

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Dândrea Driely de Melo Ferrari

Identificação molecular de amostras de *Legionella pneumophila* provenientes de fontes ambientais.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador (es): Prof. Dr. Philip Noel Suffys
Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes

RIO DE JANEIRO

2021

de Melo Ferrari, Dândrea Driely.

Identificação molecular de amostras de *Legionella pneumophila* provenientes de fontes ambientais / Dândrea Driely de Melo Ferrari. - Rio de Janeiro, 2021.

86 f.

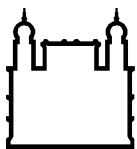
Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Harrison Magdinier Gomes.

Orientador: Philip Noel Suffys.

Bibliografia: f. 80-86

1. *Legionella* . 2. Sequence-based Typing. 3. *L. pneumophila*. 4. Fontes ambientais. 5. Doença dos Legionários. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Dândrea Driely de Melo Ferrari

Identificação molecular de amostras de *Legionella pneumophila* provenientes de fontes ambientais

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Philip Noel Suffys

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes

Aprovada em: 12 / 03 / 2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome – Ana Paula D'alincourt Carvalho Assef / Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Nome – Wim M. S. Degrave / Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Nome – Douglas McIntosh / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Nome – Adriana M. Vivoni / Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Nome – Flavio Alves Lara / Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 12 de março de 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sandra Melo e Jesiel C. Alves, que com muito amor sempre me incentivaram e me apoiaram. Agradeço imensamente pois sem eles não teria chegado até aqui.

Aos meus orientadores Harrison M. Gomes e Philip N. Suffys pelo apoio durante o projeto e pela gentileza com que me trataram nesse processo.

Às mulheres do LABMAM, Márcia, Raquel, Viviane, Yrneh, Sidra, Maria Carolina, Cecília e Vitória por tudo que me ensinaram e pela companhia nos dias mais difíceis e nos mais alegres também.

À Emilyn Costa pelo auxílio na montagem e análise dos genomas.

À Solange Lima e a Conforlab Engenharia Ambiental por fornecer todas as amostras do presente estudo.

À CAPES pelo financiamento.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O gênero <i>Legionella</i> spp.....	13
1.2. Características morfológicas de <i>L. pneumophila</i>	14
1.3. Características genômicas de <i>L. pneumophila</i>	16
1.4. <i>Legionella</i> spp. em ambientes artificiais	16
1.5. Relação com protozoários e ciclo de vida intracelular	18
1.6. Doença dos Legionários e Febre Pontiac.....	20
1.7. Diagnóstico da Doença dos Legionários	22
1.8. O tratamento das legioneloses.....	25
1.9. Resistência aos antimicrobianos em <i>L. pneumophila</i>	26
1.10. Epidemiologia	28
1.11. Identificação molecular por <i>Sequence-Based Typing</i>	30
1.12. <i>Whole Genome Sequencing</i> (WGS).....	32
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Isolados de <i>Legionella</i> spp.	35
3.2. Criopreservação	36
3.3. Extração de DNA.....	41

3.4.	Identificação molecular – <i>Sequence-Based Typing</i>	41
3.6.	Sequenciamento do genoma completo	44
4.	RESULTADOS	48
4.1.	Amostras de <i>Legionella</i> spp.	48
4.2.	Extração de DNA	49
4.3.	Amplificação primária	50
4.4.	Sequenciamento parcial	54
4.5.	<i>Sequence Quality Tool</i>	56
4.7.	Sequenciamento genômico	65
5.	DISCUSSÃO	69
6.	CONCLUSÃO	78
7.	PERSPECTIVAS	79
8.	REFERÊNCIAS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DL	Doença dos Legionários
Lp	<i>Legionella pneumophila</i>
BCYE	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
VMNC	Viável mas não cultivável
MBL	Lectina ligadora de manose
RE	Retículo endoplasmático
FP	Febre Pontiac
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
TAU	Teste do antígeno urinário
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SG-1	Sorogrupo 1
IFD	Imunofluorescência direta
CMI	Concentração mínima inibitória
ST	<i>Sequence Type</i>
SBT	Sequence-based Typing
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ESGLI	<i>European Study Group for Legionella Infections</i>

EWGLI	<i>European Working Group for Legionella Infections</i>
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
GVPC	Glicina, vancomicina, polimixina B e cicloheximida
LLAP	<i>Legionella-like amoebal pathogens</i>

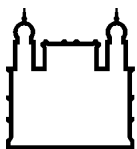
LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Pleomorfismo da <i>L. pneumophila</i> por Katz <i>et al.</i> (1984).....	14
Figura 1.2. <i>L. pneumophila</i> em meio de cultura BCYE.....	15
Figura 1.3. O ciclo de vida intracelular da <i>L. pneumophila</i> em células eucarióticas.....	20
Figura 1.4. Mapa de incidência das legioneloses em países com notificação obrigatória.....	29
Figura 1.5. Combinação alélica que resulta no ST1.....	31
Figura 3.1. Etapas da análise de Bioinformática para dois genomas de <i>Legionella</i> spp.....	47
Figura 4.1. Amostras de <i>Legionella</i> spp. cultivados em meio BCYE.....	49
Figura 4.2. Concentração do DNA bacteriano e o número de colônias de cada amostra.....	50
Figura 4.3. Correlação entre o número de colônias e a concentração do DNA bacteriano obtido.....	50
Figura 4.4. Padronização da PCR, utilizando a cepa de <i>Lp</i> ATCC 33152, para amplificação dos sete alvos relacionados à identificação molecular de <i>Lp</i> – Gel de agarose 1,5%.....	50
Figura 4.5. Análise da amplificação dos genes (a) <i>flaA</i> e (b) <i>mip</i> – Gel de agarose 1,5% em TAE 1X, corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml.....	52
Figura 4.6. Cromatograma do sequenciamento da fita <i>reverse</i> do gene <i>asd</i> (amostra 37064).....	55
Figura 4.7. Cromatograma do sequenciamento da fita (A) <i>foward</i> do gene <i>asd</i> (amostra 37064) e (B) da fita <i>reserve</i> do gene <i>asd</i> (amostra 65699).....	55
Figura 4.8. Avaliação da qualidade das sequências e identificação do perfil alélico pelo software <i>Sequence Quality Tool</i>	56
Figura 4.9. Gráfico da frequência dos STs identificados nas amostras ambientais brasileiras.....	58
Figura 4.10. Resultado do agrupamento de dados obtidos pela análise SBT.....	63

Figura 4.11. <i>Minimum Spanning Tree</i> baseado nos STs encontrados (a) e baseada nos estados de origem dos STs identificados.....	65
Figura 4.12. Visualização gráfica da qualidade das <i>reads</i> sequenciadas para os isolados 20935 e 37063.....	66
Figura 4.13. <i>Blast</i> da região 16S rRNA da amostra 37063 apresentando similaridade de 98,45% com a espécie <i>L. anisa</i>	67
Figura 4.14. <i>Blast</i> da região 16S rRNA da amostra 20935 apresentando similaridade de 100% com a espécie <i>Lp</i>	68
Figura 4.15. Representação gráfica dos genomas das amostras 20935 e 37063 utilizando o programa Bionumerics.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Testes diagnóstico para a Doença dos Legionários.....	23
Tabela 3.1. Relação do número de amostras (N) por estado e região.....	36
Tabela 3.2. Isolados de <i>Legionella</i> spp. fornecidos pela Conforlab.....	38
Tabela 3.3. <i>Primers</i> utilizados para a SBT.....	42
Tabela 3.4. <i>Primer</i> utilizado para o sequenciamento de <i>mompS reverse</i>	43
Tabela 4.1. Amplificação primária dos genes analisados na tipagem molecular de <i>Lp</i>	53
Tabela 4.2. <i>Sequence Type</i> dos isolados identificados pela SBT e origem das amostras.....	57
Tabela 4.3. Análise pelo <i>Sequence Quality Tool</i> e a <i>Sequence Type</i> (ST) de cada amostra.....	60
Tabela 4.4. Resultado da montagem <i>de novo</i> por <i>Unicycler</i> após avaliação por <i>Quast</i>	66
Tabela 4.5. Características da anotação das amostras.....	67
Tabela 4.6. Variantes descritas pelo programa <i>Snippy</i>	68



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

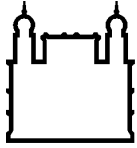
Identificação molecular de amostras de *L. pneumophila* provenientes de fontes ambientais

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dândrea Driely de Melo Ferrari

Legionella pneumophila (*Lp*) é uma bactéria Gram negativa encontrada em ambientes aquáticos naturais e artificiais nos quais a inalação de aerossóis contaminados pode causar uma pneumonia severa conhecida como Doença dos Legionários com taxa de mortalidade de 10% em indivíduos saudáveis. No Brasil há poucas informações a respeito deste patógeno, mas sabe-se que a Pneumonia Adquirida na Comunidade foi responsável por 598.668 hospitalizações e 52.776 mortes só no ano de 2017 e acredita-se que uma porcentagem significativa desses casos seja causada pela *Lp*. Além disso, os casos de legioneloses vêm crescendo ao redor do mundo e um dos fatores associados a isto é o aumento de sistemas artificiais de água e da exposição humana a fontes contaminadas. A única forma de prevenir a doença dos legionários é pelo controle e tratamento destes ambientes artificiais, especialmente aqueles em grandes edifícios. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar amostras de *Legionella* spp. provenientes de fontes ambientais previamente identificadas pela Conforlab. O estudo contou com 50 amostras de *Legionella* spp. isoladas em meio BCYE a partir de diversas fontes ambientais em nove estados brasileiros fornecidas pela empresa Conforlab. A identificação molecular das amostras foi realizada pela técnica *Sequence-based Typing* que consiste no sequenciamento e análise de sete genes para a obtenção de um *Sequence Type* (ST). As amostras foram obtidas de amostras provenientes de hotéis, centros comerciais, laboratórios, empresa e indústria. Cerca de 70% das amostras são da região sudeste do país e 50% do estado de São Paulo. Foram identificados 11 STs entre 34 amostras, dos quais oito são previamente descritos e três STs novos (ST2960, ST2962 e ST2963). Dois complexos clonais foram identificados CC-ST1 e CC-ST1642. O novo ST2960 foi identificado em quatro diferentes torres de resfriamento. O sequenciamento genômico foi realizado em duas amostras de *Legionella* spp. no qual a sequência da amostra 20935 corresponde a espécie *Lp* enquanto o outro genoma apresentou maior similaridade com a espécie *Legionella anisa*, sendo essa a segunda espécie do gênero mais encontrada em amostras de água. Como esperado ST1 foi prevalente, pois é amplamente distribuído na maioria dos países, e os outros STs previamente descritos estão associados às legioneloses em outros países. Dado o grande número de casos de pneumonia anualmente, estima-se que ocorra no Brasil cerca de seis mil óbitos por ano devido à doença dos legionários. Portanto, é necessário que medidas de vigilância e controle da presença de *Legionella* spp. sejam implementadas, além da realização de mais estudos para a maior compreensão deste patógeno no país.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Molecular identification of *L. pneumophila* isolates from environmental source

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dândrea Driely de Melo Ferrari

Legionella pneumophila (Lp) is a Gram negative bacterium found in natural and artificial aquatic environments in which the inhalation of contaminated aerosols can cause severe pneumonia known as Legionnaires' Disease, which presents a mortality rate of 10% in healthy individuals. In Brazil there is little information about this pathogen, but it is known that Community Acquired Pneumonia was responsible for 598,668 hospitalizations and 52,776 deaths in 2017 alone and it is believed that a significant percentage of these cases is caused by Lp. In addition, cases of legionellosis have been growing around the world and one of the factors associated with this is the increase in artificial water systems and human exposure to contaminated sources. The only way to prevent legionnaires' disease is by controlling and treating these artificial environments, especially those in large buildings. Therefore, the objective of this study was to identify and characterize samples of *Legionella* spp. from environmental sources. The study included 50 samples of *Legionella* spp. isolated in BCYE medium from several environmental sources in nine Brazilian states provided by the company Conforlab. The molecular identification of the samples was carried out using the Sequence-based Typing technique, which consists of sequencing and analysis of seven genes to obtain a Sequence Type (ST). Isolates were obtained from samples coming from hotels, shopping centers, laboratories, company and industry. About 70% of the samples are from the southeastern region of the country and 50% from the state of São Paulo. 11 STs were identified among 34 isolates, of which eight are previously described and three were new STs (ST2960, ST2962 and ST2963). Two clonal complexes were identified by the MST: CC-ST1 and CC-ST1642. The new ST2960 has been identified in four different cooling towers. Genomic sequencing was performed on two samples of *Legionella* spp. Between the two completely sequenced isolates one (20935) corresponded to the species Lp while the other genome showed greater similarity with the species *Legionella anisa*, this being the second species of the genus most found in water samples. As expected, ST1 was prevalent, as it is widely distributed in most countries, in addition to being related to most cases of LD. The other STs previously described are associated with legionellosis in other countries, reinforcing the clinical importance of these samples. Given the large number of pneumonia cases annually, it is estimated that approximately six thousand deaths occur in Brazil each year due to legionnaires' disease. Therefore, implementation of surveillance and control measures of *Legionella* spp. is necessary. In addition further studies are needed in order to better understand this pathogen in the country.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Legionella* spp.

Em 1976 ocorreu um surto de uma doença respiratória de origem desconhecida durante a Convenção Americana dos Legionários, na Filadélfia – EUA. Neste evento, 211 pessoas foram contaminadas e 34 morreram devido à uma doença pneumônica que, posteriormente, ficou conhecida como a Doença dos Legionários (DL). Meses depois, após diversas análises do material proveniente do tecido pulmonar de um paciente infectado, incluindo cultivo em 14 meios de cultura diferentes e em 13 culturas de células hospedeiras e exposição de cobaia (*Cavia porcellus*), o microbiologista Joseph McDade identificou um novo gênero bacteriano. Este novo gênero de bactérias foi então nomeado como *Legionella*. Após esta descoberta, as investigações concluíram que esta bactéria estava presente no sistema de ar condicionado do hotel que hospedou os participantes da convenção, originando assim o surto (1,2).

O gênero *Legionella* é composto por bactérias aeróbias, gram-negativas, flageladas e não formadoras de esporo, transmitidas pela água. Vive em ambientes de água doce, incluindo rios, riachos, lagos, fontes termais, águas subterrâneas e até mesmo no solo (1). Também são encontradas em ambientes artificiais, como: chuveiros, torneiras, fontes decorativas, máquinas de gelo, dispositivos médicos, ar condicionado, sistemas de água quente e torres de resfriamento, sendo os dois últimos as principais fontes de transmissão da Doença dos Legionários (3).

O gênero abriga 59 espécies, três subespécies e mais de 70 sorogrupos, formando o único gênero da família *Legionellaceae*. A relação filogenética entre essas espécies é pouco conhecida pois os estudos são escassos e baseados em apenas um, ou poucos genes. Porém, a atual acessibilidade ao sequenciamento de genomas permitiu a construção filogenética de 38 espécies de *Legionella* spp. a partir do alinhamento concatenado de 78 proteínas. Como resultado, o gênero foi dividido em 3 clados: o clado mais antigo contendo *L. hackeliae*, *L. lansingensis* e *L. micdadei*; um segundo clado formado pelas principais espécies patogênicas *L. pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. bozemanii* e *L. dumoffi*; e um terceiro clado de ramificação profunda constituído pelas espécies *L. oakridgensis*, *L. londiniensis* e *L. adelaidensis* (4).

Embora todas as espécies de *Legionella* tenham potencial patogênico, as espécies *L. pneumophila* (*Lp*), *L. micdadei*, *L. bozemanae*, *L. dumoffii*, e *L. longbeachae* são as que estão mais frequentemente associadas às doenças humanas, especialmente nos quadros de infecções respiratórias como a DL. E destas, a *L. pneumophila*, além de ser a espécie mais estudada, é também a responsável pela maioria dos casos de legioneloses no mundo (cerca de 90%) (5). Ainda que *Lp* tenha 16 sorogrupos, o sorogrupo 1 (SG-1) está associado à mais de 80% dos casos, seguido dos sorogrupos 4 e 6 (6,7).

