

PAPER 48

OS PERIGOS ASSOCIADOS A BACTÉRIA *LEGIONELLA* EM SISTEMAS DE CONDENSAÇÃO DE ÁGUA

Resumo

Este trabalho retrata os riscos eminentes que podem ocorrer através da inalação de aerossóis contaminados pela bactéria *Legionella*, caso não ocorra uma avaliação de risco adequada das edificações conforme preconiza a **ABNT NBR 16824 - Sistemas de distribuição de água em edificações — Prevenção de legionelose — Princípios gerais e orientações**. Em tempos de pandemia da Covid-19, muitas empresas fecharam durante o surto, assim, ocorreu o desligamento temporário ou redução da operação de muitas edificações e reduções no uso normal da água, criando assim, um ambiente propício para aumentar os riscos para o retorno dos ocupantes, pois a água estagnada ou parada em um sistema e suas tubulações pode amplificar o risco de crescimento e propagação de *Legionella*. Apresentam-se e discutem-se neste artigo as diferentes técnicas de análises para detecção da *Legionella*, bem como as vantagens e desvantagens de cada técnica.

Abstract

This paper talks about the eminent risks that can occur through the inhalation of aerosols contaminated by the *Legionella* bacteria, if there is no adequate risk assessment of buildings as recommended by **ABNT NBR 16824 - Sistemas de distribuição de água em edificações — Prevenção de legionelose — Princípios gerais e orientações**. In the time of the Covid-19 pandemic, many companies closed during the outbreak, so there was a temporary shutdown or reduction in the operation of many buildings and reductions in normal water use, thus creating a conducive environment to increase the risks for return occupants, as stagnant or standing water in a system and its pipes can amplify the risk of *Legionella* growth and propagation. This article presents and discusses the different analysis techniques for detecting *Legionella*, as well as the advantages and disadvantages of each technique.

1. INTRODUÇÃO

A *Legionella* é uma bactéria Gram negativa, aeróbica, não esporulada e tem a forma de bacilo, e existem mais de 61 espécies diferentes. São bactérias heterotróficas encontradas em vários ambientes aquáticos, como por exemplo: água de reservatórios, chuveiros, piscinas, sistemas de refrigeração e ar condicionado, entre outros.

A contaminação ocorre através da inalação de gotículas de água contaminada pela bactéria *Legionella*, podendo causar pneumonia grave. Dentre as espécies mais patogênicas encontram-se a *Legionella pneumophila* do sorogruppo 1, sendo essa espécie responsável por causar cerca de 90% dos

casos da doença. Inclusive foi essa espécie que causou o surto da Filadélfia em 1976, quando vários casos de pneumonia atípica de causa desconhecida foram detectados em pessoas que estavam em uma conferência de legionários (veteranos de guerra), que ficou conhecida como a Doença dos Legionários, daí que surgiu o nome “*Legionella*” em homenagem aos mortos (ISO 11731:2017)!

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de pessoas que se infectam a cada ano com a *Legionella*, não representa a realidade, pois os números são desconhecidos. Uma projeção realizada pela mesma OMS tomando por base a Dinamarca – reconhecida como o país em que mais fazem testes em pacientes com pneumonia para detecção da *Legionella* – chegou ao valor de cerca de 10 mil casos anuais apenas nos 36 países que participam da EWGLI (sigla em inglês para Grupo Europeu de Estudos sobre Infecções causadas pela *Legionella*).

Neste trabalho será abordado sobre o aumento dos riscos de contaminação por *Legionella* durante a crise da Covid-19. Será fomentado a importância de identificar fontes ambientais que podem representar um risco de Legionellose, e também serão discutidos a utilização dos diferentes métodos, bem como as vantagens e limitações de cada um deles e o que esses resultados nos auxiliam na interpretação dos sistemas. Além disso, serão abordados os resultados positivos encontrados em diferentes fontes de água de regiões brasileiras.

2. CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO LEGIONELLA

O gênero *Legionella* pertence à ordem taxonômica *Legionellales*, que inclui as famílias *Coxiellaceae* e *Legionellaceae*. Três gêneros diferentes foram propostos para as *Legionellaceae*: *Legionella*, *Fluoribacter* e *Tatlockia*. Entretanto, os dois últimos nomes genéricos nunca foram amplamente usados ou aceitos e o gênero único *Legionella* é usado quase universalmente para descrever todas as espécies. A *Legionella* é uma bactéria Gram negativa, aeróbica, não esporulada e tem a forma de bacilo, é estreita, tendo de 0,3 a 0,9 µm de largura e o comprimento varia de 1,5 a 2,0 µm nos microrganismos de forma curta até formas filamentosas, maiores. São móveis, possuindo flagelo polar, subpolar e/ou lateral.

O gênero *Legionella* possui pelo menos 61 espécies diferentes, e mais de 70 sorogrupos, sendo a *Legionella pneumophila* sorogrupo 01 a mais importante como agente de doenças em humanos relacionadas com o ambiente aquático e com a água de modo geral (ISO 11731:2017).

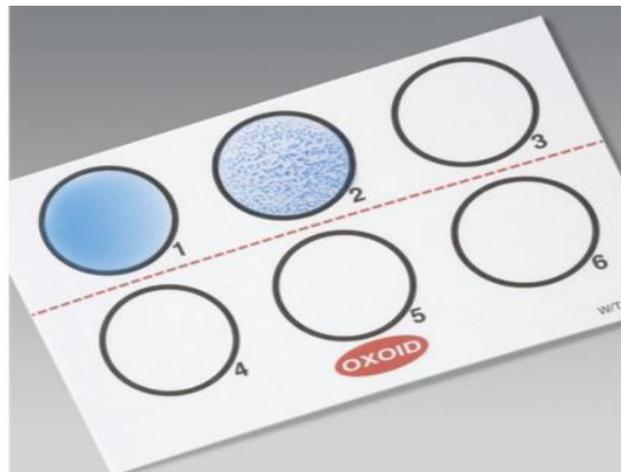
3. O QUE SÃO SOROGRUPOS

Sorogrupo é um conjunto de sorotipos que apresentam um antígeno comum. Sorotipo tange a variabilidade distintas dentro de uma mesma espécie de bactéria que são identificados como um antígeno único, mas que se distinguem por diferirem na resposta a diferentes anticorpos. Dessa forma, podemos ter, por exemplo, a espécie *Legionella pneumophila* que já foram

identificados 15 sorogrupos diferentes, ou seja, sorogrupos de 1 à 15, dentre este sorogrupo, o sorotipo 1 é a variante causadora da doença mais prevalente e é espécie responsável por causar cerca de 90% dos casos da doença. O teste confirmatório para identificação de bactérias do gênero *Legionella*, geralmente é realizado pelo teste de aglutinação, pois essas bactérias são relativamente inertes a muitos testes bioquímicos.

Desse modo, após o resultado presuntivo de colônias típicas de *Legionella*, provenientes de amostras de água e decorrentes do método de cultura, o teste é feito por aglutinação em látex para a identificação dos sorotipos mais frequentes de *Legionella*. O teste utiliza o reagente látex, que de acordo a presença de antígenos da parede celular da *Legionella*, irá ocorrer a aglutinação e assim, identificar a qual sorotipo pertence (Etto, 2009), conforme Figura 01.

Figura 1 – Ilustração do teste da cartela com a aglutinação em látex



Fonte: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0800M#/DR0800M>

4. MODO DE TRANSMISSÃO

A transmissão ocorre através da Inalação de gotículas de água em forma de aerossóis de tamanho respirável oriundas de um sistema de água contaminado pela bactéria *Legionella*, esses aerossóis quando transportados aos pulmões, desencadeiam um processo infeccioso (<https://www.cdc.gov/legionella/about/causes-transmission-sp.html>).

