sejam o *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e um grupo de Gram-negativos, entre os quais encontra-se a *Legionella spp.* (MANDELL, 2015).

O diagnóstico consiste no início agudo de tosse e um ou mais das seguintes manifestações: expectoração, dispneia e dor torácica, achados focais no exame físico do tórax e sintomas sistêmicos (confusão mental, cefaleia, sudorese, calafrios, mialgias e temperatura superior a 37,8°C), além de opacidade pulmonar nova presente em radiografia do tórax (CHAUVET et al, 2010).

Apesar da taxa de mortalidade da PAC estar em queda (redução de cerca de 25,5% entre 1990 e 2015), a quantidade de internações e o alto custo do tratamento ainda são desafios para a saúde pública e para a sociedade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2018). No Brasil, a pneumonia encontra-se entre as primeiras causas de mortalidade relacionadas a doenças do trato respiratório e, tem a *L. pneumophila* como causa estimada de 6% desses casos (FERREIRA; CUNHA, 2007).

No Distrito Federal, em 2016, a pneumonia encontra-se em quarto lugar como causas específicas de mortalidade, atrás de doenças cerebrovasculares, em primeiro lugar, responsável por 1052 óbitos (8,7% de todas as mortes), seguida das doenças isquêmicas do coração (incluindo infarto agudo do miocárdio), com 912 óbitos (7,6%), e homicídios, com 755 (6,3%). Entre as doenças do aparelho respiratório, a pneumonia ainda é a principal causa de mortalidade, em quase todos os grupos etários, excluindo-se a faixa de 60 a 79 anos, onde asma, bronquite e enfisema superam discretamente os índices da pneumonia (GDF, 2016).

### **3. METODOLOGIA**

Trata-se de uma pesquisa do tipo estudo analítico experimental, de bancada na área de microbiologia, e com saída de campo para realizar a coleta das amostras utilizadas. Para alcançar os objetivos dessa pesquisa, o plano de trabalho foi dividido em sete etapas: estudo mais aprofundado sobre *Legionella spp.*, coleta de amostras, avaliação e preparo das mesmas, semeio em meios de cultura, visualização microscópica das colônias características, análise e interpretação dos resultados e divulgação do trabalho.

Para isso, um cronograma de atividades semanais diferentes entre as 2 pesquisadoras foi feito, tendo início com estudos sobre métodos de diagnóstico para *Legionella spp.* e estudo a respeito de microrganismos naturais de amostras de água, dando continuidade nas semanas seguintes com estudos sobre bactérias causadoras de pneumonia, bem como sua importância clínica e coleta de dados sobre antibióticos de uso na conduta médico-terapêutica. Em seguida, foi estudado a respeito do tratamento das amostras e realizou-se a coleta das mesmas nos locais selecionados, onde foram processadas e semeadas em meio de cultivo determinado ágar BCYE. Foi feita análise diária desses cultivos buscando características morfológicas e cromogênicas das colônias crescidas com a bactéria estudada em fontes de água. Com o auxílio da coloração de Gram e realização de repiques para o melhor isolamento das colônias, foi possível descartar ou confirmar os resultados. Por fim, nas últimas duas semanas foram confeccionadas planilhas com os resultados obtidos e elaborado o relatório final do trabalho.

Os locais foram definidos com base no alto fluxo de pessoas, sendo escolhidos assim, 15 regiões públicas: Memorial JK (parte externa - espelho d'água), Lago Parque da Cidade, torneira do banheiro feminino do Parque da Cidade, Praça dos Cristais (espelho d'água), Palácio do Buriti (parte externa - espelho d'água), Congresso Nacional (parte externa - espelho d'água), Palácio da Justiça (parte externa - espelho d'água), Itamaraty (parte externa - espelho d'água), Torre de TV (fonte), Museu da Biblioteca Nacional (parte externa - espelho d'água), Superquadra sul 308 (praça), Lago Paranoá, Pontão do Lago Sul (espelho d'água), torneira do banheiro feminino do Pontão, Lago Parque Olhos d'água. As coletas foram realizadas entre março e abril de 2023.