1.2. Características morfológicas de *L. pneumophila*

Legionella pneumophila é uma bactéria fastidiosa, formadora de biofilmes, oportunista e intracelular facultativa, pois, além de viver em comunidades de biofilmes, também é encontrada principalmente no interior de protozoários e, secundariamente, de forma autônoma e livre no ambiente. *Lp* sobrevive e é capaz de se multiplicar em temperaturas menores que 20°C e maiores que 55°C, embora sua faixa de crescimento ótima seja entre 25°C e 37°C. A temperatura, assim como a disponibilidade de nutrientes e metabólitos, pode influenciar na forma como esta bactéria se apresenta. Por se tratar de uma bactéria pleomórfica, ela pode apresentar formas cocóides, bacilares (0,3 a 0,6 µm por 3 µm) e filamentosas longas (8 a 50 µm) como mostram as figuras a seguir (Figura 1.1) (1,8).

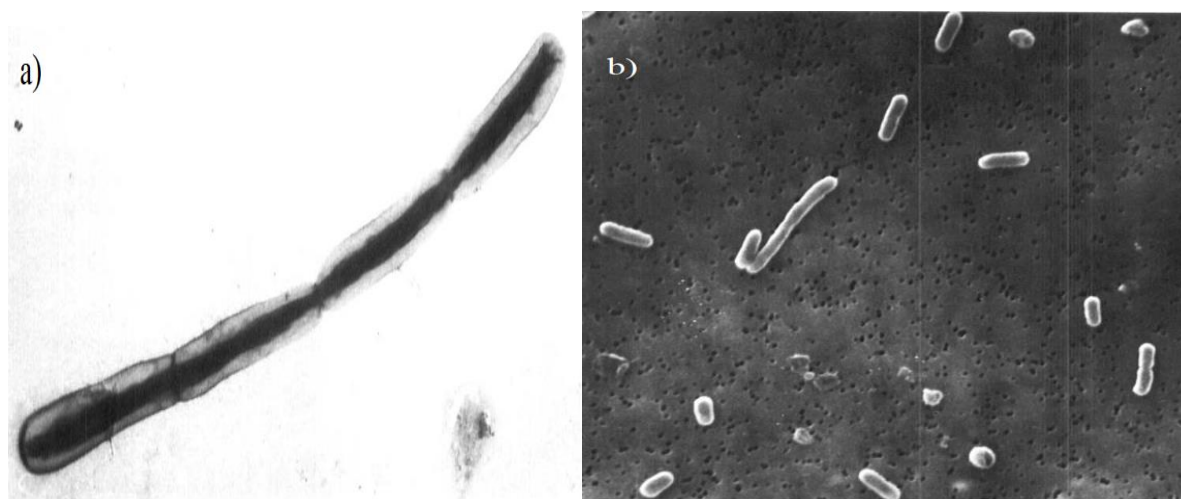


Figura 1.1. Pleomorfismo de *L. pneumophila* por Katz *et al.* (1984). a) *Lp* na forma filamentososa, composta por quatro bactérias aderentes. (Coloração negativa, X 15.200). b) *Lp* nas formas cocóide, cocobacilar, bacilar curto e bacilar longo. (Microscopia eletrônica de varredura, X4200).

Embora estas bactérias já tenham sido isoladas em ambientes polimicrobianos com baixa disponibilidade nutricional e alta competição, seu crescimento *in vitro* contradiz esses achados, pois, seu cultivo em laboratório é bastante complexo. Os isolados de *Legionella* spp. são cultivados em meio específico BCYE – Ágar (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) no qual a presença da L-cisteína é essencial para o seu desenvolvimento, enquanto o pirofosfato férrico, um suplemento de ferro, e o estimulante de crescimento alfa-cetoglutarato são incorporados ao meio para atender às suas necessidades nutricionais (9).

Além de um meio de cultura nutritivo, também é aconselhável que um conjunto de antibióticos seja adicionado ao meio para evitar a contaminação com fungos e bactérias que podem inibir o crescimento de *Legionella*. E, por fim, a estufa deve manter um ambiente úmido, com temperatura de 35°C e conter entre 2 a 5% de CO₂. Em cultura, as colônias jovens têm diâmetro de 0,5 a 1,0 mm, são lisas com uma aparência típica de vidro moído e um tom cintilante. As colônias mais antigas se mostram achatadas e opacas, com um centro branco e margens opalescentes mal definidas, como pode ser observado nas imagens abaixo (Figura 1.2) (5).

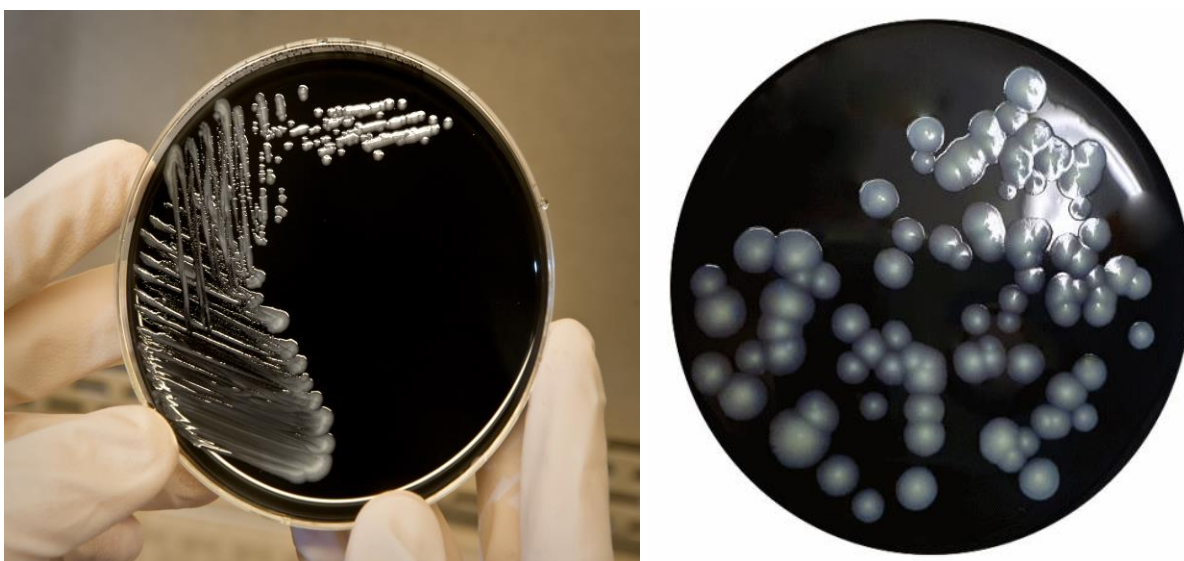


Figura 1.2. *L. pneumophila* em meio de cultura BCYE. A primeira imagem representa as colônias mais jovens enquanto a segunda apresenta colônias mais antigas. Fonte: CDC – EUA (2018) e *Rapid Microbiology* (2020), respectivamente.

1.3. Características genômicas de *L. pneumophila*

O genoma da *Lp* é formado por um único cromossomo com cerca de 3,36 Mb com conteúdo GC de 38,5%, 2900 genes codificadores e pode incluir um plasmídeo entre 60 e 150 kb. O genoma da *Lp* é dinâmico, marcado por várias ilhas de patogenicidade e possui elementos genéticos móveis que podem facilitar a transferência de genes e permitir um potencial adaptação ambiental. Os eventos de recombinação e transferência horizontal são os principais fatores na modelagem dos genomas altamente dinâmicos da *Lp* (10).

As ilhas de patogenicidade incluem elementos conjugativos integrativos que codificam o sistema de secreção Dot/Icm (T4ASS e T4BSS), sendo este o principal fator de virulência da *Lp*. Esse sistema está envolvido na entrada da *Lp* no hospedeiro, no atraso na acidificação de fagossomos e multiplicação intracelular, mecanismos essenciais para a transição de uma bactéria ambiental para um patógeno humano. Outro fator interessante, porém pouco conhecido, é a presença de repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas (CRISPR-Cas2). Sabe-se que esse sistema é requerido para a infecção intracelular em amebas, mas pouco se sabe sobre esse sistema na regulação da virulência em humanos (10,11).

Sendo assim, cada cepa de *Lp* possui seu próprio mosaico genômico exclusivo, resultante do contexto ambiental no qual está inserida e das suas necessidades adaptativas para infectar um hospedeiro, ou persistir no ambiente (11).

1.4. *Legionella* spp. em ambientes artificiais

Apesar das *Legionellas* serem encontradas tanto em ambientes naturais quanto artificiais, os surtos de legioneloses estão associados principalmente aos ambientes artificiais devido às condições favoráveis para a colonização por *Legionella* que esses locais apresentam, como: temperaturas entre 25 e 42°C, zonas de estagnação, contaminação orgânica (derivada dos materiais em decomposição) e presença de protozoários, hospedeiros naturais de *Legionella* (12).

Estes aspectos facilitam a formação de biofilmes (5), enquanto a capacidade de gerar e dispersar aerossóis de algumas destas fontes resulta na disseminação da DL, como é o caso das torres de resfriamento (TDR), por exemplo, que podem espalhar seus aerossóis por até 6

km de distância (13). As TDR utilizam a água para refrigerar processos industriais e em sistemas centrais de ar condicionado, tornando o equipamento úmido e com temperaturas entre 30°C a 45°C. Estes fatores somados a estagnação permitem a colonização por *Legionellas* que posteriormente são transmitidas aos seres humanos pelo espalhamento dos aerossóis formados pelo equipamento.

O ambiente no qual as *Legionellas* vivem oferece uma condição especial para a modelagem do genoma pois é através da interação com outras espécies bacterianas que ocorrem os eventos de transferência horizontal de genes (11). Em contrapartida, a formação de biofilmes, bem como a relação parasitária com as amebas, leva à uma baixa taxa de mutação e, conseqüentemente, alta conservação genômica (14). Já a presença de antibióticos nos sistemas hídricos ambientais secretados por outras bactérias/fungos ou derivados de práticas médicas e veterinárias pode promover a evolução de mecanismos de resistência antimicrobiana. (7)

Um estudo realizado em 2019 por Sharaby *et al.* (15) demonstrou que isolados de *Lp* de um mesmo sistema de água potável podem apresentar linhagens distintas em termos de suscetibilidade aos antimicrobianos e características fisiológicas, além de uma alta variabilidade genotípica. Isto demonstra que as pequenas variações que ocorrem dentro de um mesmo ambiente podem induzir a diversidade entre as linhagens bacterianas.

O padrão ouro para detectar a presença de *Legionella* spp. no ambiente ainda é o isolamento em meio de cultura seletivo (BCYE). Entretanto, sua principal desvantagem é que esta técnica não é capaz de identificar as células viáveis mas não-cultiváveis (VMNC), que podem representar até 71% do total de células. Apesar das bactérias perderem sua capacidade de multiplicação neste estado, elas não se tornam metabolicamente inertes, podendo ainda sintetizar proteínas, apresentar uma baixa atividade fisiológica e infectar tanto protozoários quanto macrófagos. (13)

A descontaminação do sistema de água se dá por métodos físicos ou químicos. O tratamento físico nada mais é do que uma reação de choque térmico no qual a temperatura da água é elevada a 70°C durante 30 minutos. Já o tratamento químico utiliza soluções biodispersantes e/ou biocidas como a hiper cloração do ambiente. Em ambas as tentativas de descontaminação, as células estão expostas a fatores adversos e limitação de nutrientes, induzindo a diferenciação da bactéria a um estado de dormência (VMNC) como forma de sobrevivência. Portanto, a análise e coleta de amostras logo após o tratamento da água podem

induzir um resultado falso-negativo, permitindo a recolonização por *Legionellas* posteriormente (3).

Sendo assim, a manutenção dos sistemas de distribuição de água torna-se um problema de saúde pública (13) pois, identificar *Legionella* spp. em fontes artificiais de água permite estabelecer a origem de um surto, assim como implementar medidas de descontaminação do local para impedir que aerossóis contaminados possam infectar outras pessoas. Além disso, a manutenção periódica desses ambientes evita a formação de biofilmes, que uma vez estabelecidos, sua eliminação se torna ainda mais complexa.

1.5. Relação com protozoários e ciclo de vida intracelular

Como mencionado anteriormente, os isolados de *Legionella* spp. são formadores de biofilme e esta é uma das principais formas desta bactéria persistir no ambiente. Entretanto, a presença dos protozoários dos gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* e *Tetrahymena* também representam um fator importante para a permanência da bactéria no ambiente.

Além destas amebas de água doce consumirem naturalmente parte dos biofilmes no seu estágio planctônico móvel, todas as *Legionellas* são capazes de infectar protozoários e, assim, utilizam estes microrganismos como forma de proteção. Isto acontece principalmente quando estas bactérias são submetidas a condições ambientais adversas, como a tentativa de descontaminação da água com biocidas ou choque térmico. Esta associação com protozoários, seja na forma cística ou vegetativa, induz a formação de fenótipos virulentos e fornece proteção contra bactericidas, além de fornecer nutrientes que permitem seu crescimento e replicação. (1,12)

Esta interação entre a bactéria e uma célula protista é a chave para compreender a capacidade do patógeno penetrar e infectar macrófagos alveolares humanos, pois, quando ocorre a DL, o ciclo de vida intracelular da *Lp* é semelhante em ambas as células e consta de quatro etapas.

Na primeira etapa ocorre a ligação da *Lp* flagelada à célula hospedeira e essa ligação ocorre de forma específica para cada tipo celular. No caso da *Acanthamoeba castellanii* por exemplo, utiliza-se a lectina ligadora de manose (MBL), enquanto nos monócitos humanos a ligação ocorre nos receptores de complemento 1 e 3. Os *pili* também é uma estrutura importante que auxilia nesta ligação, independente dos fatores de ligação do hospedeiro. Ainda nesta fase, a

Lp começa a alterar o hospedeiro pela translocação de 320 proteínas efetoras para o citosol através do sistema Dot/Icm do tipo IV e, finalmente, a fagocitose ocorre por mecanismos convencionais (enrolamento), formando um vacúolo/fagossomo. (16–18)

O remodelamento do vacúolo ocorre imediatamente após sua absorção através da interceptação do retículo endoplasmático (RE) para vesículas de Golgi, sendo essa a segunda etapa do ciclo. A modificação do vacúolo o torna derivado do RE tubular, estratégia que inibe sua acidificação. Além disso, as proteínas poliubiquitinadas cercam rapidamente o vacúolo através do efector AnkB, porém, são neutralizadas pelo efector RavZ e degradadas pelo proteossoma do hospedeiro para, posteriormente, serem utilizadas como fonte de carbono e energia para a *Lp*. (19)

Após penetrar e se estabelecer na célula, na fase três, a *Lp* inicia sua replicação e dentro de uma hora já apresenta números elevados no interior do vacúolo. Cerca de 16 horas depois, a bactéria rompe o vacúolo e passa para o citosol do hospedeiro. Por fim, na etapa quatro, as bactérias passam por mais alguns ciclos de replicação no citosol até praticamente esgotar os nutrientes disponíveis, desencadeando a molécula sinalizadora ppGpp que induz uma transição da fase intracelular replicativa para a fase virulenta transmissiva. Nesta fase, as bactérias tornam-se flageladas para auxiliar na saída de um hospedeiro em busca do próximo (17).

Neste ponto, a disseminação de aerossóis de partículas infecciosas de bactérias livres, bactérias dentro de vesículas liberadas ou mesmo protistas cheios de bactérias, podem causar a infecção em humanos, pois, se forem absorvidas por macrófagos as mesmas continuam seu ciclo. Porém, não há transmissão para outros indivíduos, pois até o momento, o ser humano é considerado o ponto final da *Lp*. Portanto, o homem pode ser um hospedeiro acidental devido às características de virulência na *Lp* e à necessidade bacteriana de se replicar em uma célula hospedeira ou então, evitar a predação (20). O processo descrito acima está resumido na figura 1.3.