5. FONTES DE CONTAMINAÇÃO

5.1 HABITAT NATURAL

Seu habitat natural são reservas de água encontradas em todo planeta, sob as mais adversas condições naturais, como águas doce (rios e lagos), salobra (ambiente estuarino) e salgada (mares e oceanos), águas subterrâneas (lençóis freáticos), águas residuárias, solos úmidos, além de gotículas de água

dispersas na atmosfera na forma de aerossóis, inclusive em água polar na Antártica. A presença da *Legionella* na Antártica, significa que essas bactérias podem se adaptar a condições extremas e abrir novas possibilidades para o entendimento das estratégias de sobrevivência de *Legionellaceae* mesofílicas que vivem em ambientes antárticos, mas na natureza a concentração dessas bactérias é muito baixa, muitas vezes são até indetectáveis por métodos convencionais, e não são considerados um risco à saúde humana. Entretanto, ao alcançar um sistema artificial de água ela pode encontrar ambientes e condições para um desenvolvimento extremamente rápido e em grandes concentrações, havendo populações dispersas na água bastante variadas de algumas dezenas para dezenas de milhares de ufc/L (Carvalho et al, 2008).

5.2 HABITAT ARTIFICIAL

Vários equipamentos podem produzir e dispersar gotículas de água no ar: torres de resfriamento, piscinas, banheira quente de hidromassagem, fontes decorativas, chuveiros, processos industriais, sistemas de umidificação, ventiladores com aspersão de água, sistemas de combate ao incêndio, entre outros. A *Legionella* possui vida livre na água ou, mais frequentemente, vive em biofilmes que lhe fornecem proteção e nutriente. Além da natureza da água, temperatura e tipo de materiais utilizados na canalização também desempenham um papel importante no seu desenvolvimento. Além disso, protozoários (incluindo as amebas) são os hospedeiros naturais da *Legionella*. O mecanismo utilizado pela *Legionella* ao infectar uma ameba é apontado pelos pesquisadores como sendo o mesmo utilizado para infectar glóbulos brancos humanos e é entendido como a chave para o entendimento da virulência dessa bactéria (Van der Kooij e col. 2005).

6. OS RISCOS DE CONTAMINAÇÃO POR *LEGIONELLA* DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19

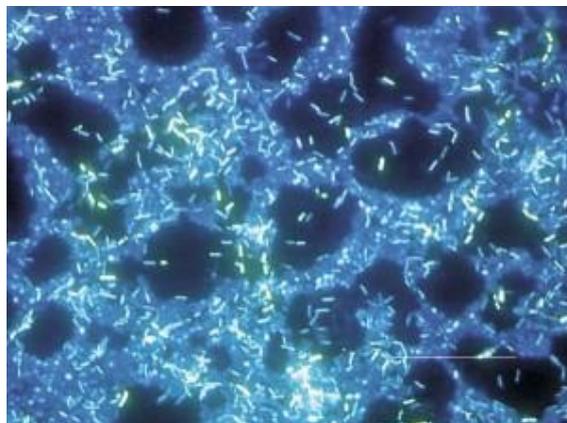
O monitoramento da *Legionella* é importante por razões de saúde pública para identificar fontes ambientais que podem representar um risco de Legionellose, a bactéria pode estar presente nas redes prediais de água quente ou fria dos grandes edifícios, como em hotéis, escritórios, centros comerciais, shoppings, hospitais, entre outros. O monitoramento é importante também para validação de medidas de controle e verificação contínua de que os controles permanecem efetivos (ISO 11731:2017).