Para a coleta das amostras, foi realizada a técnica descrita pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em 2005, utilizando um frasco de polipropileno de alta densidade e coletando 1,0 L das amostras. Para as coletas em

águas superficiais, o frasco foi segurado pela base e mergulhado com a boca para baixo rapidamente e inclinado para cima, movimentando-o para frente na direção horizontal até ser preenchido e fechado imediatamente após. Para as coletas de torneiras, foi realizada higienização com álcool 70% em algodão e, em seguida, a torneira foi completamente aberta, escoando água por três minutos. Os frascos foram armazenados em refrigeração em temperatura entre 3 e 5°C com as amostras sendo processadas e semeadas no meio de cultivo em até 24h.

Neste trabalho não foram coletadas amostras de água de bebedouros, haja vista que não foi possível obter o material filtro de celulose ou policarbonato com a correta dimensão de 0,2 µm e diâmetro de 47 mm, necessário para o processamento de água potável.

Para a semeadura em ágar BCYE, foi utilizado o Kit Legionelabac Aqua da Probac, o qual contém 10 laminocultivos e 5 tubos com solução acidificante, destinado ao isolamento de espécies do gênero *Legionella* em amostras de água. O sistema Legionelabac contém o meio Ágar Extrato de Levedura-Carvão (BCYE) na face larga da lâmina (anterior) e os meios Ágar Extrato de Levedura-Carvão seletivo na face direita posterior e Ágar Extrato de Levedura-Carvão seletivo sem L-Cisteína na face esquerda posterior. O meio de cultivo ideal para o crescimento desse microrganismo deve conter extrato de levedura para fornecimento de nutrientes e carvão ativado, o qual remove radicais de oxigênio (PROBAC BRASIL, 20

O ágar BCYE é um meio tamponado que contém carvão e suplementos adequados para o metabolismo do gênero *Legionella spp.*: L-Cisteína, ferro, extrato de levedura e alfa cetoglutarato. O Ágar Extrato de Levedura-Carvão Seletivo contém antimicrobiano que permitem o desenvolvimento de gênero *Legionella spp.* e inibem microrganismos de flora contaminante. O Ágar Extrato de Levedura-Carvão seletivo sem L-cisteína é meio isento deste metabólito essencial para o crescimento do gênero da bactéria em questão. Portanto, uma importante indicação do isolamento de *Legionella spp.* é o crescimento de colônias nos meios que contém L-cisteína, ou seja na parte larga do laminocultivo e direita posterior, além da ausência de crescimento no meio dividido esquerdo posterior do laminocultivo (PROBAC, 2023).

Transferiu-se água de cada amostra para provetas de 100 mL para a medição precisa de 10 mL de água, que em seguida, foi colocada em dois béqueres de vidro, sendo em um deles, adicionada a solução acidificante que acompanha o produto.



Em seguida, é realizado o contato direto da amostra com o primeiro laminocultivo, e após 5 minutos, a imersão do segundo laminocultivo na água com pH modificado. A acidificação permite eliminar bactérias contaminantes e favorecer o isolamento de *Legionella spp.*

Após a análise e comparação dos laminocultivos, foram realizados testes confirmatórios para verificar se as colônias que cresceram eram de fato o alvo da pesquisa. Para isso, foi feita a coloração Gram e o repique das colônias características. A coloração de Gram revela bacilos Gram negativos finos. O repique foi realizado em ágar BCYE em outro laminocultivo com o objetivo de isolar esses microrganismos e utilizar as novas colônias para realização da técnica de MALDI-TOF, a qual não foi possível realizá-la devido a problemas técnicos de terceiros, o que tornou o seguimento da pesquisa inconclusivo.

Desse modo, em um segundo momento do projeto, foram feitas novas coletas realizadas no dia 24/08/2023 das seguintes regiões públicas: Memorial JK (parte externa - espelho d'água), Lago Parque da Cidade, Praça dos Cristais (espelho d'água), Palácio do Buriti (parte externa - espelho d'água), Congresso Nacional (parte externa - espelho d'água), Palácio da Justiça (parte externa - espelho d'água), Itamaraty (parte externa - espelho d'água), Torre de TV (fonte), Museu da Biblioteca Nacional (parte externa - espelho d'água), Superquadra sul 308 (praça), Lago Paranoá, com as mesmas técnicas utilizadas anteriormente e mesmo processo de semeadura nos laminocultivos. Entretanto, dessa vez, além da coloração Gram, a metodologia de escolha para teste confirmatório das colônias suspeitas foi a semeadura em ágar sangue. As bactérias do gênero *Legionella* são incapazes de crescer em meio de cultura como o ágar sangue ou meios de cultura comuns pois requerem uma determinada suplementação (L-cisteína e ferro).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras coletadas em março e abril de 2023:

