

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

doi: 10.5123/S1679-49742011000400015

Detection of the *Legionella* Genus in Water Samples from Air Conditioning Systems

Helder Yudji Etto

Departamento de Saúde Ambiental, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil

Maria Tereza Pepe Razzolini

Departamento de Saúde Ambiental, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil

Resumo

Objetivo: determinar a presença de *Legionella* sp. em amostras de água de sistemas de ar condicionado. **Metodologia:** foram analisadas 41 amostras de água de sistemas de ar condicionado; as amostras foram concentradas em membrana, seguindo-se seu tratamento ácido; alíquotas das amostras tratadas e não tratadas com ácido foram inoculadas em BCYE α -ágar, com e sem antibióticos. **Resultados:** quatro (9,8%) das amostras analisadas apresentaram resultado positivo para *Legionella* sp.; uma foi identificada como *Legionella pneumophila* sorogrupo 1, confirmando-se a presença de *Legionella* sp. nos sistemas de ar condicionado estudados; observou-se uma maior frequência dos isolados em hospitais. **Conclusão:** os achados demonstram a importância e a necessidade de se programar planos de monitorização de sistemas de ar condicionado, como medida preventiva contra a colonização por patógenos.

Palavras-chave: *Legionella*; água; ar condicionado.

Summary

Objective: the study aims to determine *Legionella* presence in water samples from air-conditioning systems. **Methodology:** 41 samples of water from air-conditioning systems were concentrated on membrane, and received acid treatment; aliquots of the sample treated and not treated with acid were inoculated on BCYE- α agar medium, with and without added antibiotics. **Results:** from the samples analyzed, 4 (9.8%) were positive for *Legionella* sp.; one was identified as *Legionella pneumophila* serogroup 1, revealing the presence of *Legionella* sp. in those systems; it was observed a higher frequency in isolates from hospitals. **Conclusion:** the results demonstrate the importance and the need of monitoring plans in air-conditioning systems as a preventive measure against colonization by pathogens

Key words: *Legionella*; water; air conditioning.

* O estudo contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)/Ministério da Educação.

Endereço para correspondência:

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Ambiental, Av. Dr Arnaldo, 715, 1º Andar, São Paulo-SP, Brasil. CEP: 01246-904
E-mail: helder.etto@usp.br; helder.etto@gmail.com

Introdução

O gênero *Legionella* tem sido reconhecido como importante agente etiológico causador da doença do trato respiratório conhecida como legionelose ou doença do legionário,¹ a qual se caracteriza por pneumonia aguda com sintomas como febre alta, dores de cabeça, calafrios, diarreia e tosse seca.

Legionella é uma bactéria aquática e tem sido isolada em ambientes construídos pelo homem, como os sistemas de ar condicionado, que apresentam condições favoráveis para sua proliferação.^{2,3} Em decorrência da colonização pela bactéria do gênero *Legionella*, tais sistemas têm sido identificados como fonte de propagação desses organismos, o que pode resultar em surtos de legionelose.^{4,5} A presença desses organismos em sistemas de ar condicionado de ambientes confinados configura um problema de Saúde Pública, pois essas bactérias podem ser inaladas juntamente com partículas suspensas de poeira ou aerossóis originários dos sistemas de ar condicionado.

A presença de bactérias do gênero Legionella em sistemas de ar condicionado de ambientes confinados configura um problema de Saúde Pública, pois essas bactérias podem ser inaladas.

De acordo com estudos epidemiológicos, alguns surtos de legionelose são resultado do crescimento de *Legionella* sp. em torres de resfriamento e sistemas de ar condicionado.^{6,7} Esse patógeno emergente é objeto de estudo em vários países.^{1,6,8-11} Pesquisa realizada pelo European Working Group of Legionnaires' Infection (EWGLI), no período de 1987 a 2008, mostrou aumento do número de casos de legionelose na Europa,⁷ indicando a preocupação em se identificar as fontes dessas infecções.

No Brasil, Pellizari e colaboradores¹² realizaram um estudo para avaliar a ocorrência do gênero *Legionella* em amostras de água de residências, edifícios públicos, hospitais e plantas industriais em São Paulo e encontraram que, das 69 amostras analisadas, seis foram positivas para a presença de *Legionella* sp. Ferreira¹³ analisou amostras de água de cinco hospitais no Rio

de Janeiro: os resultados revelaram a presença de *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 em todas as amostras examinadas. Carvalho e colaboradores,¹⁴ analisaram 67 amostras de água de reservatórios naturais, torres de resfriamento, clínicas dentárias, sistemas de aquecimento e condensadores na cidade de São Paulo: o gênero *Legionella* foi isolado em nove amostras.