Com a pandemia da Covid-19, muitas empresas fecharam durante o surto, como resultado dessa situação, ocorreu o desligamento temporário ou redução da operação de muitas edificações e reduções no uso normal da água, criando assim, um aumento de riscos para o retorno dos ocupantes, pois a água estagnada ou parada em um sistema de encanamento pode aumentar o risco de crescimento e propagação de *Legionella* e outras

bactérias associadas ao biofilme. O biofilme pode ser formado por qualquer microrganismo, como por exemplo, bactérias, fungos, algas, protozoários, entre outros (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/building-water-system.html>).

As populações de *Legionella pneumophila* que crescem em biofilme são mais resistentes a biocidas do que as bactérias da mesma espécie que crescem por si só dentro de um sistema de água. Na ecologia natural desses microrganismos eles se desenvolvem e se reproduzem livremente na água, mas tendem a se depositar de uma forma estável em superfícies. Toda superfície está sujeita a formação de biofilme, principalmente em superfícies mais rugosas ou porosas (Baker 1992).

Figura 2 – Biofilme



Fonte: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063-f3>

7. GERENCIAMENTO DE RISCOS

A ABNT NBR 16824 - **Sistemas de distribuição de água em edificações — Prevenção de legionelose — Princípios gerais e orientações**, estabelece que sistemas de água prediais de edificações industriais, comerciais, de serviços, públicas e residenciais, devem ter um gerenciamento de risco que contemple o APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). Os elementos que devem incluir no APPCC, são:

- ✓ Listar as pessoas que irão compor a equipe responsável pelo APPCC;
- ✓ Descrever o fluxograma do sistema de água e identificar suas partes;
- ✓ Analisar os riscos;
- ✓ Identificar os pontos críticos e estabelecer mecanismos de controle;
- ✓ Estabelecer limites críticos (valores máximos e/ou mínimos de controle de qualidade da água);
- ✓ Estabelecer planos de ações corretivas.

8. SURTOS DE LEGIONELLA NO MUNDO

Os principais surtos ocorridos no mundo estão relacionados com a colonização da bactéria *Legionella* em sistemas de ar condicionado, sobretudo em torres de resfriamento de ar, pois favorecem sua disseminação, principalmente pela formação de aerossóis. Seguem alguns casos:

1976: O primeiro surto catalogado relacionado com a bactéria *Legionella*, foi em uma convenção na Filadélfia, que ficou conhecida como doença dos legionários. Houve um total de 182 casos, com 34 falecidos. A bactéria foi isolada na torre de resfriamento do hotel, que então se espalhou pelo edifício.

2001: O 2º maior surto registrado em números de casos, ocorreu em Múrcia, na Espanha. Foram notificados um total de 449 pessoas infectadas. O fato foi atribuído a uma torre de resfriamento instalada sobre o telhado de um hospital.

2002: Um dos maiores surtos já registrado na história, disponível no site do ECDC (Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças) foi o caso de Barrow, no Reino Unido, que atingiu 494 pessoas, tendo como foco um sistema de ar condicionado.

2004: O caso ocorreu a partir de uma torre de resfriamento contaminada, em uma refinaria na França. Pesquisadores franceses detectaram a *Legionella* em um raio de até 6 quilômetros da refinaria. Esse surto matou 21 das 86 pessoas que tiveram uma infecção e confirmaram em laboratório.

2014: Foram infectadas 375 pessoas em Portugal, com 12 mortos. O surto por *Legionella* foi relacionado com a contaminação das torres de refrigeração de uma empresa Adubos.

2015: Foram infectadas 108 pessoas em New York, com 10 mortos. A bactéria foi encontrada em dez edifícios. E segundo as autoridades de saúde local, as pessoas que adoeceram foram expostas à torres de refrigeração presentes nas coberturas dos prédios.

2017: Na Califórnia, onde está localizado o famoso parque da Walt Disney. No total, foram 22 casos de contágio pela bactéria.

Em 2018 nos Estados Unidos os departamentos de saúde relataram quase 10.000 casos da doença do legionário, porém, como a doença do legionário é provavelmente subdiagnosticada, esse número pode subestimar a verdadeira incidência. Um estudo recente estimou que o número real de casos de doença do legionário pode ser 1,8–2,7 vezes maior do que o relatado (<https://www.cdc.gov/legionella/fastfacts.html>).