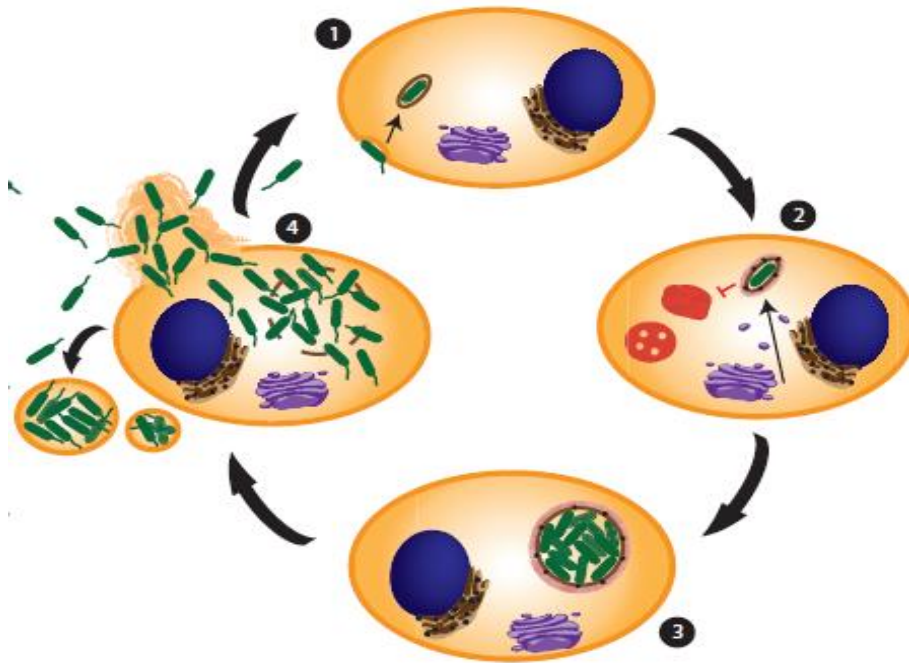


Figura 1.3. O ciclo de vida intracelular da *L. pneumophila* em células eucarióticas. Modificado de Best e Kwaik, 2018.

1.6. Doença dos Legionários e Febre Pontiac

Após o surto que deu origem às investigações em 1976, cientistas do CDC desenvolveram ferramentas para examinar amostras de casos semelhantes com origem desconhecida. Foi então que isolados de *Lp* foram encontrados em amostras dos anos de 1947, 1965 e 1968 e com base nessas análises, observaram que além da DL, a infecção também poderia se manifestar de forma não-pneumônica, denominada Febre Pontiac (FP). Sendo assim, a inalação de aerossóis contaminados por *Legionella* spp. pode resultar tanto na Doença dos Legionários quanto na Febre Pontiac (1).

A Febre Pontiac é uma doença aguda não-pneumônica de curta duração que ficou conhecida por este nome devido ao surto em 1968 em Pontiac – MI/EUA, onde não ocorreu nenhuma morte, porém, 144 pessoas foram acometidas pelos sintomas. Esta febre é autolimitada e seus sintomas são semelhantes aos de um resfriado, desaparecem dentro de dois a cinco dias sem a administração de antibióticos. Ocorre frequentemente em pessoas mais jovens entre 29 e 32 anos. Estima-se que esta forma seja responsável por apenas 1% das legioneloses nos EUA. Já a Doença dos Legionários é uma pneumonia atípica que pode estar relacionada a casos esporádicos (Pneumonia Adquirida na Comunidade – PAC) e associados às viagens ou a hospitais e casas de repouso (nosocomial), com fatalidade de 10% em indivíduos saudáveis e

acima de 25% em pessoas imunossuprimidas. O período de incubação no caso da DL pode ser de 2 a 10 dias, enquanto a FP ocorre em um curto período de 30 a 90h após a exposição (1,13).

Apesar de ocorrer com menos frequência, as legioneloses-não pulmonares também podem acontecer e incluir sintomas tais como esplenomegalia – com e sem ruptura do baço, pericardite, miocardite, infecções em feridas, endocardite, artrite e infecções do sistema nervoso central (5).

Entretanto, de acordo com Whiley *et al* (13), não há um consenso sobre como e porque a exposição à esta bactéria é capaz de se manifestar de maneiras distintas. Tampouco há dados sobre a concentração bacteriana necessária para resultar em um surto. Ainda não está claro se a FP é um resultado no espectro de gravidade da doença, ou apenas devido à inalação de células inviáveis ou somente uma resposta aos altos níveis de endotoxina bacteriana. (1)

Embora a identificação de *Legionella* spp. seja importante para o controle e manutenção dos sistemas hídricos, sua contagem sozinha não indica se a fonte poderá ou não causar uma doença. De acordo com Burillo *et al.*, os fatores associados ao risco de infecção são: carga bacteriana, virulência, eficiência de disseminação e o tipo de aerossol. Aerossóis com diâmetro >10 µm são capturados pela mucosa nasal e oral, aqueles entre 5 e 10 µm podem atingir o trato respiratório superior e inferior, e os aerossóis entre 2 e 5 µm podem alcançar os pulmões (5).

Outros fatores de risco para as legioneloses são: idade acima de 40 anos, tabagismo, indivíduos com doenças crônicas e subjacentes, abuso de álcool, tratamento com corticoides, câncer, tratamento com anti-TNF-alpha, distúrbios do sistema imunológico, exposição a banheiras de hidromassagem e viagem recente com estadia fora de casa, incluindo hospitais. A DL nosocomial está associada principalmente ao tratamento com dispositivos respiratórios, assim como também pode ocorrer após transplantes, coincidindo com episódios de rejeição além de elevar a morbidade nestes pacientes. Todos estes fatores também estão diretamente associados ao aumento da taxa de mortalidade (5,13).

Ainda que indivíduos imunossuprimidos estejam mais vulneráveis à infecção por *Legionella*, um estudo realizado por Cillóniz *et al.* (2018) concluiu que pessoas infectadas pelo HIV não apresentam maior gravidade ou piora no estado clínico, assim como a DL não ocorre com maior frequência nesta população. Este fato estaria provavelmente associado com a profilaxia

com cotrimoxazol dada a estes pacientes com HIV, um fármaco utilizado para evitar o surgimento de infecções oportunistas, como o caso da DL (21).

A DL ou a FP apresentam sintomas semelhantes aos de outras infecções respiratórias, impossibilitando um diagnóstico clínico. A tosse, quando presente, é frequentemente improdutiva. Febre alta, dor abdominal e diarreia aquosa, bradicardia, estado mental alterado, leucocitose, insuficiência renal, hiponatremia e transaminases elevadas são comuns e podem apresentar-se antes dos sintomas respiratórios, podendo levantar suspeita clínica da DL. Os achados radiológicos são inespecíficos e podem incluir infiltrados irregulares progressivos, consolidação, lesões cavitárias e derrames pleurais. Embora alguns pesquisadores tenham buscado identificar sintomas clínicos característicos das legioneloses, o que pode indicar uma contaminação por *Lp* é a combinação de fatores, onde há um padrão de envolvimento de órgãos, e sintomas extrapulmonares. (8,22)

Ainda que 90% das legioneloses sejam causadas pela espécie *L. pneumophila* do sorogrupo 1, todas as espécies do gênero têm potencial patogênico, sendo que as espécies não-*L. pneumophila* são isoladas com mais frequência de indivíduos imunocomprometidos. Após *Lp*, a maioria das infecções por *Legionella* spp. em pacientes imunossuprimidos é causada por *L. micdadei*, *L. bozemanai* e *L. dumoffii*. Infecções mistas podem ocorrer, mas são raras e normalmente associadas aos hospedeiros imunocomprometidos (5,23).

1.7. Diagnóstico da Doença dos Legionários

A pneumonia causada por LP não apresenta características clínicas específicas, mas a combinação de parâmetros clínicos e laboratoriais (como febre alta, proteína C reativa alta, lactato desidrogenase alta, trombocitopenia, hiponatremia e tosse improdutiva) podem indicar a DL (24). Portanto, os testes devem ser realizados sempre que um paciente com pneumonia não responde ao tratamento com antibióticos para PAC; pacientes imunocomprometidos ou com quadro grave; histórico de viagens até 14 dias antes do início dos sintomas; pneumonias associadas à assistência médica; ou indivíduos com ligação epidemiológica à uma fonte confirmada de *Legionella* (25).

Os testes diagnósticos para as legioneloses são: cultura de secreções respiratórias inferiores (como escarro, *swab* das vias respiratórias, ou lavado broncoalveolar); teste do antígeno

urinário (TAU); ensaios sorológicos; imunofluorescência direta e testes baseados na amplificação do DNA bacteriano (*Polymerase chain reaction* – PCR). Os métodos estão brevemente descritos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Testes diagnóstico para a Doença dos Legionários.

Teste	S* (%)	E* (%)	Vantagens	Desvantagens
Cultura	20 – 80	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Detecta todas as espécies e sorogrupos. ▪ Possível comparar com isolados ambientais. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Técnica complexa e demorada. ▪ Meio de cultura de difícil aquisição.
TAU	70-100	95 – 100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Resultados rápidos (mesmo dia) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Detecta apenas <i>Lp-SG1</i> ▪ Não possibilita a comparação molecular.
Sorologia	80 – 90	>99	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Possível detectar outras espécies e sorogrupos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Resultados demorados. ▪ O material deve ser coletado até 6 semanas após o aparecimento dos primeiros sintomas.
IFD	25 – 75	≥95	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Possível detectar outras espécies e sorogrupos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Técnica complexa. ▪ Os reagentes podem ser difíceis de obter.
PCR	95 – 99	>99	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Possível detectar outras espécies e sorogrupos. ▪ Rápido 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requer equipamentos e reagentes específicos. ▪ Poucos kits comerciais disponíveis.

*S = sensibilidade. *E = especificidade. IFD = imunofluorescência direta.

Atualmente, a forma mais rápida e simples para o diagnóstico é o teste do antígeno urinário (TAU), cuja sensibilidade varia entre 70 a 100% e a especificidade é de 95 a 100%. Este teste utiliza um anticorpo monoclonal que reconhece os antígenos derivados da camada de lipopolissacarídeos secretados na urina. O TAU pode ser aplicado após 48h do início dos sintomas, porém, identifica apenas a causa mais comum da DL, que é a *L. pneumophila do*

sorogrupo 1 (Lp-SG1), responsável por 84% das infecções. Sendo assim, o paciente com resultado negativo ainda pode estar com a doença causada por outros sorogrupos ou outras espécies do gênero (24–26). Também é possível que ocorram resultados falso-positivos, como foi relatado por Avni *et al.* (2016), já que este antígeno pode ser excretado pela urina por semanas ou até 1 ano após a infecção (27).

Embora o teste do antígeno urinário (TAU) seja o mais utilizado, ele não substitui a cultura no estudo da PAC ou da pneumonia nosocomial pois o último além de ser o padrão ouro, é bastante útil para fins epidemiológicos. A cultura realizada em meio específico para o gênero *Legionella* (BCYE-ágar) é utilizada para isolar qualquer espécie do gênero, independente do sorogrupo, presente tanto em fontes ambientais quanto em amostras do trato respiratório inferior, fluido pleural e tecido pulmonar. Esse método possibilita a comparação dos isolados clínicos com a possível fonte de um surto, porém apresenta algumas desvantagens. A sensibilidade do método está diretamente ligada à habilidade técnica do microbiologista, variando entre 20 e 80%. Além disso, a cultura, em alguns casos, demora mais de cinco dias para apresentar as primeiras colônias e o crescimento pode ser afetado caso o paciente tenha iniciado um tratamento com administração de antibióticos antes da coleta das amostras (25,28).

A visualização no microscópio por meio da coloração de Gram é difícil mesmo que a técnica seja aprimorada pela troca de safranina por fucsina a 0,1%. Assim como a coloração de Gram, a coloração de Brown e Hopps também é ineficaz. As colorações de prata como a de Warthin-Starry, Steiner ou Diertele funcionam melhor para os isolados de *Legionella*, porém, a melhor técnica de microscopia é a de imunofluorescência direta (IFD) (5,8). A IFD tem sensibilidade entre 25 e 75%, com especificidade $\geq 95\%$ mas é raramente utilizada devido à complexidade da técnica e necessidade de reagentes difíceis de se obter (25).

Os métodos sorológicos caíram em desuso já que não são efetivos. Os altos títulos de anticorpos detectados nas amostras de soro da fase aguda podem ser anticorpos de infecção subclínica prévia por *Legionella* spp. ou anticorpos de reação cruzada de infecções bacterianas heterólogas. Além disso, na maioria dos pacientes com a DL confirmada por cultura, a soroconversão não é detectável até três semanas após a infecção e muitos pacientes imunossuprimidos nunca produzem anticorpos (5). Desta forma, apesar de apresentar boa sensibilidade (80 – 90%) e especificidade ($>99\%$), os resultados são tardios e portanto, inúteis

para a investigação de surtos e, principalmente, para a administração de um tratamento adequado baseado no diagnóstico (25).

As técnicas de identificação baseadas em PCR têm se mostrado uma ótima ferramenta no diagnóstico molecular de doenças e por se tratar de uma abordagem rápida é utilizada cada vez mais para diversos agentes infecciosos. No caso das legioneloses, os alvos mais utilizados para a detecção do patógeno são os genes 16S rRNA e 5S rRNA, usados na identificação de *Legionella* spp., e o gene *mip* para identificar especificamente a presença de *Lp* em amostras biológicas ou ambientais. Atualmente, existem seis ensaios comerciais disponíveis, entretanto, apenas um (BD ProbeTec ET *L. pneumophila* amplified DNA assay, Becton, Dickinson and Company) é aprovado pelo Food and Drug Administration – FDA. Apesar de ser um teste mais demorado que o do antígeno urinário, é uma técnica com maior sensibilidade (95 – 99%) e especificidade >99%, além de ser mais rápido que a cultura e distinguir outras espécies e sorogrupos. (5,8,25).

Sendo assim, a recomendação dada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC – USA) no diagnóstico das legioneloses é a combinação de dois métodos como o isolamento por cultura acompanhado pelo TAU, para que assim seja possível aumentar a especificidade dos resultados e, conseqüentemente, aplicar tratamento adequado aos pacientes (25).

1.8. O tratamento das legioneloses

O tratamento correto nos casos de PAC por *Lp* é fundamental para uma redução na taxa de mortalidade, visto que esta taxa em indivíduos saudáveis é de 10%, porém pode chegar a 27% caso não recebam os medicamentos adequados (24).

Por se tratar de um patógeno intracelular capaz de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos, os antibióticos utilizados devem ter atividade intracelular para combater a bactéria. Portanto, antibióticos como os aminoglicosídeos são ineficazes porque não tem a capacidade de penetrar nas células. Outro fator importante é que a utilização de β -lactâmicos é inadequada, pois as espécies de *Legionella* possuem a enzima β -lactamase, cuja função é a degradação desta classe de antibióticos. (6)

Por fim, recomenda-se o uso de macrolídeos e fluoroquinolonas. Os antibióticos macrolídeos são agentes bacteriostáticos que se ligam à subunidade ribossômica 50S, inibindo a síntese de proteínas. As fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos cujo mecanismo de ação é por inibição das enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, impedindo o processo de transcrição e replicação do DNA bacteriano. Assim, os antibióticos mais comuns no tratamento das legioneloses são: azitromicina, levofloxacina e rifampicina. (24)

No Brasil, foi implementado um tratamento empírico para as PAC em 1993, cuja terapia é baseada na administração de antibióticos com ação tanto contra a *Streptococcus pneumoniae* como contra as bactérias atípicas, como é o caso da *Lp* (28). De acordo com as Diretrizes para o tratamento de adultos com PAC, os pacientes ambulatoriais devem ser tratados com um macrolídeo ou uma tetraciclina, ou a combinação de macrolídeo e β -lactâmico. Em casos ambulatoriais mais graves, recomenda-se o uso de uma fluoroquinolona. Já os pacientes internados devem receber uma terapia baseada num macrolídeo intravenoso, ou utilizando um regime com dois agentes antimicrobianos. (29)

Apesar desta tentativa de implementar diretrizes e protocolos, os critérios de admissão e tratamento no país variam, e somente em 58,9% dos casos o tratamento estava de acordo com as diretrizes (30). Embora a maioria receba como regime inicial uma combinação de amoxicilina e clavulanato, a mudança na administração de antibióticos durante a hospitalização ocorreu em 63% dos casos, sendo a alteração mais comum a adição de azitromicina. Estes fatos se devem principalmente pela baixa taxa de identificação do patógeno nos casos de PAC, que ocorreu em apenas 17% dos casos (30).

Deste modo, o tratamento empírico utilizado no Brasil, assim como em outros países, estimula a administração de vários antibióticos para aumentar a probabilidade de uma terapia eficaz, o que pode resultar em toxicidade, alto custo e desenvolvimento de resistência antimicrobiana (30).