O objetivo do presente estudo foi o de analisar amostras de água coletadas em bandejas de aparelhos de ar condicionado para avaliar a presença de *Legionella* sp. Esses locais apresentam características favoráveis à proliferação dessas bactérias e, portanto, significam potenciais fontes de surtos de legionelose em locais confinados.

Metodologia

Foram coletadas amostras de água de bandejas de sistemas de ar condicionado de edifícios localizados no município de São Paulo, no período de julho de 2007 a agosto de 2008, respeitando-se uma frequência bimestral. Um total de 41 amostras foram coletadas e analisadas nos seguintes pontos: a) Centro Comercial (CC), onde as amostras de água foram coletadas de três máquinas diferentes, identificadas como CC M1 (n=6), CC M2 (n=6) e CC M3 (n=6); b) hospital 1 (HO1), onde as amostras de água foram coletadas de duas máquinas distintas, identificadas como HO1 M1 (n=6) e HO1 M2 (n=6); c) hospital 2 (HO2) (n=6); e iv) instituto de ensino IES (n=5).

Volumes de um litro de amostra de água foram coletados em frascos estéreis, transportados sob refrigeração e examinados em um período de 24 horas, de acordo com os 'Standard Methods for Examination of Water and Wastewater'.¹⁵ O teor de cloro residual das amostras foi medido pelo método colorimétrico, utilizando-se o analisador de cloro Policontrol®. A temperatura da água foi obtida mediante o uso de termômetro de coluna de mercúrio; e o valor de pH, utilizando-se papel universal indicador de pH.

O isolamento e a identificação de *Legionella* foram realizados de acordo com os 'Standard Methods for Examination of Water and Wastewater'.¹⁵

As amostras coletadas foram concentradas em membrana de policarbonato de 47mm de diâmetro, com porosidade de 0,22µm. Após a concentração na membrana, o material retido foi ressuspenso em um tubo cônico do tipo Falcon de 50mL, contendo 10mL

de água destilada, submetido a agitação utilizando-se agitador de tubos do tipo vortex, por três vezes durante 30 segundos. Após a ressuspensão do material aderido à membrana, volume de 1mL da amostra foi submetido a tratamento com ácido. O restante da amostra não foi submetido a esse tratamento.

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

Uma alíquota de 0,1mL de cada uma das amostras – tratada com ácido e não tratada – foi inoculada, em triplicata, pela técnica de spread plate, em placas de Petri contendo ‘Buffered Charcoal Yeast Extract Alpha Base’ (BCYE-alfa) e BCYE-alfa suplementado com glicina, vancomicina, polimixina B e cicloeximina (GVPC). As placas de Petri foram incubadas a $35^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Com 48 horas de incubação, foi feita a primeira leitura de placas. Após a primeira leitura, as placas foram incubadas por um período de até oito dias, sendo examinadas diariamente durante todo o período. As colônias típicas foram transferidas para os meios de cultura BCYE-alfa e BCYE sem cisteína, e incubadas a $35^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para confirmação do gênero *Legionella*.

As colônias confirmadas como *Legionella* sp. foram submetidas ao teste de látex Oxoid®, para identificação de espécies. O teste de látex é composto por uma cartela de reação, uma suspensão-tampão e seis reagentes. O primeiro reagente identifica *L. pneumophila* sorogrupo 1; consiste de partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho específicos contra o antígeno do sorogrupo 1. O segundo reagente identifica *L. pneumophila* sorogrupos 2 a 14 e consiste de partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho específicos contra o antígeno do sorogrupo 2 a 14. O terceiro constitui um soro polivalente, que identifica seis prováveis espécies – *L. longbeachae*; *L. bozemanni*; *L. dumoffi*; *L. gormanii*; *L. jordanis*; *L. micdadei*; e *L. anisa* – e consiste de partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho específicos contra essas seis espécies. O quarto reagente é o controle positivo, ou seja, uma suspensão polivalente de células de *Legionella* em

tampão e o quinto reagente é o controle negativo, composto por suspensão de células de *L. spiritensis* em tampão não reativo com os reagentes do teste. O quarto e quinto reagentes são utilizados para verificação do correto funcionamento dos reagentes do látex. O sexto reagente é um látex de controle, constituído de partículas de látex azul sensibilizadas com globulina de coelho não reativa.