Estudos ecológicos e epidemiológicos realizados por alguns autores nos Estados Unidos, relacionaram o aumento do número de casos de legionelose diagnosticados ao aumento do índice pluviométrico, sugerindo uma maior transmissibilidade da bactéria ao homem durante as estações climáticas de períodos chuvosos. (Brooks et al., 2004; Fields, 2002).

No Brasil, foi feita uma estimativa pela Vigilância Municipal de São Paulo, que ocorreram mais de 5.000 mortes por Legionelose no ano de 2013. Dados esses obtidos através de percentual estatístico relacionados a causas de internações por pneumonia no SUS.

9. CAUSA DA DOENÇA

A infecção pela *Legionella* pode apresentar-se em duas formas distintas:

- O mal dos legionários: pneumonia grave, distúrbios digestivos, insuficiência renal e requer tratamento com antibióticos (fatal em até 15% dos casos adquiridos na comunidade e até 50% quando em hospitais);
- Febre Pontiac: similar à gripe com febre muito alta e sintomas similares aos da gripe (Larry, 2020).

10. TÉCNICAS LABORATORIAIS

Em razão de poucos estudos publicados, a incidência deste microrganismo no Brasil pode estar sendo subestimada, uma vez que a literatura tem demonstrado que microrganismos do gênero *Legionella* ocorrem a nível global em diferentes ambientes. Diversos aspectos limitantes estão relacionados a dificuldade do estudo da incidência da bactéria. Um destes motivos são devido aos sintomas clínicos da infecção por *Legionella* spp. serem indistinguíveis dos sintomas provocados por outras causas de pneumonia. Outro fator limitante existente é dificuldade na detecção da bactéria.

a) Método em cultura: É considerado o método de referência para detecção de espécies de *Legionella*, esse método é dito como o padrão ouro, sendo ainda, uma técnica que apresenta maior especificidade para o diagnóstico (Fields et al., 2002).

VANTAGEM

- É possível avaliar um volume maior da amostra e analisar todo conteúdo presente pelo processo de filtração;
- Permite isolar e quantificar as diferentes espécies e estirpes de *Legionella*, possibilitando uma comparação de estirpes clínicas com estirpes ambientais;

- Possui uma sensibilidade próxima de 60% e a especificidade de 100% (Ferreira, 2019).

DESVANTAGEM

- Demora cerca de 12 dias para ter um resultado, e em casos de surtos, demora-se muito para tomar uma ação;
- Se a amostra não for analisada dentro do prazo preconizado pelas normas, pode ocorrer falta de nutrientes e perda de viabilidade de bactérias;
- Apenas são recuperadas as bactérias viáveis e cultiváveis;
- É um método complexo e exigente em tempo, meios de cultura, reagentes e experiência técnica (Ferreira, 2019).

b) Kit rápido - técnica do Número Mais Provável (MPN) - Legiolert

Legiolert é um método de cultura alternativo, que utiliza uma tecnologia de detecção de enzimas que identifica apenas a *Legionella pneumophila* em amostras de água, que quando presentes, muda a coloração da água para um tom acastanhado. Neste substrato as células bacterianas crescem rapidamente e reproduzem-se através de suplementos ricos em aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes (Rech et al., (2018).

VANTAGEM

- O uso do kit permite a redução do fluxo de trabalho do laboratório;
- Resultado é em até 7 dias de incubação e não requer outros passos de confirmação;
- apresenta-se como um ensaio robusto à interferência de outros microrganismo.