Os resultados obtidos nesta fase da pesquisa fazendo o uso da metodologia supracitada foram: 15 amostras coletadas, 14 (93,33%) apresentaram crescimento em ágar BCYE sem ácido, 7 (46,67%) apresentaram crescimento em BCYE com ácido, 8 (53,33%) demonstraram colônias características de *Legionella spp.*, ou seja, morfologia circular convexa cinzas brilhantes. Nessas, foram feitas microscopias e

realizadas repiques em novos laminocultivos na tentativa de isolar colônias antes de utilizar o MALDI-TOF.

Quadro 1: Pontos de coleta de água para a pesquisa e resultados obtidos entre março e abril de 2023.

Amostra	Local de coleta	Crescimento em BCYE (solução <b>sem</b> ácido)	Crescimento em BCYE (solução <b>com</b> ácido)	Colônias características?	Repique
1	Memorial JK	Sim	Sim	Não	-
2	Torneira Parque da Cidade	Sim	Não	Não	-
3	Lago Parque da Cidade	Sim	Não	Sim	Sim
4	Praça dos Cristais	Sim	Não	Não	-
5	Palácio do Buriti	Sim	Sim	Não	-
6	Congresso Nacional	Não	Não	Não	-
7	Palácio da Justiça	Sim	Sim	Sim (com ácido)	Sim
8	Itamaraty	Sim	Não	Sim	Sim
9	Torre de TV	Sim	Não	Não	-
10	Museu Nacional	Sim	Sim	Sim (sem ácido)	Sim
11	SQS 308	Sim	Sim	Sim (sem ácido)	Sim
12	Lago Paranoá	Sim	Sim	Sim (sem ácido)	Sim
13	Pontão	Sim	Sim	Sim (sem ácido)	Sim
14	Torneira Pontão	Sim	Não	Não	-

15	Parque Olhos d'água	Sim	Sim	Sim (ambas soluções)	Sim
----	---------------------	-----	-----	----------------------	-----

Fonte: Elaborado pelas autoras.

Amostras coletadas em agosto de 2023:

Os resultados obtidos nesta fase da pesquisa fazendo o uso da metodologia foram: Das 11 amostras coletadas, 11 (100%) apresentaram crescimento em ágar BCYE com e sem ácido, 4 (36,6%) demonstraram colônias características com e sem ácido, 1 (9%) em meio sem ácido e 5 (45,45%) com ácido, enquanto apenas 1 (9%) não apresentava colônia característica de *Legionella spp.* Em seguida, foram feitos testes confirmatórios das colônias suspeitas em ágar sangue e coloração de Gram, na qual todas as amostras demonstram presença de gram negativos, entretanto, apenas 3 delas apresentavam padrão da nossa bactéria-alvo.

Verificou-se que as microscopias mais características eram das amostras: Itamaraty, Museu Nacional, SQS 308 e Lago Paranoá. A partir disso, sabendo que as *Legionellas* são incapazes de crescer em meio de cultura como o ágar sangue ou qualquer outro comumente usado em laboratórios químicos, optou-se por fazer a semeadura em ágar sangue, demonstrando ausência de crescimento nas placas das 3 seguintes amostras (27,27%): Itamaraty, Museu Nacional e Lago Paranoá, apontando prováveis indicativos de *Legionella*. Vale ressaltar que essas amostras também não apresentaram crescimento de colônias características na face esquerda dividida do laminocultivo, o qual é isento de L-cisteína, sendo isso um fator a mais que corrobora para o isolamento de *Legionella spp.*

Quadro 2: Pontos de coleta de água para a pesquisa e resultados obtidos em agosto de 2023.