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

Na avaliação do desempenho do método, utilizou-se lenticula com concentração conhecida de *Legionella pneumophila* ($4,38 \times 10^4$ UFC/disc), produzido pela ‘Health Protection Agency’ (HPA). A lenticula foi reidratada em 1mL de solução de tampão fosfato, seguindo-se as instruções do fabricante. Logo, a solução foi transferida a um frasco estéril contendo 1L de solução-tampão de fosfato estéril, então submetida ao mesmo processo de isolamento de *Legionella* já descrito aqui.

A taxa de recuperação foi obtida de acordo com a seguinte equação:

$$R (\%) = [(\text{concentração de } Legionella / 4,38 \times 10^4)] \times 100$$

Para a avaliação das condições sanitárias dos sistemas de ar condicionado avaliados, realizou-se a quantificação de bactérias heterotróficas de acordo com os ‘Standard Methods for Examination of Water and Wastewater’ (APHA 2000),¹⁵ mediante técnica de *pour plate*, utilizando-se o ‘Plate Count Agar’ (Difco®, USA), com tempo de incubação de 48 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Resultados

Das 41 amostras de água analisadas dos sistemas de ar condicionado, quatro (9,8%) foram positivas para a presença de *Legionella* sp. como mostra a Figura 1.

Três das quatro amostras positivas para a presença de *Legionella* sp. foram obtidas a partir do sistema localizado no hospital HO1. Das cepas isoladas do ponto HO1 M1, uma foi identificada como *Legionella pneumophila* sorogrupo 1, com concentração de $1,0 \times 10^2$ UFC/L; a outra foi identificada como uma das

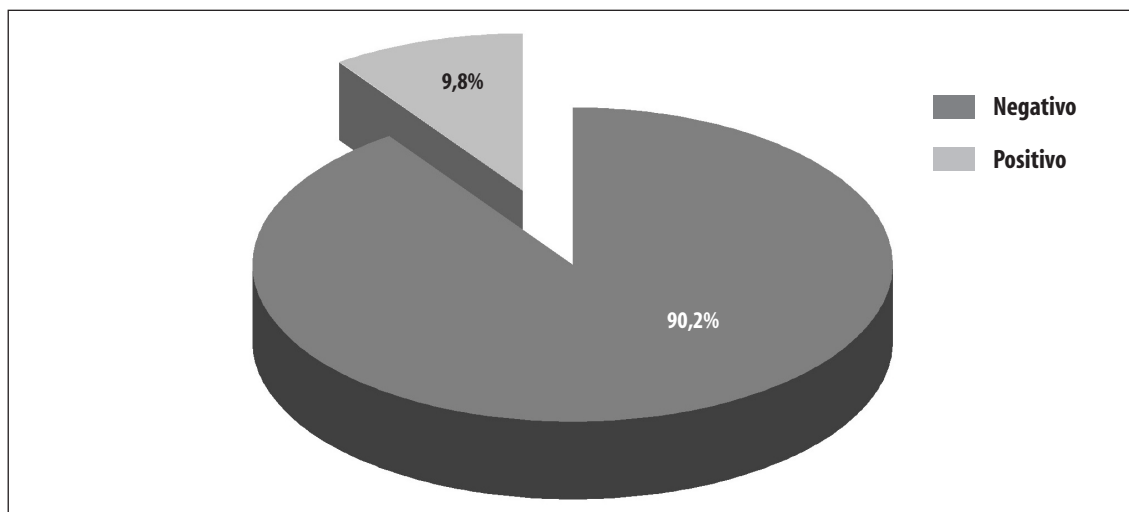


Figura 1 - Porcentagem de resultados positivos para a presença de *Legionella* sp. em amostras de água de bandejas de sistemas de ar condicionado examinadas, coletadas em edifícios do município de São Paulo-SP. Brasil, julho de 2007 a agosto de 2008

seis possíveis espécies segundo o teste de látex – *L. longbeachae*; *L. bozemanni*; *L. dumoffi*; *L. gormanii*; *L. jordanis*; *L. micdadei*; e *L. anisa* –, exibindo concentração de $2,0 \times 10^2$ UFC/L. A espécie isolada do ponto HO1 M2, igualmente, foi identificada como uma das seis possíveis espécies segundo o teste de látex, com concentração de $1,6 \times 10^2$ UFC/L. E a quarta espécie isolada de *Legionella*, obtida de amostra proveniente do CC M3, também foi identificada como uma das seis espécies supracitadas, apresentando concentração de $1,3 \times 10^2$ UFC/L.