DESVANTAGEM

- O teste precisa ser realizado em cartelas, pois tem a necessidade de uma área superficial grande para troca com oxigênio, o que pode encarecer o teste;
- Identifica apenas *Legionella pneumophila*.

c) Técnica de Dispositivo móvel de PCR em tempo real

Seu princípio se baseia na duplicação de cadeias de DNA "in vitro" que pode ser repetida diversas vezes, gerando quantidade de DNA suficiente para realizar diversas análises.

VANTAGEM

- Detecta as bactérias viáveis não cultiváveis;

- Capacidade de resposta em poucas horas;
- Por quantificar DNA bacteriano presente na amostra, pode ser útil nas investigações de potenciais fontes de infecção, permitindo rapidamente efetuar ações corretivas.

DESVANTAGEM

Todos os métodos moleculares para medir *Legionella* em amostras de água sofrem duas limitações críticas:

- Incapacidade de diferenciar *Legionella* viável de não viável;
- Não é possível enumeração de células viáveis por unidade de volume de amostra;
- Elevado custo inicial do equipamento e reagentes necessários para a amplificação.
- Em amostras coletadas após desinfecção pode haver dificuldade na amplificação do DNA;
- Não existência de correlação entre UG (Unidades Genômicas) e UFC (Unidades formadoras de colônias), dificultando assim a interpretação dos resultados obtidos (Rodrigues, R. 2017 e Vital, 2019).

11. DIAGNÓSTICO

Depois de um período prolongado de inatividade de um edifício, deve-se verificar se há riscos para o desenvolvimento de *Legionella*, um “período prolongado” pode ser de semanas ou meses, dependendo de fatores específicos do encanamento, resíduos de desinfetantes, pontos de ajuste de temperatura do aquecedor de água, padrões de uso de água e colonização preexistente de *Legionella*.

No Brasil a Legionelose não é uma doença notificada. As análises clínicas são realizadas em poucos hospitais e seus resultados não são oficiais, além disso, existe uma dificuldade no correto diagnóstico da doença, pois infelizmente tem uma carência de profissionais treinados para realização dos testes. Desta forma, o levantamento estatístico da doença na maioria das vezes o doente é diagnosticado como se estivesse com pneumonia comum, já que os sintomas das duas doenças são bem parecidos. Esse fato, é uma realidade até mesmo para países que possuem tradição e pioneirismo no diagnóstico da doença dos legionários como por exemplo, os EUA e a Inglaterra. Assim sendo, o paciente diagnosticado erroneamente, não raro, pode vir a óbito, somando-se às estatísticas das mortes causadas pela pneumonia comum. Quanto à Febre PONTIAC, a situação é ainda mais complicada, pois como os sintomas são bem semelhantes a uma forte gripe, praticamente todos os casos passam despercebidos.

Desta forma, é preciso ter cautela na análise de dados estatísticos que propõem retratar as infecções causadas pela *Legionella*, normalmente qualquer número apresentado é sempre abaixo dos valores reais. A própria Organização Mundial da Saúde (OMS) adverte que é desconhecido o número de pessoas que se infectam a cada ano com a *Legionella*.