Amostra	Local da amostra	Crescimento em BCYE (solução <b>sem</b> ácido)	Crescimento em BCYE (solução <b>com</b> ácido)	Colônias características?	Testes confirmatórios
1	Memorial JK	Sim	Sim	Sim (ambas soluções)	Gram não característico. Houve crescimento em ágar sangue.
2	Lago	Sim	Sim	Não	-

	Parque da Cidade				
3	Praça dos Cristais	Sim	Sim	Sim (sem ácido)	Gram não característico. Houve crescimento em ágar sangue.
4	Palácio do Buriti	Sim	Sim	Sim (com ácido)	Gram não característico. Houve crescimento em agar sangue
5	Congresso Nacional	Sim	Sim	Sim (ambas soluções)	Gram não característico. Houve crescimento em ágar sangue em ambos os meios
6	Palácio da Justiça	Sim	Sim	Sim (com ácido)	Gram não característico. Houve crescimento em agar sangue
7	Itamaraty	Sim	Sim	Sim (com ácido)	Gram característico. Não houve crescimento em ágar sangue.
8	Torre de TV	Sim	Sim	Sim (com ácido)	Gram não característico. Houve crescimento em agar sangue
9	Museu Nacional	Sim	Sim	Sim (ambas soluções)	Com ácido: Gram característico. Não houve

					crescimento em ágar sangue. Sem ácido: Gram não característico. Houve crescimento em ágar sangue.
10	SQS 308	Sim	Sim	Sim (ambas soluções)	Houve crescimento em ágar sangue.
11	Lago Paranoá	Sim	Sim	Sim (com ácido)	Gram característico. Não houve crescimento em ágar sangue.

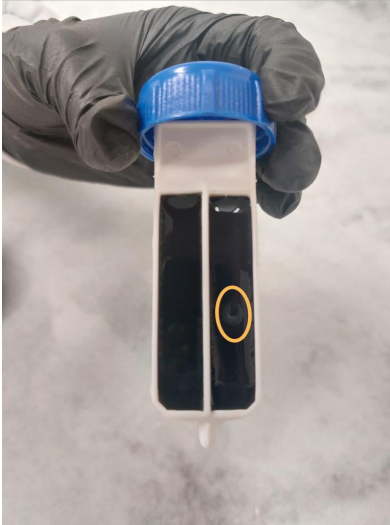
Fonte: Elaborado pelas autoras.

Figura 1: Amostra 7 em laminocultivo em BCYE



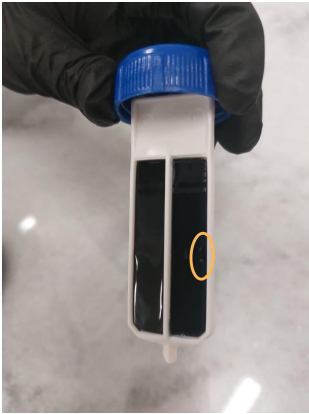
Fonte: ALVES; OLIVEIRA, 2023.

Figura 2: Amostra 9 em laminocultivo com meio BCYE



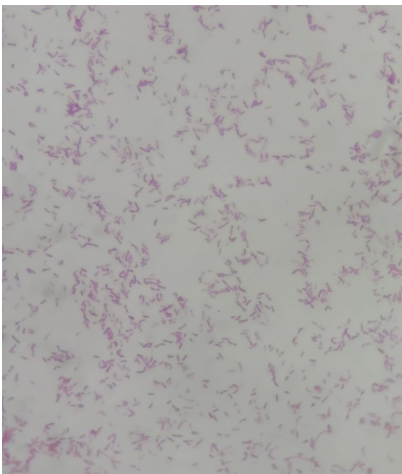
Fonte: ALVES; OLIVEIRA, 2023.

Figura 3: Amostra 11 em laminocultivo com meio BCYE



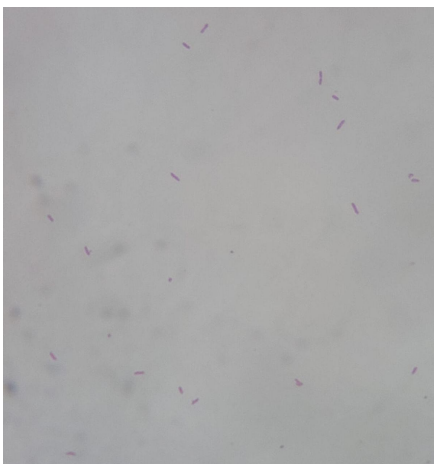
Fonte: ALVES; OLIVEIRA, 2023.

Figura 4: Coloração de Gram da amostra 7



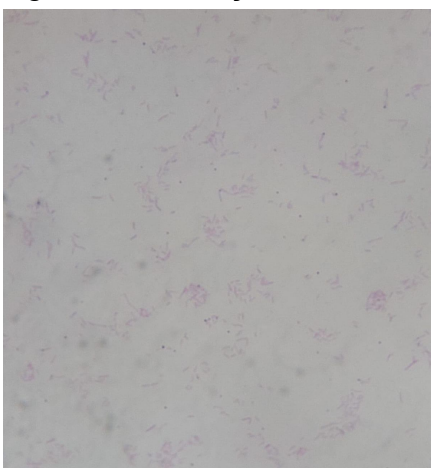
Fonte: ALVES; OLIVEIRA, 2023.