Em relação às condições higiênico-sanitárias, a concentração de bactérias heterotróficas variou de <1 a $2,62 \times 10^4$ UFC/mL, como mostra a Tabela 1. Observou-se, entre os pontos de coleta, maior concentração desses organismos entre os meses de novembro e dezembro, quando se registram temperaturas mais elevadas.

A média de temperatura nos pontos de coleta foi de $14,1^\circ\text{C}$, variando de uma máxima de $19,0^\circ\text{C}$ à mínima de $12,0^\circ\text{C}$. No hospital HO1, ponto HO1 M1, a média da temperatura da água foi de $15,5^\circ\text{C}$; e no ponto HO1 M2, verificou-se média de $14,5^\circ\text{C}$. No hospital HO2, a média observada foi de $14,0^\circ\text{C}$. No instituto de ensino superior, IES, a temperatura média foi de $15,2^\circ\text{C}$. E no centro comercial, CC, as temperaturas médias encontradas nos pontos CC M1, CC M2 e CC M3 foram de $13,0^\circ\text{C}$, $13,5^\circ\text{C}$ e $13,5^\circ\text{C}$, respectivamente.

As medidas de pH mostraram pouca variação entre as amostras avaliadas: uma (2,4%) apresentou pH 4,0; quatro (9,8%) apresentaram pH 6,0; e 36 (87,8%) apresentaram pH 5,0. As medidas de cloro residual livre também mostraram pouca variação: apenas uma amostra coletada no IES e outra no CC M2 apresentaram concentração de cloro residual livre, com valores de 0,1 e 1,5 mg Cl/L, respectivamente. Todas as demais amostras apresentaram valores $<0,1$ mg Cl/L.

O resultado de desempenho do método utilizado foi uma taxa de recuperação de *Legionella* de 51,0 a 75,0% (desvio padrão de $\pm 10,44\%$).

Discussão

Os resultados obtidos por este estudo revelaram a ocorrência do gênero *Legionella* em sistemas de ar condicionado: das 41 amostras de água analisadas, quatro (9,8%) foram positivas para a presença da bactéria. Esses resultados corroboram os achados de Pellizari e colaboradores,¹² Turetgen e colaboradores⁵ e Carvalho e colaboradores.¹⁴

Três dos quatro isolados de *Legionella* foram obtidos a partir de amostras oriundas dos sistemas de ar condicionado do hospital HO1, sendo dois isolados da mesma máquina de ar condicionado. Esse resultado evidencia que a manutenção dessa máquina pode estar sendo negligenciada e, portanto,

Tabela 1 - Concentração de bactérias heterotróficas e de *Legionella* sp. nas amostras de bandejas de água de sistemas de ar condicionado examinadas, coletadas em edifícios do município de São Paulo-SP. Brasil, julho de 2007 a agosto de 2008

Amostras	Concentração de bactérias heterotróficas (UFC/mL)	Concentração de <i>Legionella</i> sp. (UFC/L)
1	ND	Negativo
2	ND	Negativo
3	ND	Negativo
4	3,72x10 ²	Negativo
5	4,50x10 ²	Negativo
6	2,91x10 ²	Negativo
7	6	Negativo
8	10	Negativo
9	2,5	Negativo
10	4,45x10 ²	Negativo
11	1,65x10 ²	Negativo
12	2,62x10 ⁴	Negativo
13	1,22x10 ⁴	Negativo
14	1,40x10 ⁴	Negativo
15	1,08x10 ⁴	1,6x10 ²
16	1,90x10 ⁴	Negativo
17	2.23x10 ³	Negativo
18	1,30x10 ²	Negativo
19	5,65x10 ²	Negativo
20	3,85x10 ²	1,3x10 ²
21	2,60x10 ²	1x10 ²
22	<1	Negativo
23	1,85x10 ²	Negativo
24	2,47x10 ²	Negativo
25	1,21x10 ³	Negativo
26	2,68x10 ²	Negativo
27	2,75x10 ²	Negativo
28	80	2x10 ²
29	3,55x10 ²	Negativo
30	1,40x10 ²	Negativo
31	1,04x10 ²	Negativo
32	81	Negativo
33	1,08x10 ²	Negativo
34	9,90x10 ²	Negativo
35	35	Negativo
36	4,75x10 ²	Negativo
37	5,29x10 ³	Negativo
38	2,31x10 ³	Negativo
39	1,05x10 ²	Negativo
40	70	Negativo
41	60	Negativo