12. RESULTADOS POSITIVOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES FONTES DE ÁGUA DE REGIÕES BRASILEIRAS

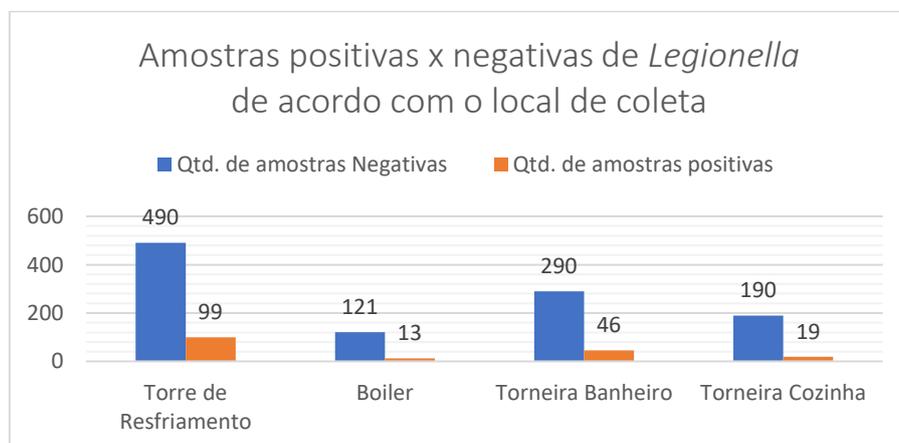
As amostras de água foram retiradas das fontes de água indicadas na Tabela 1, entre janeiro de 2021 e maio de 2021. As amostras foram coletadas em frascos de polipropileno estéreis com tiosulfato de sódio 0,1 M para neutralizar o cloro livre residual nas amostras, com volume de 500 mL. As amostras foram analisadas pelo método de cultura conforme preconiza a norma ISO 11731 - Water quality — Enumeration of *Legionella* Second edition.

Tabela 1 – Presença da bactéria *Legionella* em diferentes sistemas

Local de coleta	Qtd. de amostras Negativas	Qtd. de amostras positivas	%
Torre de Resfriamento	490	99	20,20%
Boiler	121	13	10,74%
Torneira Banheiro	290	46	15,86%
Torneira Cozinha	190	19	10,00%
TOTAL	1091	177	16,22%

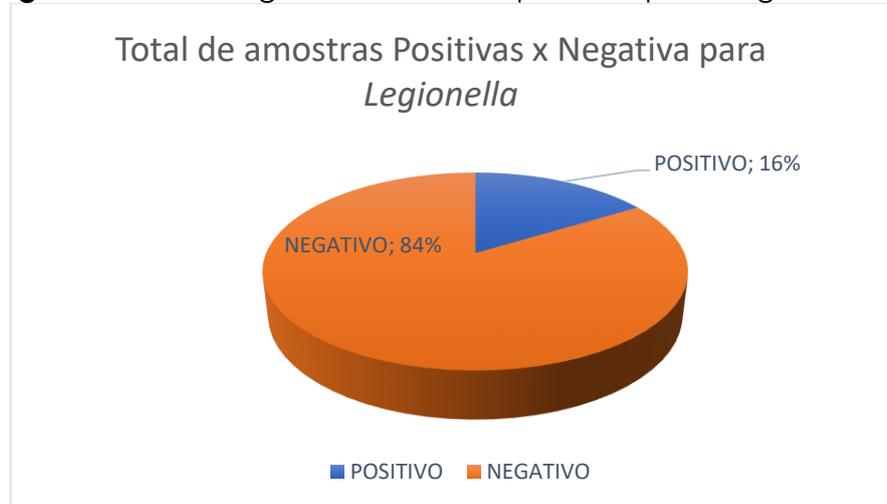
Das 611 amostras de água coletadas de sistemas de ar condicionado (Torre de resfriamento e Boiler), 20,20% apresentaram resultados positivos para a presença de *Legionella* sp., as demais amostras foram coletadas em torneiras de banheiro e cozinha (480 amostras - água potável), resultando em 25,86% das amostras positivas. A figura 02 ilustra os resultados obtidos na análise das amostras de água obtidas, segundo o ponto de coleta.

Figura 2: Amostras Negativas x Positivas de *Legionella*.



No total foram analisadas 1091 amostras de água, e cento e setenta e sete (16%) das amostras foram positivas para a bactéria *Legionella*, conforme ilustrado na figura 3.

Figura 3: Porcentagem de amostras positivas para *Legionella* sp.