Figura 5: Coloração de Gram da amostra 9



Fonte: ALVES; OLIVEIRA, 2023.

Figura 6: Coloração de Gram da amostra 11



Fonte: ALVES; OLIVEIRA, 2023.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias do gênero *Legionella spp.* são capazes de sobreviver numa ampla gama de condições ambientais e são encontradas na natureza, independentemente da estação do ano, colonizando ambientes aquáticos naturais. Esses microrganismos podem causar a doença dos legionários, que apresenta incidência crescente e alta taxa de mortalidade. No Brasil e Distrito Federal, os estudos realizados sobre a existência dessa bactéria em fontes de água ainda são escassos, não existindo informações relevantes sobre a epidemiologia da presença do patógeno e surtos ocorridos. Esses dados são menores e mais limitados em nível nacional do que em outros países, como os Estados Unidos e países da Europa, provavelmente por serem doenças subdiagnosticadas, uma vez que suas pesquisas

são menos solicitadas pelos médicos e por terem métodos pouco disponíveis e/ou pouco sensíveis.

Após finalizar a pesquisa da bactéria *Legionella pneumophila* em fontes de água do Distrito Federal, como previsto no objetivo geral do projeto, verificou-se a presença do patógeno em três amostras. Nesse sentido, foi possível perceber que o tratamento de água nem sempre é eficaz, podendo repercutir na saúde da população.

Por isso, existe a necessidade de uma melhora das metodologias para detecção da bactéria em amostras clínicas e amostras de água, visando incrementar o controle microbiológico para esse microrganismo, visto que, no Brasil, os testes utilizados são limitados e pouco disponíveis. Ademais, é de suma importância reforçar o tratamento adequado e prevenção dessas infecções, mesmo não sendo reportadas a ocorrência de casos da doença, visando a diminuição dos riscos oferecidos em fontes de água da comunidade.



## REFERÊNCIAS

1. CHAUVET, P. et al. Pneumonia adquirida na comunidade. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 9, n. 2, 2010.
2. CORREIA, A.M. et al. An Outbreak of Legionnaire'disease in northern Portugal. *Euro Surveil*. 6(7), pp. 228. 2001.
3. CUF. Legionella: o que deve saber. 2018. Disponível em: < <https://www.cuf.pt/mais-saude/o-que-deve-saber-sobre-legionella> >. Acesso em: 29 de abril de 2022.
4. DIÁRIO DE NOTÍCIAS. Legionella. Empresas chegam a acordo com vítimas e evitam julgamento, 2022. Disponível em: < <https://www.dn.pt/sociedade/legionella-empresas-chegam-a-acordo-com-vitimas-e-evitam-julgamento-14524636.html#:~:text=Em%20mar%C3%A7o%20de%202017%2C%20o,infetou%20mais%20de%20400%20pessoas> >. Acesso em: 2 de maio de 2022.
5. DIEGUES, P; MARTINS, V. Prevenção da Doença dos Legionários. Direção-Geral da Saúde. Lisboa. 2013.
6. DELGADO-VISCOGLIOSI, P. et al. Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 7, p. 4086-4096, 2005.
7. DOMINGUES, J.P.A. Surto de Legionella em Portugal no ano 2014: Análise ao conhecimento da população. 2015. Tese de Doutorado.
8. DO NASCIMENTO, L.P.; DE OLIVEIRA SOUZA, K. C. PRESENÇA DE LEGIONELLA EM SISTEMAS HIDRÁULICOS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, 2019.