1.9. Resistência aos antimicrobianos em *L. pneumophila*

Diferentes fatores como a administração empírica de antibióticos, fatores ambientais, tentativas de descontaminação e presença de antimicrobianos no ambiente podem acarretar na seleção de cepas resistentes de *Lp*. Sendo assim, o estudo da suscetibilidade aos antibióticos

frequentemente usados no tratamento da DL é importante para averiguar a distribuição de resistência em isolados ambientais em determinada região, antes de ser evidenciado em amostras clínicas e em pacientes infectados. Tal análise permitiria uma recomendação mais precisa sobre o fármaco a ser administrado (7).

Entretanto, o estudo da suscetibilidade antimicrobiana apresenta alguns desafios. A DL é uma pneumonia não produtiva, o que dificulta a coleta de secreções respiratórias para o isolamento por cultura. Além disso, a interpretação da atividade antimicrobiana *in vitro* é complexa pois as distribuições de concentração mínima inibitória (CMI) de cepas do tipo selvagem, bem como os valores de corte epidemiológicos (ECOFFs) não foram descritos (7). Embora o teste baseado na difusão de um gradiente de antimicrobiano (E-teste) forneça um método simples e preciso para testes de rotina, foi relatado que a realização do E-teste no ágar BCYE pode produzir CMIs elevadas devido à presença do carvão da composição do meio, que pode inativar alguns antibióticos (13). Porém, apesar destes desafios, alguns estudos têm sido realizados para determinar a resistência aos macrolídeos e fluoroquinolonas em isolados clínicos e ambientais de *Lp*.

O primeiro isolado clínico resistente foi descrito por Bruin *et al.* em 2014 na Alemanha. Na ocasião, um paciente com DL foi internado na UTI e só apresentou melhora no quadro clínico após a troca de ciprofloxacina por claritromicina. Uma amostra de lavado broncoalveolar foi então inoculada em meio BCYE para a realização do E-teste, cujo valor da CMI de ciprofloxacina foi de 2 mg/L. A confirmação se deu pelo sequenciamento dos genes *gyrA* e *gyrB* (DNA girase) e *parC* e *parE* (topoisomerase IV), no qual foi possível identificar mutações na região determinante de resistência às quinolonas da topoisomerase. As alterações na topoisomerase ocorrem através de mutações espontâneas de forma gradual e cumulativa, e resultam na baixa sensibilidade aos antibióticos desta classe. (31)

Quando realizada uma comparação da sensibilidade entre cepas clínicas e ambientais, Sharaby *et al.* constatou uma diferença significativa entre as CMIs, no qual as cepas ambientais foram significativamente mais resistentes à metade dos antibióticos em análise e, de modo geral, ambos tipos de isolados apresentaram CMIs mais elevados para a azitromicina quando comparada a outros macrolídeos. Tal fato poderia ser explicado pela maior utilização da azitromicina, neste caso em Israel, país onde o estudo foi feito (15). A menor suscetibilidade aos macrolídeos pode estar associada às mutações nos genes que codificam as proteínas ribossômicas 23S rRNA (*rrl*), L4 (*rplD*) e L22 (*rplV*) (32).

Por fim, a limitação dos dados, a alta porcentagem de artigos de resistência não definida e o maior número de análises apenas em isolados clínicos dificultam uma conclusão a respeito deste tema e demonstra a necessidade de mais esforços para a determinação padronizada dos CMIs e valores específicos de ECOFF (33).

1.10. Epidemiologia

O constante crescimento populacional mundial produz uma demanda cada vez maior de água para o consumo humano, seja pelo abastecimento, produção energética, atividade industrial ou agricultura. Como consequência, nas últimas décadas, houve a necessidade da construção de mais reservatórios de água com diversas finalidades, como reservas para irrigação, transporte, produção de biomassa, etc. Logo, um dos principais impactos causados pelo aumento de reservatórios artificiais é a modificação da distribuição geográfica de doenças de veiculação hídrica, como é o caso das legioneloses (34).

Somado a isso, os sistemas de água que produzem aerossóis, como ar-condicionado e torres de resfriamento, criou condições que permitem o acesso direto das bactérias aos pulmões humanos, tornando a DL uma doença emergente desde a década de 1970. (4)

Acredita-se também que, além do aumento da exposição humana a *Legionella* spp., efeitos hídricos como chuvas e o aumento da vazão de rios, estão relacionados à sua proliferação, assim como o clima quente e úmido, pois, como demonstrado por Rucinski *et al.* (2018), o número de casos de DL foi maior no verão do que no inverno devido às condições ideais proporcionadas pela estação (35).

Entre os casos de DL, estima-se que aproximadamente 70% sejam de PAC, cerca de 20% estejam associados a viagens e 10% sejam de origem hospitalar ou de casas de repouso, segundo Burillo *et al.* (2017) (5).

A DL é uma doença de notificação obrigatória em poucos países, sendo eles: EUA, Canadá, Singapura, Israel, Japão, Austrália, Nova Zelândia e nos países que formam a União Européia; onde a incidência cresceu ao longo dos anos e, mesmo assim, estes países ainda enfrentam uma subnotificação dos casos (5). Nestes locais onde os casos são reportados, a incidência de casos por 100 mil habitantes é de 1,36 nos EUA, 0,94 no Canadá, 0,16 em Singapura, 0,67 em Israel, 1,6 no Japão, 5,4 na Nova Zelândia, 0,91 na China e 1,16 nos países da União Europeia

(23,36–39). Porém, devido às falhas no diagnóstico, subnotificação dos casos de PAC e foco apenas em infecções que requerem hospitalização, estima-se que a verdadeira incidência seja 20 vezes maior, segundo Whiley *et al.* (13).

De acordo com o ELDSNet (*European Legionnaire's Disease Surveillance Network*), entre 2011 e 2015, 29 países europeus registraram um total de 30.532 casos, e a incidência cresceu de 0,97 para 1,3 casos por 100 mil habitantes. No ano de 2017, só a Suíça registrou 492 casos, levando a incidência de 5,81 casos por 100 mil habitantes (14).

Nos EUA, o número de casos cresceu 286% de 2000 a 2014, porém, além do real aumento de casos, este número também se deve ao aumento de testes e notificações (5). Desde 2013, cerca de 5000 casos esporádicos e pelo menos 20 surtos foram relatados anualmente ao CDC (20).

No Japão, as legioneloses são uma das doenças infecciosas de notificação obrigatória desde 1999 e o número de casos notificados cresceu de 154 para 1602 entre 2000 e 2016. Vários surtos foram associados aos banheiros públicos e, embora as instalações possuíssem sistemas de circulação com filtros e água quente, constatou-se que as instalações balneares são a principal fonte de infecção no país (23).

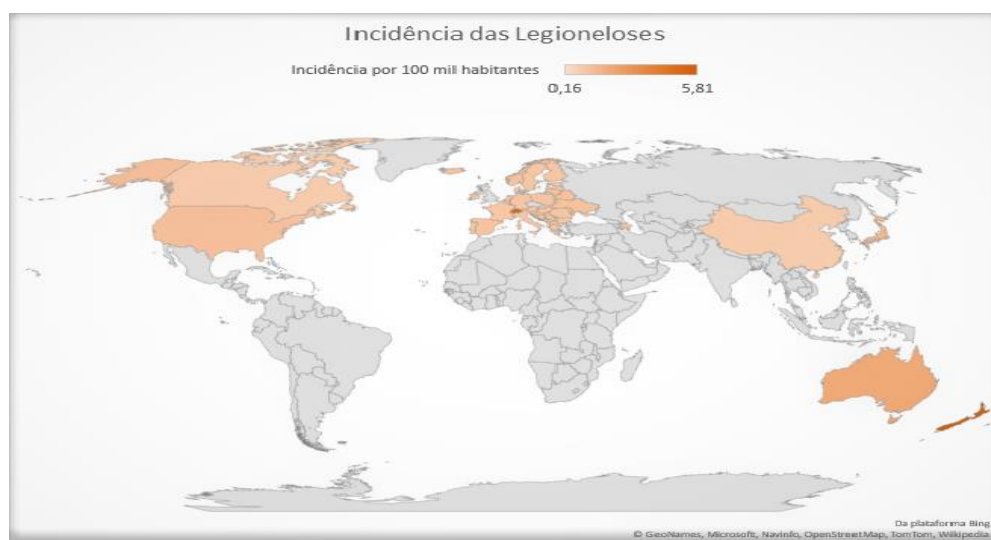


Figura 1.4. Mapa de incidência das legioneloses em países com notificação obrigatória.

Embora não se tenha dados concretos sobre este patógeno no Brasil, sabe-se que a PAC representa a principal causa de morbidade e hospitalização, além de apresentar desafios no

diagnóstico e tratamento. De acordo com o SUS, a PAC lidera as causas de hospitalização (excluindo casos relacionados à gravidez, parto, e puerpério) e no ano de 2017 foram 598.668 hospitalizações e 52.776 mortes relacionadas a PAC no país (30).

Em um levantamento feito por Rabello *et al.* (2015), foram analisados 253 questionários médicos de todas as regiões do Brasil e nesse inquérito apenas 20% dos médicos relataram o pedido do teste de antígeno urinário para *Legionella* (40).

Desta forma, dado o aumento do uso de terapias imunossupressoras combinado com as mudanças climáticas que vem ocorrendo no mundo todo, espera-se que o número de casos da DL seja ainda maior no futuro (22).

1.11. Identificação molecular por *Sequence-Based Typing*

Devido ao grande número de casos de legioneloses registrados nas últimas décadas, tornou-se necessário a busca por técnicas capazes de responder perguntas epidemiológicas, como identificar e caracterizar os isolados clínicos e ambientais, relacionar os surtos com a fonte de contaminação e até mesmo prever o potencial patológico dos isolados presentes nas possíveis fontes de transmissão da doença.

Atualmente existem diversas técnicas utilizadas para a caracterização molecular da *Lp*, como VNTR (*Variable Number Of Tandem Repeats*); PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Embora a PFGE seja amplamente utilizada e apresente alto poder discriminatório, ela não apresenta uma boa reprodutibilidade interlaboratorial, pois os resultados dependem da interpretação de imagens de gel (41). Além disso, Burchrieser e Hilbi (2013) afirmam que as cepas de *Legionella* são consideradas biologicamente inertes em relação às técnicas de tipificação tradicionais portanto, esquemas baseados em sequência seriam mais apropriados (12).

Sendo assim, o ESGLI (*European Study Group for Legionella Infections*), um grupo que pertence a ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), se baseou na técnica *Multilocus Locus Sequence Typing* (MLST), descrita inicialmente por Enright e Spratt, para criar uma metodologia adequada na tipificação molecular de *Lp*. Portanto, enquanto o MLST consiste no sequenciamento e análise de sete *housekeeping* genes

para determinar o perfil dos isolados de diversas espécies bacterianas, Gaia *et al.* (2005), propôs um método semelhante para a tipificação molecular de *Lp*, porém, utilizando genes sob pressão seletiva, o qual nomeou como *Sequence-Based Typing* (SBT) (42).

Inicialmente, a técnica proposta contava apenas com três genes: *flaA*, *proA* e *mompS*. Estes genes codificam uma proteína da subunidade flagelar, uma zinco metaloprotease encontrada na *Lp* e uma proteína de membrana externa, respectivamente. Posteriormente, os genes *asd*, *mip* e *pilE*, que codificam a aspartato-semialdeído desidrogenase, a proteína potenciadora de infectividade de macrófagos e a pilina tipo IV, respectivamente, foram investigados e inseridos na tipagem molecular para aprimorar o nível de discriminação oferecido. Embora o esquema utilizando estes seis genes tenha produzido um alto valor discriminatório ($D = 0,932$), a adição do gene *neuA*, localizado no *locus* de síntese do lipopolissacarídeo (LPS), aumentou o poder discriminatório para 0,963 assim, a diversidade das cepas pode ser representada com maior precisão (41–44).

Portanto, o SBT consiste na amplificação e sequenciamento de cinco genes associados à virulência (*flaA*, *pilE*, *mip*, *mompS* e *proA*) e dois *housekeeping* genes (*asd* e *neuA*). Assim, a tipagem molecular pela técnica SBT é baseada na variação nucleotídica que ocorre nas sequências dos fragmentos internos destes sete genes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* e *neuA*). Para cada gene, diferentes sequências presentes em diferentes linhagens bacterianas são classificadas como alelos distintos, ou seja, cada alelo é determinado pela variação nucleotídica e este é representado por um número aleatório. Para cada isolado, o tipo de sequência (ST – *Sequence Type*) ou perfil alélico resultante é definido pela descrição cumulativa do número dos alelos de cada *locus*, na ordem *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* e *neuA*, como mostra o exemplo representado na Figura 1.5. A ausência de informações de sequência para qualquer *locus* é inserida no perfil como um zero, porém, o ST não será definido (43).

<i>ST</i>	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>
<i>1</i>	1	4	3	1	1	1	1

Figura 1.5. Combinação alélica que resulta no ST1.

A análise das sequências e a interpretação dos resultados é realizada com auxílio da ferramenta *Sequence Quality Tool* disponível no site (www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq_assemble_legionella1.cgi) que pertence ao banco de dados *SBT Database* (www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php) criado pelo ESGLI. No site também é possível acessar protocolos utilizados para análise molecular da *Lp*, obter as sequências de referência e o número de variações encontradas em cada gene, além de possibilitar um panorama sobre os isolados submetidos ao banco, como, origem (clínica, ambiental ou desconhecida), número de entradas (isolados), entre outras informações.

Até maio de 2019, o site recebeu a entrada de 12.866 isolados, sendo 33,19% de origem ambiental, 66,06% de amostras clínicas e 0,75% de origem desconhecida e atualmente existem mais de 2.000 STs identificados ao redor do mundo (45).

Nos países onde há uma maior vigilância sobre as legioneloses, alguns estudos foram realizados para identificar o ST de isolados de origem ambiental, para analisar seu potencial patogênico, como também de isolados de origem clínica para uma análise epidemiológica dos casos. O ST1 é amplamente distribuído em diversos países, além de ser predominante nos EUA, Europa, Israel, China e Índia. Na Europa, além do ST1, os STs 47 e 35 também são predominantes na região, assim como na China o ST154 também prevaleceu nos genótipos identificados. No Japão e no Canadá os perfis mais encontrados foram ST23 e ST62, respectivamente. (23,41,46–49)

Sendo assim, além do esquema SBT ser altamente discriminatório, apresenta uma excelente reprodutibilidade e permite que os dados obtidos sejam facilmente compartilhados entre os laboratórios do mundo todo.

1.12. Whole Genome Sequencing (WGS)

Embora a SBT apresente um alto poder discriminatório e tenha se mostrado capaz de relacionar os isolados clínicos com a fonte da contaminação através da comparação dos genótipos (STs) obtidos nas amostras clínicas e ambientais, a técnica pode, em alguns casos,

apresentar falhas na identificação de algumas variantes genéticas. O sequenciamento do genoma completo (*Whole Genome Sequencing* – WGS) pode suprir esta desvantagem, pois enquanto a SBT se baseia apenas em sete genes, o WGS avalia todo o material genético e proporciona diferentes métodos na análise dos dados obtidos, podendo se basear em SNPs, core genoma, comparação do genoma acessório, perfil dos elementos genéticos móveis e *core genome* MLST (cgMLST).

Assim, o sequenciamento genômico é a melhor técnica para obter uma descrição completa da composição molecular de qualquer organismo. Portanto, o WGS possui um poder discriminatório mais elevado que qualquer outra técnica de tipagem molecular, como mostram os exemplos a seguir.

Um surto ocorrido num hospital australiano levou à análise de seis isolados utilizando as técnicas SBT e WGS e o ST identificado foi o mesmo para todos os isolados (ST1). Entretanto, através da comparação dos genomas, foi possível identificar dois isolados que não estavam relacionados ao hospital e mostraram mais de 1.500 SNPs diferentes quando comparados aos isolados relacionado ao hospital; os do hospital não tinham mais de 20 SNPs de diferença entre eles. Além disso, foi possível relacionar estas cepas com um caso da DL ocorrido dois anos antes e identificar a fonte ambiental responsável pela contaminação. Assim, o estudo demonstrou o maior poder discriminatório do WGS, especialmente para tipagem de clones endêmicos como o ST1. (4)

Em 2014, ocorreu um dos maiores surtos da DL no mundo, com mais de 400 casos e 14 mortes em Vila Franca de Xira – Portugal. As análises rastrearam os sistemas de resfriamento industrial e revelaram que a cepa relacionada ao surto era Lp-SG1 com o novo ST1905, uma cepa que posteriormente foi associada a evidências da primeira, e única, transmissão pessoa-pessoa. Nessa ocasião, uma mulher que trabalhava nesta indústria se contaminou e visitou sua mãe a 300 km da cidade onde ocorreu o surto e, posteriormente, a mãe também foi diagnosticada com a DL. Além de apresentarem o mesmo ST1905 nos dois casos, a confirmação de que se tratava da mesma cepa se deu pelo WGS e comparação dos genomas (11).