ND: Não detectado

favorecendo a formação de biofilmes e colonização por bactérias patogênicas como as do gênero *Legionella*. Os outros isolados foram identificados como seis possíveis espécies de importância clínica, haja vista serem considerados responsáveis por causar pneumonia nosocomial.^{16,17}

As concentrações de *Legionella* sp. obtidas variaram de $1,0 \times 10^2$ UFC/L a $2,0 \times 10^2$ UFC/L. Os achados destes autores coincidem com os resultados relatados por Bentham,¹⁸ que analisou amostras de água de sistemas de ar condicionado associados a surtos de legionelose, nos quais obteve concentrações abaixo de 100 UFC/mL. O autor sugere que concentrações elevadas de *Legionella* sp. nesses sistemas não são comuns, ocorrem esporadicamente e, nesses episódios de pico, podem resultar em surtos da doença.

Segundo Stout e colaboradores,³ a concentração de *Legionella* sp. não é relevante para a avaliação de risco de surtos. Relevante seria a presença desse patógeno associado à extensão da área colonizada pela bactéria. O mesmo foi observado por Armstrong e colaboradores,¹⁹ que relataram a exposição a uma cepa virulenta suficiente para causar a doença.

As faixas de concentrações de bactérias heterotróficas encontradas foram de <1 a $2,62 \times 10^4$ UFC/mL. Relatos encontrados na literatura consultada sugerem associação entre a presença de biofilme e a presença do gênero *Legionella*.²⁰⁻²² No presente estudo, entretanto, não foi possível demonstrar essa relação dado o número de amostras positivas para a presença de *Legionella* sp. e a grande variação na concentração de bactérias heterotróficas nas amostras analisadas.

A média de temperatura encontrada nos pontos de coleta foi de $14,1^\circ\text{C}$. Segundo Rogers e colaboradores,⁴ sob condições de temperaturas inferiores a 20°C , a taxa de crescimento da bactéria diminui ou não é observada. Nessas condições, os organismos podem permanecer viáveis, porém não cultiváveis.^{9,23}

Outro fator que pode ter influenciado no baixo número de isolamentos é que as amostras apresentaram valores de pH 6,0 em todas as ocasiões avaliadas. Embora a baixa temperatura e o pH de caráter ácido possam causar alterações fisiológicas nas células,

estas podem permanecer viáveis mas não cultiváveis. O fato de as células se apresentarem não cultiváveis, porém viáveis, leva a um número subestimado de organismos no ambiente estudado.¹⁷

O teor de concentração do cloro utilizado como desinfetante nesses sistemas também pode influenciar a taxa de crescimento desses organismos. Estudo realizado por Gião e colaboradores²⁴ demonstrou que diferentes concentrações de cloro podem afetar o desenvolvimento da bactéria. No presente estudo, porém, não foi possível estabelecer tal relação, já que a maioria das amostras apresentou concentração de cloro $<0,1$ mg Cl/L; e nas amostras cuja concentração foi maior que 0,1 mg Cl/L, *Legionella* sp. não foi isolada.

De acordo com os resultados aqui obtidos, pode-se concluir que o gênero *Legionella* sp. esteve presente nos sistemas de ar condicionado examinados, incluindo-se a espécie *L. pneumophila* sorogrupo 1, a qual foi isolada de sistema de ar condicionado de um dos hospitais participantes. Esse resultado denota que a manutenção preventiva desses equipamentos merece especial atenção. A presença dessas bactérias representa risco aos ocupantes de ambientes climatizados, especialmente no ambiente hospitalar, onde há maior frequência de pessoas com a saúde comprometida.