9. EDWARDS-JONES, V. et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of medical microbiology*, v. 49, n. 3, p. 295-300, 2000.
10. ETTO, H.Y.; RAZZOLINI, M.T.P. Detecção de bactérias do gênero *Legionella* em amostras de água de sistemas de ar condicionado. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, n. 4, p. 557-564, 2011.
11. EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) – Operating procedures. Stockholm: ECDC; 2012. Disponível em: <<https://portal2.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-legionnaires-disease-surveillance-network-eldsnet-operating-procedures> >. Acesso em: 30 de abril de 2022.
12. FERNANDES, A. G. Programa de vigilância ambiental da *Legionella* spp. 2015.
13. FERREIRA, A. P. CUNHA, C. L. N. Pesquisa de *Legionella pneumophila* nas redes de abastecimento hospitalar. *Revista Eletrônica de Comunicação Informação & Inovação em Saúde*, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p.208-214, 2007.
14. FIELDS, B. S.; BENSON, R. F.; BESSER, R. E. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 3, p. 506-526, 2002.
15. GEA-IZQUIERDO, Enrique. Biological risk of *Legionella pneumophila* in irrigations systems. *Rev. salud pública [online]*. 2020, vol. 22, n.4, e208. Epub Sep 20,2021.

16. GEORGIA DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH. Legionella Outbreak Investigation Update. 2019. Disponível em: <  
<https://dph.georgia.gov/press-releases/2019-07-29/legionella-outbreak-investigation-update> >. Acesso em: 29 de abril de 2022.
17. GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL. SECRETARIA ESTADO DE SAÚDE. Relatório Epidemiológico Sobre Mortalidade Geral Distrito Federal. Brasília, 2016.
18. HARRISON, T. G.; TAYLOR, A. G. A Laboratory manual for Legionella spp. John Willey and Sons. Chichester, 1988.
19. KONEMAN. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
20. LEGIONELABAC AQUA. [Bula]. São Paulo: Probac do Brasil. Disponível em: <http://www.probacbrasil.com/Anexos/Bulas/Isentos/Legionelabac%20Aqua%20Rev.00.pdf>. Acesso em: 13 de agosto de 2023.
21. MANDELL, L. A. Community-acquired pneumonia: an overview. Postgraduate medicine, v. 127, n. 6, p. 607-615, 2015.
22. MARQUES, M. T. et al. Doença dos Legionários: Protocolo de diagnóstico. Lisboa: Centro Regional de Saúde Pública de Lisboa e Vale do Tejo, 2003.
23. MERCANTE, J. W.; WINCHELL, J. M. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clinical microbiology reviews, v. 28, n. 1, p. 95-133, 2015.
24. NEWS LAB. Surtos recentes de legionelose em ascensão pelo mundo. 2019. Disponível em: <  
<https://newslab.com.br/surtos-recentes-de-legionelose-em-ascensao-pelo-mundo/#:~:text=Na%20Europa%2C%20Austr%C3%A1lia%20e%20nos,da%20>

- legionelose%20 provavelmente%20%C3%A9%20 subnotificada >. Acesso em: 2 de maio de 2022.
25. NEWTON, H. J. et al. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 274-298, 2010.
26. NÓBREGA, Lourdes; PACHECO, Aldo. Pesquisa de *Legionella pneumophila* nas redes de abastecimento hospitalar.
27. NSF. ABNT NBR 16824: O gerenciamento do risco da *Legionella* em sistemas de água. 2021. Disponível em: <  
<https://nsfinternational.com.br/abnt-nbr-16824-o-gerenciamento-do-risco-da-legionella-em-sistemas-de-agua/> >. Acesso em: 5 de maio de 2022.
28. O'BRIEN, S.J.; BHOPAL, R.S. Legionnaires' disease: the infective dose paradox. *The Lancet, Newcastle*, v. 342, p. 5-6, July 1993.
29. OPLUSTIL, C.P. et. Al. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. São Paulo; Sarvier, 2000. 254p.
30. PAIS, M. M. R. T. R. *Legionella pneumophila* e doença dos legionários. 2015.
31. PAIXÃO, F. M; VINGA, I. e ROGADO, R. Relato de um caso de fadiga persistente dois anos após pneumonia a *Legionella pneumophila*. *Rev Port Med Geral Fam* [online], vol.35, n.3, pp.223-231. ISSN 2182-5173, 2019.
32. VERONESI R., FOCACCIA R. *Tratado de Infectologia*. 5ª ed. São Paulo: Ed Atheneu, 2015.
33. VITAL, I.F.D. Detecção, identificação e quantificação de *Legionella* spp. em amostras de água. 2019. Tese de Doutorado.

34. YU, V. L. Legionella spp. surveillance: political and social implications: a little knowledge is a dangerous thing. *The Journal of Infectious Diseases*. 185: 2 pp. 259- 261, 2002.
35. GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. Cecil: tratado de medicina interna. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 2668 p.