13. CONCLUSÃO

O desenvolvimento contínuo de sistemas e equipamentos de água, geradores de aerossóis provocam o crescimento de infecções causadas pelas bactérias patogênicas do gênero *Legionella* que, se inaladas podem causar a chamada “Doença dos Legionários”, estabelecendo, assim, um problema de saúde pública. As evidências dos riscos da contaminação por *Legionella* em sistemas com água parada, em função do reflexo da pandemia do Covid-19, devido boa parte das edificações ficaram por longos períodos com seus sistemas de ar condicionado desligados e com água estagnada, é de suma importância fazer um bom plano de segurança da água conforme previsto na norma **ABNT NBR 16824 - Sistemas de distribuição de água em edificações - Prevenção de legionelose - Princípios gerais e orientações**, somente assim, os ocupantes dessas edificações terão maior tranquilidade em retornar as suas atividades com segurança. Dentro da avaliação de risco é muito importante selecionar o método que mais se adequa as necessidades do plano. No entanto, estudos comparativos relacionados ao uso de diferentes métodos de isolamento e identificação, realizados por distintos grupos de pesquisa em todo mundo, tem consentido para a mesma opinião: que as metodologias se complementam. Assim, a utilização de técnicas presuntivas e confirmativas está diretamente relacionada à maior sensibilidade e especificidade na detecção de microrganismos do gênero *Legionella*.

13. BIBLIOGRAFIA

ABNT NBR 16824 - **Sistemas de distribuição de água em edificações — Prevenção de legionelose — Princípios gerais e orientações**, 2020

Barker Jet al. **Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation**. Applied and Environmental Microbiology; 58: 2420-2425, 1992.

Brooks T; Osicki RA; Springthorpe VS; Sattar SA; Filion L; Abrial D; Riffard S. **Detection and identification of Legionella species from groundwater**. J. Toxicol. Environ. Health 67, 2004.

Carvalho, FRS et al. **Occurrence and diversity of Legionellaceae in polar lakes of the Antarctic península**, 2008-06.

Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças – **ECDC**, Acesso em: 01 de julho de 2021.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC,. **Fast Facts**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/legionella/fastfacts.html>. Acesso em: 26 de maio de 2021.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC,. **Guidance for Reopening Buildings After Prolonged Shutdown or Reduced Operation**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/building-water-system.html>. Acesso em: 20 de maio de 2021.

Etto, Y, H. **Detecção de bactérias do gênero Legionella em amostras de água provenientes de sistemas de ar condicionado**. Tese de mestrado na Faculdade de Saúde Pública-USP, 2009.

Ferreira, F., C. **Amostragem e Análises laboratoriais de Legionella em sistemas de água-Métodos disponíveis, vantagens e inconvenientes**. Workshop: Prevenção e 40 Controlo de Legionella nos Sistemas de Água. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IPQ. Acedido a Maio 10, 2019.

Fields, B., S., Benson, R., F., Besser, R., E. (2002). **Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation**. *Clinical microbiology reviews*, 15(3):506-26, 2002.

ISO 11731 - **Water quality — Enumeration of Legionella Second edition**. Genebra, Suíça, 2017- 05

Larry M. Bush , MD, FACP, Charles E. Schmidt College of Medicine, **Legionnaires' Disease**. Florida Atlantic University - Última revisão/alteração completa fev 2020| Última modificação do conteúdo fev 2020

Rech, M. M., Swalla, B. M., & Dobranic, J. K. **Evaluation of Legiolert for Quantification of Legionella pneumophila from Non-potable Water.** Current microbiology, 75(10), 1282-1289, 2018.

Rodrigues, R. **Análises laboratoriais de água: métodos disponíveis, vantagens e inconvenientes.** In Workshop "Prevenção e Controlo de Legionella nos Sistemas de Água", Comissão Setorial para a Água/Instituto Português da Qualidade, 11 maio 2017.

Van Der Kooji D., Harm R. Veenendaal. H. Scheffer. **Biofilm Formation and multiplication of Legionella in a model warn water system with pipers of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene.** Water Res. 2005

Vital, I, F, D. **Deteção, identificação e quantificação de Legionella spp. em amostras de comparação da técnica de PCR-RT com o Método Cultural,** Coimbra, 2019.