Deste modo, o sequenciamento genômico possibilita: a comparação com genomas previamente descritos, possibilitando correlacionar características com mutações; a compreensão dos mecanismos de evolução e a investigação em tempo real de um surto

comunitário (4). Sendo assim, o WGS é uma ferramenta importante em investigações epidemiológicas e possui um alto nível discriminatório, sendo considerado promissor na vigilância de patógenos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a identificação molecular de isolados de *Lp* provenientes de fontes ambientais.

2.2. Objetivos específicos

- Utilizar a técnica SBT para determinar a variabilidade genética de isolados de *L. pneumophila*.
- Analisar a frequência dos Tipos de Sequência (ST) identificados entre os estados brasileiros.
- Identificar o perfil alélico predominante no Brasil e compará-lo com os demais países.
- Realizar a caracterização molecular de *Legionella pneumophila* por sequenciamento do genoma completo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados de *Legionella* spp.

Neste estudo foram incluídas 50 amostras de *Legionella* spp. provenientes de diferentes fontes ambientais, isoladas nos anos de 2015, 2018 e 2019. Estas amostras foram fornecidas ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado a Micobactérias – LABMAM em meio BCYE em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo diferentes colônias. As amostras são o fruto de uma colaboração com a Conforlab, uma empresa de engenharia ambiental, localizada na cidade de São Paulo, acreditada pela ANVISA, INMETRO e CDC – EUA. A Conforlab presta serviços de avaliação de ambientes, incluindo a análise do ar de ambientes internos, e análise e tratamento de água em todo território nacional. Nestas análises estão incluídas a identificação de *Legionella* spp. com base nos parâmetros estabelecidos pela ISO 11731, que consiste na (i) semeadura direta e (ii) semeadura pós filtração. Assim, as 50 cepas analisadas neste estudo representam uma parte das amostras analisadas pela empresa neste período.

Sendo assim, o processo de identificação de *Legionella* spp. realizado pela Conforlab consistiu na coleta de 1 L de água de diferentes ambientes, cidades e estados. Deste volume de 1 L, (i) uma alíquota de 200 uL foi inoculada diretamente no meio de cultura seletivo BCYE (*Buffered charcoal yeast extract*) suplementado com glicina e um conjunto de antibióticos (GVPC: glicina, cloridrato de vancomicina, sulfato de polimixina B e cicloheximida), e incubadas a 35°C em ambiente rico em CO₂ por até 14 dias.

O restante do material coletado foi concentrado por filtração em membrana de celulose estéril com porosidade entre 0,2 µm e 0,45 µm (47 mm de diâmetro). Esta membrana foi então transferida para um tubo de 50 mL contendo 10 mL de água destilada estéril e, em seguida, foi tratada com a adição 1 mL de HCl a 0,2 M e mantida em repouso por 15 minutos. Para neutralizar a reação, 1 mL de KOH a 0,1 M foi adicionada a solução. Alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em placas de Petri contendo meio seletivo BCYE + GVPC. As placas foram incubadas a 35°C em ambiente rico em CO₂ por até 14 dias.

A confirmação do gênero *Legionella* spp. é dada pelo repique das colônias em meio BCYE sem a adição de L-cisteína ou em meio ágar sangue, pois as espécies deste gênero só crescem na presença deste aminoácido. Enquanto a identificação da espécie *L. pneumophila* SG-1 foi

realizada pelo *Legionella Latex Test* (Oxoid), um teste de aglutinação em látex para a identificação das espécies mais frequentes de *Legionella* a partir de placas de cultura.

As culturas recebidas em placas de Petri que apresentavam menos de 10 colônias foram repicadas em nosso laboratório para obter uma maior massa bacteriana, para que os experimentos seguintes pudessem ser realizados. Os repiques foram realizados em meio BCYE + GVPC (*Legionella Agar Base* – Sigma-Aldrich; *Legionella BCYE Growth Supplement* – Oxoid; *Legionella GVPC Selective Supplement* – Sigma-Aldrich).

O número de cepas obtidas por estado está representado na tabela a seguir (Tabela 3.1). Informações mais detalhadas sobre as amostras como data da análise, qualidade da cultura, local e origem estão descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.1. Relação do número de amostras (N) por estado e região.

ESTADO	N	REGIÃO	N
RS	1	Sul	6
PR	5		
SP	25	Sudeste	35
RJ	5		
MG	5		
SE	4	Nordeste	8
PE	3		
BA	1		
GO	1	Centro-oeste	1

3.2. Criopreservação

Para a criopreservação dos isolados, duas a três alças de massa bacteriana de cada placa foram ressuspensas em 750 µL de caldo BYE em criotubos de 2 mL, os quais foram incubados overnight a 37°C. Posteriormente foi adicionado a cada criotubo 750 µL de glicerol e os tubos foram mantidos em gelo seco por aproximadamente 20 minutos e, em seguida, armazenados em nitrogênio líquido (-196°C).

Este processo foi feito em triplicata para cada uma das amostras. Assim, foi possível disponibilizar até dois tubos para a realização dos experimentos enquanto um tubo permanece na coleção de microrganismos do laboratório.

Tabela 3.2. Amostras de *Legionella* spp. fornecidos pela Conforlab.

ID	UFC	Análise Conforlab	Origem	Local	Local ID	Cidade / estado	Espécie	DNA (ng/µl)
17861	18	30/04/2019	Chuveiro	Hotel	H1	Rio de Janeiro - RJ	<i>Legionella</i> spp.	59,6
20934	2	17/05/2019	Torneira	Hotel	H2	Foz do Iguaçu - PR	<i>Legionella</i> spp.	0,818
20935	6	14/05/2019	Chuveiro	Hotel	H2	Foz do Iguaçu - PR	<i>Legionella</i> spp.	13,5
21121	5	30/04/2019	Torneira	Hotel	H3	Paranaguá - PR	<i>Legionella</i> spp.	12,0
21122	2	30/04/2019	Chuveiro	Hotel	H3	Paranaguá - PR	<i>Legionella</i> spp.	2,18
21123	3	30/04/2019	Torneira	Hotel	H3	Paranaguá - PR	<i>Legionella</i> spp.	4,5
28694	1*	17/05/2019	Torre de Resfriamento	Centro comercial	CC1	Rio de Janeiro - RJ	<i>L. pneumophila</i>	2,14
36800	14	30/04/2019	Torneira	Hotel	H4	Aracaju - SE	<i>Legionella</i> spp.	5,82
36801	50	30/04/2019	Chuveiro	Hotel	H4	Aracaju SE	<i>Legionella</i> spp.	37,6
36802	11	30/04/2019	Boiler	Hotel	H5	Aracaju - SE	<i>Legionella</i> spp.	16,2
36803	29	30/04/2019	Torneira	Hotel	H5	Aracaju - SE	<i>Legionella</i> spp.	1,59
37063	3	30/04/2019	Pia do banheiro	Hotel	H6	Recife - PE	<i>Legionella</i> spp.	7,6
37064	3	30/04/2019	Chuveiro	Hotel	H6	Recife - PE	<i>Legionella</i> spp.	0,372
37065	17*	30/04/2019	Pia	Hotel	H6	Recife - PE	<i>Legionella</i> spp.	0,136
44501	60	17/05/2019	WC - Masculino	Indústria de alimentos	I1	Caçapava - SP	<i>Legionella</i> spp.	0,62
65699	9	30/04/2019	Chuveiro	Empresa de limpeza	E1	São Paulo - SP	<i>L. pneumophila</i>	12,6
66905	1*	30/04/2019	Torre de resfriamento	Centro comercial	CC2	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	0,05
66907	1*	30/04/2019	Torre de resfriamento	Centro comercial	CC2	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	0,06
66931	22	17/05/2019	Torre de resfriamento	Centro comercial	CC3	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	60,26
67565	9	30/04/2019	Torre de resfriamento	Centro comercial	CC4	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	69,96
18HP02	2*	26/09/2018	Torneira	Hotel	H7	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	18,03
18HP03	1	26/09/2018	Torneira	Hotel	H8	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	66,31
18HP04	6*	26/09/2018	Boiler	Hotel	H9	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	37,87
18HP06	40	26/09/2018	Torneira	Hotel	H10	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	323,18

18HP07	40	26/09/2018	Chuveiro	Hotel	H10	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	257,01
18HP08	30	26/09/2018	Torneira	Hotel	H10	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	326,34
18HP10	4	26/09/2018	Chuveiro	Hotel	H11	São Bernardo do Campo - SP	<i>Legionella</i> spp.	9,99
18HP11	2*	27/09/2018	Boiler	Hotel	H12	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	76,16
18HP12	2	27/09/2018	Chuveiro	Hotel	H13	São Bernardo do Campo - SP	<i>Legionella</i> spp.	33,31
18HP13	1	27/09/2018	Reservatório	Hotel	H13	São Bernardo do Campo - SP	<i>Legionella</i> spp.	9,1
18HP14	26	28/09/2018	Chuveiro	Hotel	H14	Rio de Janeiro - RJ	<i>Legionella</i> spp.	15,3
18HP15	1	28/09/2018	Boiler	Hotel	H15	Belo Horizonte - MG	<i>Legionella</i> spp.	0,102
18HP16	2*	28/09/2018	Torneira	Hotel	H15	Belo Horizonte - MG	<i>Legionella</i> spp.	9,46
18HP17	1*	24/10/2018	Boiler	Hotel	H16	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	31,88
18HP18	1*	25/10/2018	Chuveiro	Hotel	H17	Rio de Janeiro - RJ	<i>Legionella</i> spp.	1,88
18HP19	1*	25/10/2018	Torneira	Hotel	H17	Rio de Janeiro - RJ	<i>Legionella</i> spp.	2,64
18LI01	12*	12/09/2018	Torre	Laboratório	L1	São Paulo - SP	<i>L. pneumophila</i>	17,4
18LP09	50*	26/09/2018	Chuveiro	Laboratório	L2	São Paulo - SP	<i>L. pneumophila</i>	2,72
18SI05	5*	26/09/2018	Torre de resfriamento	Shopping	S1	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	54,45
18SI20	4	26/10/2018	Torre de resfriamento	Shopping	S1	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	2,08
18SI21	3*	26/10/2018	Torre de resfriamento	Shopping	S1	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	3,0
18SI22	11*	26/10/2018	Torre de resfriamento	Shopping	S1	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	4,72
18SI28	19	26/10/2018	Torre de resfriamento	Shopping	S1	São Paulo - SP	<i>Legionella</i> spp.	195,1
ISHP01	18	07/01/2015	Torneira	Hotel	H18	Moema - SP	<i>L. pneumophila</i>	4,48
ISHP02	15	06/02/2015	Torneira	Hotel	H19	Goiania - GO	<i>L. pneumophila</i>	24,6
ISHP03	9	02/03/2015	Apartamento	Hotel	H20	Vera Cruz - BA	<i>L. pneumophila</i>	1,36
ISHP04	3	25/02/2015	Torneira	Hotel	H21	Belo Horizonte - MG	<i>Legionella</i> spp.	0,38
ISHP05	31	25/02/2015	Copa	Hotel	H21	Belo Horizonte - MG	<i>Legionella</i> spp.	9,5
ISHP06	2	25/02/2015	Bebedouro	Hotel	H21	Belo Horizonte - MG	<i>Legionella</i> spp.	0,174
ISHP07	13	27/02/2015	Torneira	Hotel	H22	Porto Alegre - RS	<i>Legionella</i> spp.	2,88

ID: identificação das amostras. UFC: número de unidades formadoras de colônia. * presença de contaminação na placa. Local: estabelecimento de origem. Local ID: código de identificação do local. DNA: concentração em ng/uL do DNA extraído das amostras.

3.3. Extração de DNA

Para a extração de DNA, uma ou duas alças da cultura foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL com aproximadamente 1 mL de água estéril e centrifugadas a 15.000 $\times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 100 μ L de tampão com RNase (*Resuspension Buffer with RNase A – R4*) junto com 5 μ L de Lisozima (50 mg/mL), para então incubar estes microtubos a 37° C por 10 minutos. Em seguida, 500 μ L de tampão de lise (L14) e 10 μ L de Proteínase K foram adicionados e as amostras foram incubadas a 80°C por uma hora. Todas as soluções, exceto a Lisozima, são componentes do kit *ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria* (Invitrogen).

Após a lise das células, o DNA bacteriano foi isolado dos demais componentes celulares por ligação às esferas magnéticas que compõem o *kit* de extração *ChargeSwitch®* conforme o protocolo do fabricante. Todas as etapas utilizaram os reagentes disponibilizados pelo *ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria kit –* Invitrogen e foram realizadas com o auxílio de uma *rack* magnética (MagnaRack™ – Life Technologies/ Thermo Fisher).

Para verificar se a extração foi bem sucedida, o DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop*.

3.4. Identificação molecular – *Sequence-Based Typing*

A identificação molecular foi realizada pela técnica *Sequence-Based Typing*, proposta pelo EWGLI (*European Working Group for Legionella Infections*), que consiste em três etapas: amplificação primária, sequenciamento e análise dos dados.

i) Amplificação primária

Para cada amostra sete reações de PCR foram realizadas, ou seja, uma reação para cada um dos sete alelos analisados na técnica (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*). Os *primers* utilizados para a amplificação de cada alvo estão detalhados na tabela 3.3.

O mix de PCR foi composto pela seguinte concentração final dos reagentes: 1 U de *Taq*

polimerase, 1X tampão de PCR e 2,5 mM MgCl₂ (kit *Taq DNA Polymerase Recombinant* – Invitrogen™); 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM de cada *primer* e 4 µL do DNA de cada amostra, em um volume final de 50 µL. O perfil térmico foi dado pelas seguintes condições: 95°C por 5 min para a desnaturação inicial; seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 s + 30 s a 56,5°C para o anelamento + 35 s a 72°C para a extensão e, por fim, 5 min a 72°C para a extensão final. O DNA da *L. pneumophila* ATCC 33152 foi utilizada como controle positivo, enquanto no controle negativo o DNA foi substituído por 4 µL de água.

Tabela 3.3. *Primers* utilizados para a SBT.

Gene	F/R	Posição	Sequência (5' – 3')	Fragmento
<i>flaA</i>	F	568-587	GCGTATTGCTCAAAATACTG	414 pb
	R	981-960	CCATTAATCGTTAAGTTGTAGG	
<i>pilE</i>	F	12-35	CACAATCGGATGGAACACAAA CTA	460 pb
	R	471-453	GCTGGCGCACTCGGTATCT	
<i>asd</i>	F	487-511	CCCTAATTGCTCTACCATTTCAGATG	576 pb
	R	1062-1039	CGAATGTTATCTGCGACTATCCAC	
<i>mip</i>	F	58-74	GCTGCAACCGATGCCAC	559 pb
	R	616-595	CATATGCAAGACCTGAGGGAAC	
<i>mompS</i>	F	430-450	TTGACCATGAGTGGGATTGG	711 pb
	R	1140-1116	TGGATAAATTATCCAGCCGGACTTC	
<i>proA</i>	F	1090-1107	GATCGCCAATGCAATTAG	481 pb
	R	1570-1553	ACCATAACATCAAAAGCC	
<i>neuA</i>	F	176-196	CCGTTCAATATGGGGCTTCAG	459 pb
	R	634-611	CGATGTCGATGGATTCACTAATAC	

Para confirmar e avaliar a amplificação pela PCR, 3 µL microlitros de cada reação foram misturados com 2 µL de tampão *Blue Juice* 6X e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% /TAE 1X (40mM Tris, 20mM Acetato e 1mM EDTA) após 40 min de corrida à ~70 V. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 5 min.