Ressalta-se, portanto, que o monitoramento e vigilância permanente de sistemas de ar condicionado faz-se necessário para prevenir a colonização desses sistemas por organismos patogênicos e, assim, proteger a saúde dos ocupantes e usuários em ambientes climatizados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes –, do Ministério da Educação, pelo apoio financeiro a este estudo.

À Dra. Maria Inês Zanoli Sato e à Dra. Elyse Maria Hachich, da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB –, pelas cepas de *Legionella pneumophila* essenciais para a realização deste trabalho.

Referências

- Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* And Legionnaires' Disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15(3):506-526.
- Brooks T, Osicki RA, Springthorpe VS, Sattar SA, Filion L, Abrial D, et al. Detection and Identification of *Legionella* species from groundwater. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*. 2004; 67(20-22): 1845-1859.
- Stout JE, Yu VL. Hospital-acquired Legionnaires' disease: new developments. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2003; 16(4):337-334.
- Rogers JA, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 60(5): 1585-1592.
- Turetgen I, Sungur EI, Cotuk A. Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2005; 100(1-3):53-58.
- Carbonne A, Astagneau P. How to reduce the risk of Legionnaires disease? *La Revue du Praticien*. 2005; 55(18):1983-1989.
- Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Ryan NJ, Tan AG, Gordon IR, et al. An outbreak of Legionnaires disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. *The Medical Journal of Australia*. 2004; 180(11):566-572.
- Helbig JH, Benson RE, Pelaz C, Jacobs, Luck PC. Identification and serotyping of atypical *Legionella pneumophila* strains isolated from human and environmental sources. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 102(1):100-105
- Sabrina M, Alvarez J, Dominguez A, Pedrol A, Saucá G, Salleras L, et al. A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006; 12(7):642-647.
- Santos UP, Rumell D, Martarello NA, Ferreira CSW, Matos MP. Síndrome dos edifícios doentes em bancários. *Revista de Saúde Pública*. 1992; 26(6):400-404.
- European Working Group For *Legionella* Infections. The European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaire' Disease. 2008. Vienna; 2010. [acessado em 20 mar. 2008]. Disponível em <http://www.ewgli.org>
- Pellizari VH, Martins MT. Occurrence of *Legionella* sp in water samples from a man made systems of São Paulo-Brazil. *Revista de Microbiologia*. 1995; 26(3):186-191.
- Ferreira AP. Risk and management in hospital water systems for *Legionella pneumophila*: a case study in Rio de Janeiro-Brazil. *International Journal Environmental Health. Research*. 2004; 14(6): 453-459.
- Carvalho FRS, Foronda AS, Pellizari VH. Detection of *Legionella pneumophila* in water and biofilm samples by culture and molecular methods from man-made systems in São Paulo. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38(4):743-751.
- American Public Health Works Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington: American Public Health Works Association; 2000.
- Nguyen TM, Ilef D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, et al. A Community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers-how far can contaminated aerosols spread? *The Journal Infectious Diseases*. 2006; 193(1):102-111.
- Yamamoto N, Kubota T, Tateyama M, Koide M, Nakasone C, Tohyana M, et al. Isolation of *Legionella anisa* from multiple sites of a hospital water system: the eradication of *Legionella* contamination. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2003; 9(2):122-125.
- Bentham HR. Routine Sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water systems. *Current Microbiology*. 2000; 41(4):271-275.
- Armstrong TW, Haas CN. Legionnaires' disease: evaluation of a quantitative microbial risk assessment model. *Journal of Water and Health*. 2008; 6(2): 149-166.
- Donlan RM. Biofilmes: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8(9):881-890.
- Guerrieri E, Bondi M, Borella P, Messi P. Influence of aquatic microorganisms on *Legionella pneumophila* survival. *New Microbiologica*. 2007; 30:247-251.
- Piao Z, SZE CC, Barysheva O, Iida K, Yoshida S. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like

biofilms by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72(2): 1613-1622.

23. Wéry N, Bru-Adan V, Minervini C, Delgènes JP, Garrelly L, Godon JJ. Dynamics of *Legionella* spp. And bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74(10): 3030-3037.

24. Gião MS, Wilks SA, Azevedo NE, Vieira MJ, Keevil CW. Validation of SYTO 9 propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. *Microbial Ecology*. 2009; 58(1):56-62.

Recebido em 18/10/2010
Aprovado em 14/12/2011