Os produtos amplificados que apresentaram bandas do tamanho do fragmento esperado, foram purificados com o *kit ChargeSwitch™ PCR Clean-Up* – Invitrogen™ conforme protocolo do fabricante. Os produtos passaram novamente pela análise em eletroforese em gel para averiguar se todas as amostras foram purificadas corretamente.

ii) Sequenciamento parcial

▪ Reação de sequenciamento

Os *amplicons* purificados foram diluídos em água numa razão 1:2 e 1 μL ($\sim 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) de cada diluição foram adicionados a microplaca de 96 poços, cada poço contendo 9 μL do mix da reação de sequenciamento: 6 μL de H_2O , 1 μL (3,2 pM) de *primer*, 1,5 μL (0,75X) de tampão (5X *Sequencing Buffer*) e 0,5 μL de *BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* presentes no kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* da Applied Biosystems™. Para cada um dos genes amplificados, as fitas *forward* e *reverse* foram sequenciadas separadamente.

Os *primers* utilizados na reação foram os mesmos tanto na amplificação primária, quanto no sequenciamento, exceto o *primer reverse* do alvo *mompS* representado na tabela a seguir.

Tabela 3.4. Primer utilizado para o sequenciamento de *mompS reverse*.

Gene	Posição	Sequência (5' – 3')	Anelamento
<i>mompS</i>	1032 – 1015	CAGAAGCTGCGAAATCAG	56,5°C

Após o preparo da reação, a placa foi inserida no termociclador com a seguinte programação: 40 ciclos de 96°C por 10 s; 50°C por 5 s e 60°C por 4 min. Ao finalizar a reação de sequenciamento, a placa permaneceu a 4°C durante a noite.

▪ Precipitação da reação de sequenciamento

Com a reação de sequenciamento pronta foram adicionados 30 μL de isopropanol 75% a cada um dos poços, a placa foi então agitada por 10 s no *vórtex* e permaneceu em temperatura ambiente durante 15 min para a precipitação do DNA.

Em seguida a placa foi centrifugada a 4000 rpm (2132 *xg*) por 45 min a 20°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 50 μL de etanol 75% foram adicionados a placa, que foi centrifugada por mais 15 min a 20°C e 4000 rpm (2132 *xg*). Novamente o sobrenadante foi descartado por inversão da placa em papel toalha, seguido por um *spin* de até 500 rpm (33 *xg*). Por fim, para a secagem completa da placa, a mesma foi incubada no termociclador a 60°C por 10 min.

O conteúdo dos poços foram ressuspensos em 10 μL de formamida e mantidos no termociclador a 95°C por 3 min. Em seguida as placas foram imediatamente colocadas em gelo.

Nesta etapa, a placa foi encaminhada para a plataforma de Genômica do Instituto Oswaldo Cruz, onde o sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger (sequenciamento de DNA por eletroforese capilar) utilizando o sequenciador automático de DNA ABI 3730xL.

O resultado do sequenciamento foi analisado pelo software *Chromas version 2.6.6* (2018) (*Technelysium Pty Ltd*, South Brisbane, Queensland, Australia) antes de seguir para a próxima etapa.

iii) Análise dos dados

A análise das sequências e a interpretação dos resultados foi realizada com auxílio da ferramenta *Sequence Quality Tool* disponível no site (www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq_assemble_legionella1.cgi) do *SBT – Database*.

As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram anexadas a esta ferramenta para a montagem dos *contigs*, no qual a montagem utilizou sequências de referência para realizar a *trimmagem* dos dados. Após a combinação e alinhamento das sequências, a sequência consenso resultante foi submetida ao banco de dados como arquivo de texto e retornou com o tipo de alelo, identificado por um número, de cada um dos genes utilizados na técnica. A combinação dos sete números de cada alelo resulta no ST (*Sequence Typing*) correspondente a cada isolado.

Entretanto, devido a problemas no site, as sequências foram enviadas diretamente a responsável pelo banco de dados, a Dr^a Baharak Afshar do grupo *European Programme for Public Health Microbiology - ECDC*, que analisou os arquivos no software utilizado pelo EWGLI e identificou o ST para cada isolado.

3.5. Construção do dendrograma e *Minimum Spanning Trees*

Os STs identificados e os perfis alélicos parciais foram agrupados em um dendrograma para verificar o nível de similaridade entre os genótipos. Assim, o software *BioNumerics* (versão 5.10; *Applied Maths*, Kortrijk, Bélgica) foi utilizado para a construção de um dendrograma e de uma *Minimum Spanning Tree* (MST).

3.6. Sequenciamento do genoma completo

Com o intuito de enriquecer os dados obtidos e fornecer uma descrição mais ampla sobre as amostras, alguns isolados começaram a ser enviados para o sequenciamento genômico, sendo que até o presente momento apenas duas (37063 e 20935) foram concluídas.

O DNA genômico das amostras 37063 e 20935, previamente quantificados pelo *Qubit 2.0 fluorometer* com o kit *Qubit ds DNA BR* (Invitrogen, *Life Technologies*), foram sequenciados a partir do preparo da biblioteca genômica com o *Nextera ST DNA Library Prep Kit* (Illumina, San Diego, EUA) no Instituto Evandro Chagas, Belém – Pará. Todos os procedimentos foram realizados com base nas orientações do fabricante e as amostras processadas na plataforma *NextSeq 500* (Illumina, San Diego, EUA) com 2x150 pb *paired-end reads*, ou seja, a biblioteca genômica de cada isolado foi aplicada em canais diferentes originando arquivos *forward* e *reverse* (R1 e R2, respectivamente).

A análise de Bioinformática seguiu o *pipeline* disponível publicamente em https://github.com/bioinformatics-lab/dandrea_legionella_nf, conforme o fluxograma descrito na Figura 3.1.

O controle de qualidade das *reads* foi realizado utilizando o programa *FastQC* v.0.11.9 (50), e, a seguir foi realizado a remoção de *reads* com baixa qualidade (*trimming*) utilizando o programa *Trimmomatic* v.0.36 (51), seguindo de nova verificação da qualidade através do *FastQC* v.0.11.9 e concatenação destes resultados em um único arquivo através do *MultiQC* v.1.9 (52). A montagem *de novo* foi realizada utilizando o programa *Unicycler* v.0.4.8 (53) e posteriormente houve uma etapa de filtragem para selecionar apenas *contigs* com tamanhos acima de 200 pb. A qualidade desta montagem foi avaliada utilizando o programa *Quast* v.5.0.2 (54). A anotação genômica foi realizada no programa *Prokka* v.1.14.6 (55), a partir do qual foi obtida a sequência do gene 16S RNA e adicionada na plataforma <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para a identificação da espécie utilizando o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). A cobertura média do genoma foi estimada a partir da seguinte fórmula: $(\text{total de reads} \times \text{comprimento das reads} \times 2) / \text{tamanho do genoma de referência}$.

A partir das espécies sugeridas, foi então realizada a busca pela referência genômica e, posteriormente, sendo: *L. pneumophila* NZ_CP013742.1(3,409.143 pb) e *L. anisa* NZ_CP029563.1 (4,164.783 pb) para as amostras 20935 e 37063, respectivamente, Foi utilizado o programa *FastANI* v.1.32 (56), o qual calcula a identidade média de nucleotídeos (ANI) de pares de genes ortólogos do genoma inteiro compartilhados entre dois

genomas microbianos para verificar se é a mesma espécie que o genoma de referência ($\geq 95\%$ ANI).

O mapeamento contra as referências foi realizado no programa *Bionumerics*® v.6.0 (*Biomérieux, Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica*), para a obtenção das variantes (SNPs) entre o genoma das amostras e suas referências para visualização gráfica. O programa Snippy v.4.6.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>) foi utilizado para a obtenção de SNPs, inserções e deleções (INDELS). Para a predição de plasmídeo *in silico* foi utilizado o programa *PlasmidFinder* v.2.0.1 (57).

As etapas do sequenciamento genômico estão destacadas no fluxograma da Figura 3.1.

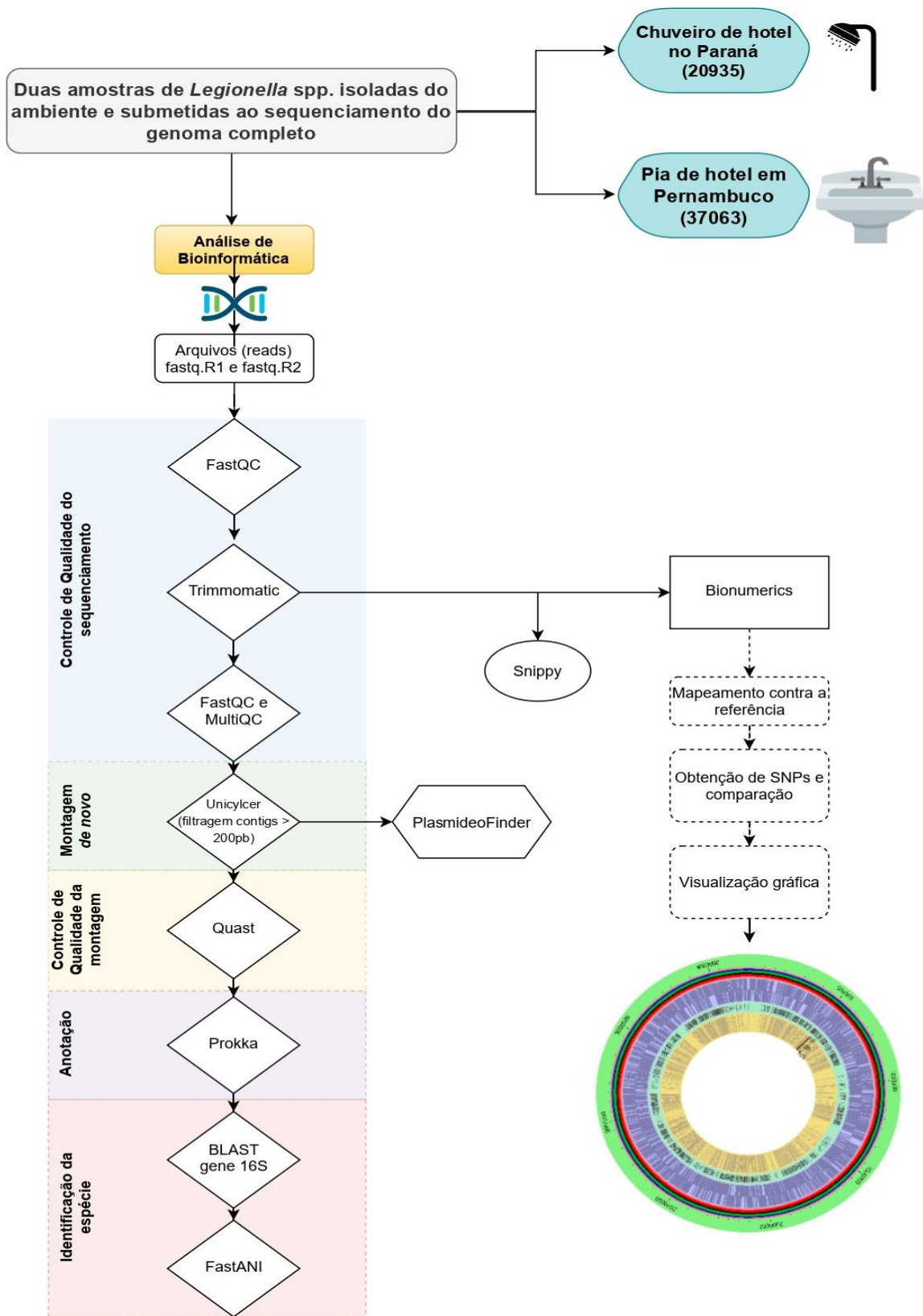


Figura 3.1. Etapas da análise de Bioinformática para dois genomas de *Legionella* spp.

4. RESULTADOS

4.1. Amostras de *Legionella* spp.

O material analisado pela Conforlab foi coletado em nove estados brasileiros (SP, RJ, MG, PR, RS, SE, PE, BA e GO) nos anos de 2015, 2018 e 2019 a partir de diversas fontes como pias e torneiras, chuveiros, torres de resfriamento etc. (Tabela 3.2). Entre as 50 amostras fornecidas pela empresa, sete são do ano de 2015, 23 de 2018 e 20 isolados de 2019, como mostra a tabela 3.2. Este material cedido pela Conforlab representa apenas uma parcela das amostras obtidas pela empresa nesse período.

Com relação a distribuição geográfica, cinquenta por cento das nossas amostras foram isoladas a partir do material coletado no estado de São Paulo e, embora a amostragem inclua ao menos uma cepa representativa de cada região (exceto da região norte), 70% delas se concentram no sudeste do país, seguida pelo nordeste (16%), sul (12%) e apenas um isolado do centro-oeste do país (2%).

Os hotéis representaram o local de coleta de 72% das amostras obtidas, seguido de *shoppings* (10%) e centros comerciais (10%). Os outros 8% restantes estão divididos entre empresa, indústria de alimentos e laboratório. A origem da maioria das amostras foram torneiras, representando 32% das amostras, chuveiros em 26% dos casos, torres de resfriamento (22%) e *boiler* (10%). A presença de *Legionella* sp. também foi identificada em um bebedouro (2%) e num reservatório de água (2%). A origem exata das outras três amostras não ficou clara, a informação se refere apenas ao ambiente em que as amostras foram coletadas (apartamento, copa e WC masculino).

Entre as 50 culturas recebidas 26 (52%) culturas apresentaram até cinco colônias. Em alguns casos (16 isolados) as placas apresentaram contaminação por outros microrganismos, o que dificultou a realização da criopreservação para manutenção da biblioteca microbiológica e a extração de DNA. Portanto, devido à necessidade de uma maior massa bacteriana, algumas colônias foram subcultivadas em meio BCYE com condições adequadas (37°C, CO₂ e umidade). Entre as nove cepas do ano de 2019 com menos de cinco colônias, sete exibiram mais de 15 UFC após repique, ou seja, uma otimização de até 77%.

As primeiras colônias foram observadas 48h após a inoculação em meio de cultura, porém o intervalo para crescimento pode ser de 14 dias. Conforme descrito na literatura, observamos que as colônias de *Legionella* spp. apresentaram como principal característica a aparência de vidro moído, cujo centro da colônia com uma cor branca ou cinza mais escura, envolta por um alo quase transparente. As colônias podem crescer dispersas e bem definidas no meio ou enfileiradas quase formando um rastro (Figura 4.1).

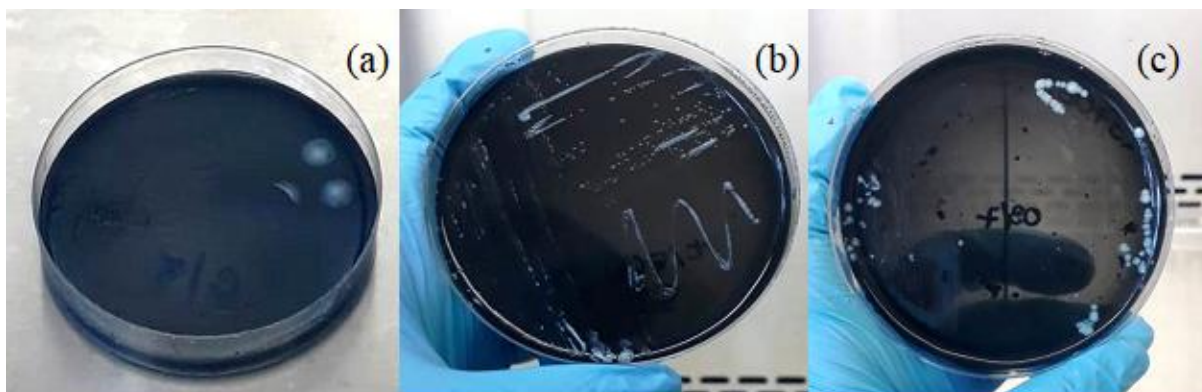


Figura 4.1. Amostras de *Legionella* spp. cultivados em meio BCYE. **(a)** Amostra 20935 recebida em nosso laboratório após um mês da análise realizada na Conforlab. A placa apresenta colônias mais antigas com aparência mais opaca e alo bem definido. **(b)** Repique da amostra 67865 após 5 dias de cultura. **(c)** Repique das amostras 37063/37065 após 5 dias de cultivo. As colônias mais jovens (b) e (c) têm aparência mais luminosa e se assemelham a “vidro moído”.

4.2. Extração de DNA

Foi possível extrair o DNA de todas as amostras como mostra a tabela 3.2. As concentrações mais baixas foram obtidas para as amostras 66905 (0,05 ng/ μ L) e 66907 (0,06 ng/ μ L) que apresentaram apenas uma colônia e presença de contaminação na placa. As concentrações de DNA mais elevadas foram obtidas nas amostras 18HP06 (323,2 ng/ μ L) e 18HP08 (326,3 ng/ μ L) que apresentaram 40 UFCs e 30 UFCs respectivamente. A comparação entre o número de colônias e a concentração do DNA bacteriano pode ser observada no gráfico da figura 4.2.

O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r) apresentou uma correlação positiva moderada (0,37) entre a concentração do DNA obtido e o número de colônias das amostras, como mostra a figura 4.3.

O DNA extraído foi utilizado para a realização da identificação molecular das amostras de *Lp* na etapa seguinte.

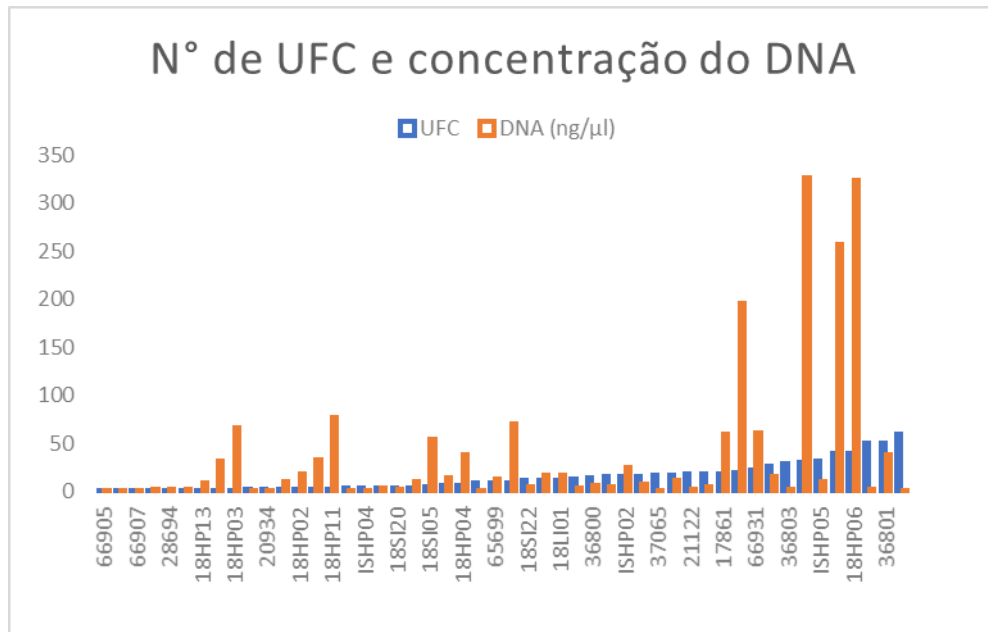


Figura 4.2. Concentração do DNA bacteriano e o número de colônias de cada amostra.

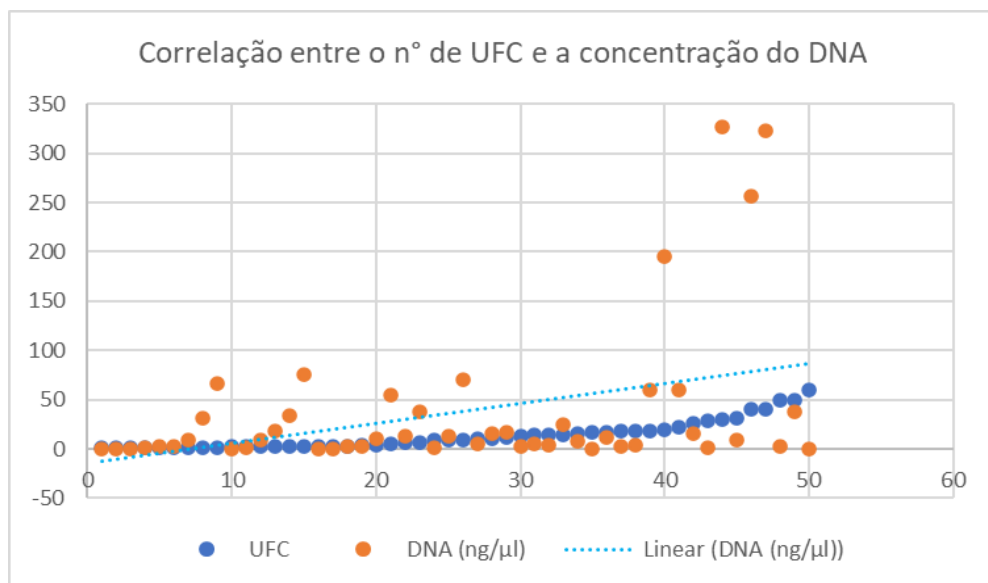


Figura 4.3. Correlação entre o número de colônias e a concentração do DNA bacteriano obtido. O valor de $(r) = 0,374$.

4.3. Amplificação primária

A identificação molecular pelo método *Sequence-based Typing* (SBT) utiliza como marcadores sete genes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) que devem ser amplificados e posteriormente sequenciados.

Sendo assim, a padronização da PCR utilizada para a amplificação primária dos sete alvos foi realizada com a cepa de *L. pneumophila* ATCC 33152 seguindo as orientações do protocolo proposto pelo EWGLI. As sete reações de PCR foram feitas – uma para cada gene – utilizando as mesmas condições para o *mix* da reação e a mesma ciclagem térmica com temperatura de anelamento de 56,5°C para os sete alvos. Como demonstrado na figura 4.4 os sete genes foram amplificados corretamente e apresentaram o tamanho dos fragmentos esperados.

A cepa *L. pneumophila* ATCC 33152 utilizada na padronização da PCR e como controle positivo foi doada pela Conforlab.

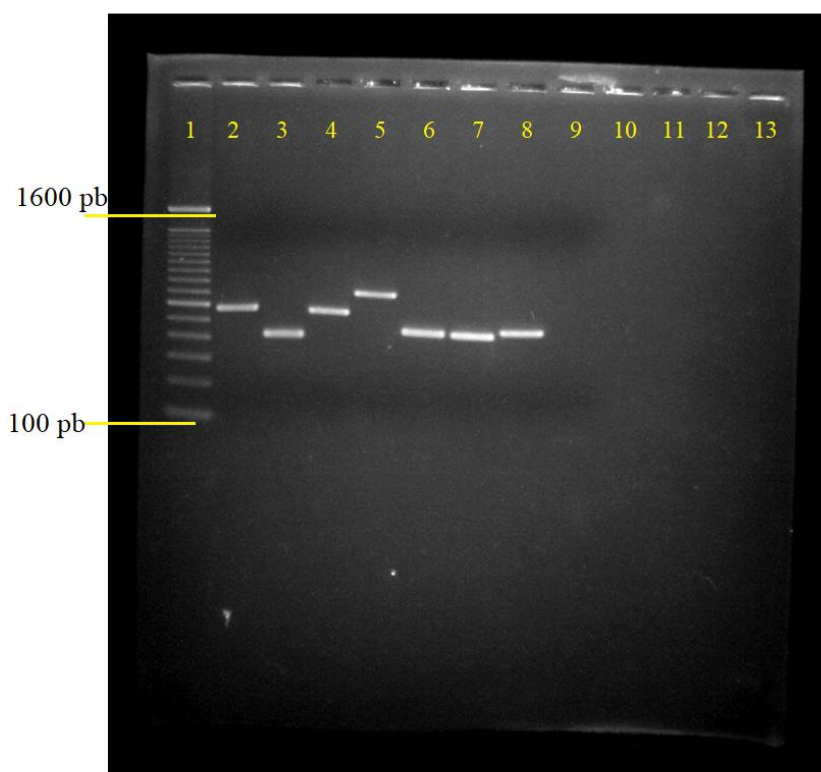


Figura 4.4. Padronização da PCR, utilizando a cepa de *Lp* ATCC 33152, para amplificação dos sete alvos relacionados à identificação molecular de *Lp* – Gel de agarose 1,5% em TAE 1X, corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml. 1: marcador molecular 100 pb *ladder*; 2: fragmento de 576 pb do gene *asd*; 3: fragmento de 414 pb do gene *flaA*; 4: fragmento de 559 pb do gene *mip*; 5: fragmento de 711 pb do gene *mompS*; 6: fragmento de 459 pb do gene *neuA*; 7: fragmento de 460 pb do gene *pilE*; 8: fragmento de 481 pb do gene *proA* e 9: controle negativo.

Após a padronização, realizou-se a PCR com o DNA extraído das 50 amostras de *Legionella* spp. A PCR foi realizada para cada um dos sete genes individualmente como mostra a figura 4.5 que representa o resultado da amplificação dos genes *flaA* e *mip* analisado pela eletroforese em gel de agarose 1,5%, no qual os produtos apresentaram o tamanho esperado de 414 pb e 559 pb respectivamente. O processo foi o mesmo para os sete alvos.

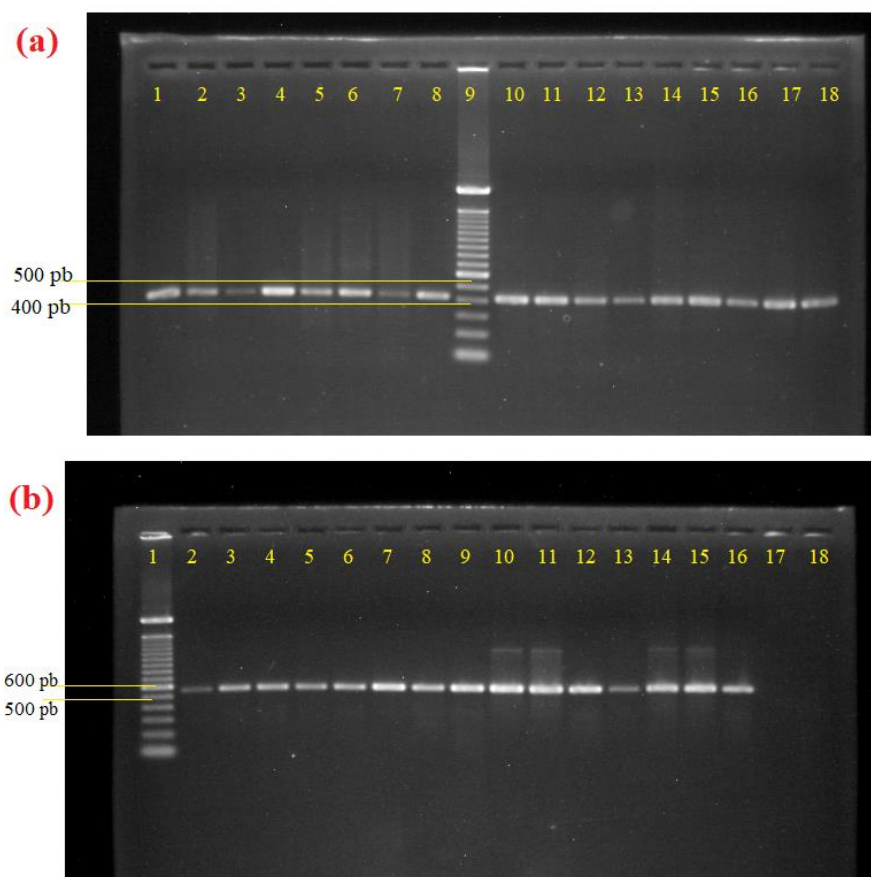


Figura 4.5. Análise da amplificação dos genes (a) *flaA* e (b) *mip* – Gel de agarose 1,5% em TAE 1X, corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml. (a) Amplificação do gene *flaA* nas amostras: ATCC (1), 37065 (2), 66907 (3), 18HP02 (4), 18HP06 (5), 18HP07 (6), 18HP08 (7), 18HP10 (8), 18HP12 (10), 18HP13 (11), 18HP14 (12), 18HP15 (13), 18HP16 (14), 18HP17 (15), 18HP18 (16), 18HP19 (17) e 18SI05 (18), marcador molecular de 100 pb (9). (b) Amplificação do gene *mip* nas amostras: ATCC (2), 18HP02 (3), 18HP03 (4), 18HP10 (5), 18HP13 (6), 18HP15 (7), 18HP17 (8), 18HP18 (9), 18HP19 (10), 18SI05 (11), 18SI20 (12), 18SI21 (13), 18SI22 (14), ISHP03 (15), ISHP06 (16). Controle negativo (17) e (1) marcador molecular de 100 pb.

No total 46 amostras tiveram os sete genes amplificados corretamente, como consta na tabela 4.1. Apenas 4 amostras não tiveram os sete alvos amplificados nesta reação de PCR inicial.

Para o alvo *flaA* e *plIE* todas as amostras foram amplificadas. Nas amostras 17861, 66907 e 18HP08, o gene *asd* não foi amplificado. Para *mip* e *neuA* não houve a amplificação apenas na cepa 18SI28, e o mesmo ocorreu com os alvos *mompS* e *proA* no isolado 18HP08. Sendo assim, esses isolados não tiveram seu ST analisado devido à ausência de alguns marcadores.

Tabela 4.1. Amplificação primária dos genes analisados na identificação molecular de *Lp*.

ISOLADO	FLAA	PLIE	ASD	MIP	MOMPS	PROA	NEUA
17861	X	X	-	X	X	X	X
20934	X	X	X	X	X	X	X
20935	X	X	X	X	X	X	X
21121	X	X	X	X	X	X	X
21122	X	X	X	X	X	X	X
21123	X	X	X	X	X	X	X
28694	X	X	X	X	X	X	X
36800	X	X	X	X	X	X	X
36801	X	X	X	X	X	X	X
36802	X	X	X	X	X	X	X
36803	X	X	X	X	X	X	X
37063	X	X	X	X	X	X	X
37064	X	X	X	X	X	X	X
37065	X	X	X	X	X	X	X
44501	X	X	X	X	X	X	X
65699	X	X	X	X	X	X	X
66905	X	X	X	X	X	X	X
66907	X	X	-	X	X	X	X
66931	X	X	X	X	X	X	X
67865	X	X	X	X	X	X	X
18HP02	X	X	X	X	X	X	X
18HP03	X	X	X	X	X	X	X
18HP04	X	X	X	X	X	X	X
18HP06	X	X	X	X	X	X	X
18HP07	X	X	X	X	X	X	X
18HP08	X	X	X	X	-	-	X
18HP10	X	X	X	X	X	X	X
18HP11	X	X	X	X	X	X	X
18HP12	X	X	X	X	X	X	X
18HP13	X	X	X	X	X	X	X
18HP14	X	X	X	X	X	X	X
18HP15	X	X	X	X	X	X	X
18HP16	X	X	X	X	X	X	X
18HP17	X	X	X	X	X	X	X

18HP18	x	x	x	x	x	x	x
18HP19	x	x	x	x	x	x	x
18LI01	x	x	x	x	x	x	x
18LP09	x	x	x	x	x	x	x
18SI05	x	x	x	x	x	x	x
18SI20	x	x	x	x	x	x	x
18SI21	x	x	x	x	x	x	x
18SI22	x	x	x	x	x	x	x
18SI28	x	x	x	-	x	x	-
ATCC	x	x	x	x	x	x	x
ISHP01	x	x	x	x	x	x	x
ISHP02	x	x	x	x	x	x	x
ISHP03	x	x	x	x	x	x	x
ISHP04	x	x	x	x	x	x	x
ISHP05	x	x	x	x	x	x	x
ISHP06	x	x	x	x	x	x	x
ISHP07	x	x	x	x	x	x	x

x = gene amplificado. - = gene não amplificado.

4.4. Sequenciamento parcial

Os *amplicons* obtidos na amplificação primária foram então sequenciados. O resultado das placas de sequenciamento foi fornecido como cromatograma (formato *.abi*) que permitiu a análise prévia das sequências pelo software *Chromas version 2.6.6* (2018) antes de serem avaliados pelo *Sequence Quality Tool*.

Sabe-se que o sequenciamento é realizado através da incorporação de dideoxynucleotídeos (ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP) no DNA alvo. Estes dideoxynucleotídeos foram marcados com corantes diferentes que são iluminados por um *laser* que permite a detecção do respectivo fluoróforo. Cada cor representa uma base nitrogenada e estas cores são registradas para a construção daquele fragmento de DNA em análise. Portanto, os dados da sequência foram registrados através de uma série de picos em intensidade de fluorescência que formam o cromatograma. Sendo assim, nesta etapa foi avaliado se a reação de sequenciamento ocorreu corretamente através da análise do cromatograma.

Como mostra a figura a seguir (figura 4.6), um fragmento de DNA sequenciado corretamente apresenta uma série de picos bem definidos ao longo da sequência. Já nas reações em que ocorreram contaminação da amostra devido a manipulação incorreta no momento de aplicar o

DNA na placa, o cromatograma se apresenta como na figura 4.7 - (A), no qual o pico de luminosidade não é lido corretamente pelo detector. A ausência de DNA, ou baixa concentração dos demais reagentes apresenta um cromatograma como na figura 4.7 - (B).

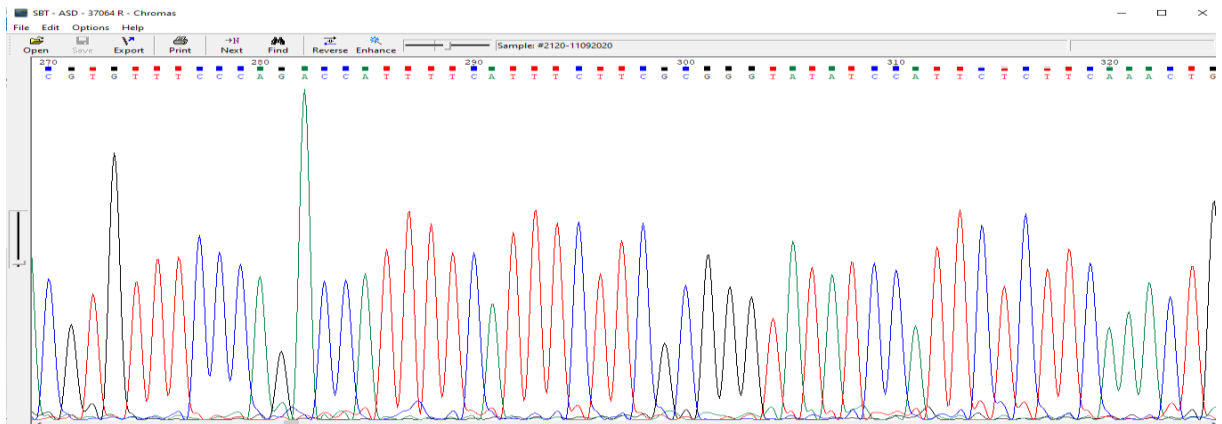


Figura 4.6. Cromatograma do sequenciamento da fita *reverse* do gene *asd* (amostra 37064). De acordo com o cromatograma a seqüência apresenta uma boa qualidade devido à série de picos de luminescência de alta intensidade.

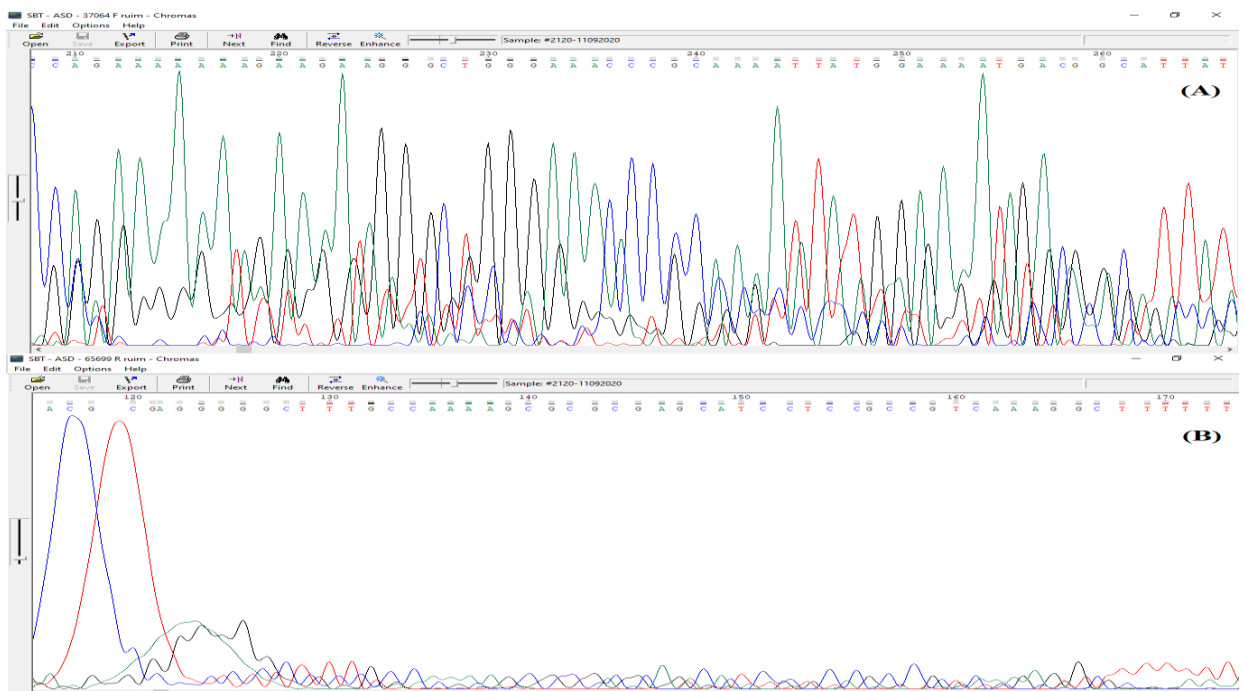


Figura 4.7. Cromatograma do sequenciamento da fita (A) *forward* do gene *asd* (amostra 37064) e (B) da fita *reverse* do gene *asd* (amostra 65699). (A) indica uma contaminação com o DNA de outro isolado. (B) indica uma baixa concentração dos reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

O sequenciamento de 40 amostras apresentou seqüências bem definidas para as fitas *forward* e *reverse* o que permitiu que estes dados fossem enviados para as próximas etapas. Apenas as seqüências dos alelos *asd* (18HP18) e *mompS* (21121, 36801, 37063, 44501, 18HP07) não

foram sequenciados corretamente. Portanto, estas seis amostras não prosseguiram para a identificação do perfil alélico das cepas.

4.5. *Sequence Quality Tool*

As sequências que apresentaram boa qualidade na análise do cromatograma foram então enviadas para a identificação do perfil alélico (ST) através da ferramenta *Sequence Quality Tool* (SQT). Esta ferramenta reuniu as sequências dos sete genes e avaliou o tamanho dos fragmentos, a qualidade média e a presença dos marcadores inicial e final (Figura 4.8).

As sequências que passaram por esses critérios seguiram para a identificação alélica de cada um dos genes utilizando este mesmo *software*. Nesta etapa, a comparação das sequências obtidas contra as sequências de referência pode resultar na combinação mais próxima ou a combinação exata com um alelo já descrito (Figura 4.8). A junção dos sete alelos identificados, representados por números, resulta no tipo de sequência (ST).

Allele	Length	Average Quality	Start Marker?	End Marker?	Correct Size	Sequence ID's(Length) (Average Quality)	Closest Match	Exact Match	Quality Test Pass
pilE	459	70.99	yes	yes	yes	SBT_-_PILE_-_ISHP03_R.ab1(405)(46.08)SBT_-_PILE_-_ISHP03_F.ab1(311)(54.47)	17	0	yes
asd	556	79.69	yes	yes	yes	SBT_-_ASD_-_ISHP03_R.ab1(511)(54.65)SBT_-_ASD_-_ISHP03_F.ab1(416)(55.45)	1	0	yes
mip	530	86.89	yes	yes	yes	SBT_-_MIP_-_ISHP03_R.ab1(501)(56.27)SBT_-_MIP_-_ISHP03_F.ab1(473)(62.61)	0	53	yes
mompS	698	87.39	yes	yes	yes	SBT_-_MOMPS_-_ISHP03_R.ab1(491)(61.57)SBT_-_MOMPS_-_ISHP03_F.ab1(590)(58.63)	0	14	yes
proA	460	86.35	yes	yes	yes	SBT_-_PROA_-_ISHP03_R.ab1(425)(59.47)SBT_-_PROA_-_ISHP03_F.ab1(417)(61.70)	0	1	yes
neuA	431	89.76	yes	yes	yes	SBT_-_NEUA_-_ISHP03_R.ab1(399)(61.07)SBT_-_NEUA_-_ISHP03_F.ab1(394)(62.03)	0	21	yes

Sequence Type match = ST none

Please repeat flaA, pilE and asd. Unable to analyse due to poor sequence quality.

This partial profile returned no potential STs, it is likely a novel ST.

ES 21/12/2020

Figura 4.8. Avaliação da qualidade das sequências e identificação do perfil alélico pelo software *Sequence Quality Tool*.

Entre as 50 amostras fornecidas pela Conforlab, foi possível sequenciar os sete alvos utilizados na técnica SBT em 40 cepas. A avaliação completa feita pelo SQT realizada para os 40 isolados e a identificação dos alelos está detalhada na Tabela 4.3.

As sequências destas 40 amostras analisadas pela ferramenta *Sequence Quality Tool* apresentaram 11 STs para 34 isolados, dos quais oito foram STs previamente conhecidos (ST1, ST80, ST152, ST242, ST664, ST1185, ST1464 e ST1642) e 3 foram STs novos (ST2960, ST2962 e ST2963). As outras seis amostras apresentaram apenas um perfil alélico parcial, impossibilitando assim a definição precisa de um ST (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. *Sequence Type* e perfil alélico parcial identificados pela SBT e origem das amostras.

ID	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	ST	Estado	Origem
36800	1	4	3	1	1	1	1	1	SE	Torneira
36802	1	4	3	1	1	1	1	1	SE	Boiler
36803	1	4	3	1	1	1	1	1	SE	Torneira
18HP03	1	4	3	1	1	1	1	1	SP	Torneira
18HP06	1	4	3	1	1	1	1	1	SP	Torneira
18HP13	1	4	3	1	1	1	1	1	SP	Reservatório
18HP15	1	4	3	1	1	1	1	1	MG	Boiler
18HP16	1	4	3	1	1	1	1	1	MG	Torneira
18HP19	1	4	3	1	1	1	1	1	RJ	Torneira
ISHP01	1	4	3	1	1	1	1	1	SP	Pia
ISHP02	1	4	3	1	1	1	1	1	GO	Torneira
ISHP04	1	4	3	1	1	1	1	1	MG	Torneira
ISHP05	1	4	3	1	1	1	1	1	MG	Copa
ISHP06	1	4	3	1	1	1	1	1	MG	Bebedouro
ISHP07	7	6	3	8	13	11	3	80	RS	Torneira
18HP04	1	4	3	1	1	1	3	152	SP	Boiler
18HP02	3	10	1	28	1	9	3	242	SP	Torneira
18HP17	3	10	1	28	1	9	3	242	SP	Boiler
21122	3	13	1	3	14	9	9	664	PR	Chuveiro
21123	3	13	1	3	14	9	9	664	PR	Torneira
18LP09	3	14	16	16	15	13	2	1185	SP	Chuveiro
20934	2	10	15	28	19	4	3	1464	PR	Torneira
20935	2	10	15	28	19	4	3	1464	PR	Chuveiro
18HP11	3	6	1	28	14	9	3	1642	SP	Boiler
28694	1	4	3	1	1	1	21	2960	RJ	TDR
65699	1	4	3	1	1	1	21	2960	SP	Chuveiro

67865	1	4	3	1	1	1	21	2960	SP	TDR
18LI01	1	4	3	1	1	1	21	2960	SP	TDR
18SI05	1	4	3	1	1	1	21	2960	SP	TDR
18SI20	1	4	3	1	1	1	21	2960	SP	TDR
18SI21	1	4	3	1	1	1	21	2960	SP	TDR
18SI22	1	4	3	1	1	1	21	2960	SP	TDR
18HP10	20	26	27	34	46	27	1	2962	SP	Chuveiro
18HP12	3	6	1	28	14	9	3	2963	SP	Chuveiro
37064	3	4	x	1	14	x	1	ND *	PE	Chuveiro
37065	x	12	31	6	48	31	3	ND *	PE	Pia
66905	28	21	12	19	0	21	0	ND *	SP	TDR
ISHP03	x	0	0	53	14	1	21	ND *	BA	Apartamento
18HP14	3	13	1	3	x	9	1	ND *	RJ	Chuveiro
66931	16	21	12	19	31	21	0	ND **	SP	TDR

x = alelo não identificado devido à baixa qualidade de sequência; 0 = não foi possível identificar o alelo exato, apenas o mais próximo; ND = ST não identificado; * baseado nos alelos identificados é provavelmente um novo ST; ** baseado nos alelos identificados pode ser tanto um novo ST quanto um ST previamente descrito.

Entre as 34 cepas com ST identificado, o ST1 foi o mais comum, representando 41% dos STs encontrados, seguido pelo ST2960 (23%). Os STs 1464 e 664 foram identificados em duas amostras (6% cada). Os perfis ST242, ST152, ST1642, ST1185, ST80, ST2962 e ST2963 foram identificados em apenas um isolado cada. A frequência dos STs pode ser observada na figura a seguir.

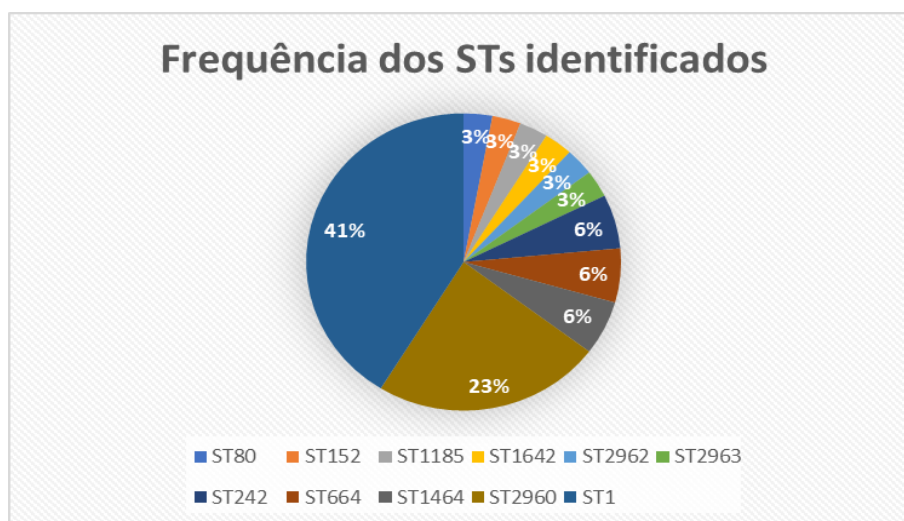


Figura 4.9. Gráfico da frequência dos STs identificados nos isolados ambientais brasileiros.

A amostra 37064 não teve um ST definido devido à baixa qualidade das sequências de *asd* e *proA*. Embora não tenha sido possível identificar todos os alelos, o perfil alélico parcial indica que provavelmente trata-se de um novo ST. A amostra 37065 apresentou apenas um perfil alélico parcial devido a baixa qualidade de sequência do gene *flaA* e os alelos identificados sugerem que este isolado também seja um novo ST, porém, diferente da amostra 37064 (Tabela 4.2).

Apesar de *mompS* e *neuA* apresentarem uma boa média de qualidade (80.67% e 77.94%, respectivamente), as sequências obtidas não forneceram uma combinação exata para estes alelos da amostra 66905, apenas a combinação mais próxima (Tabela 4.3). O ST parcial também não encontrou nenhum ST em potencial, indicando, provavelmente, um novo tipo de sequência.

O ST de 66931 também não foi definido devido à baixa qualidade de sequência de *neuA*, o qual foi possível identificar apenas a combinação mais próxima (Tabela 4.3). Este perfil parcial é consistente com os STs 1317, 1911, 1919, 2247 (presentes no banco de dados) como também há a possibilidade de ser um novo ST.

A sequência de *mompS* da cepa 18HP14 não apresentou o tamanho correto devido à ausência do marcador inicial, portanto, não foi possível identificar a combinação exata ou a mais próxima. O perfil parcial parece ser um ST conhecido, como também há a possibilidade de ser um novo ST.

A amostra ISHP03 também não teve seu perfil alélico definido devido à baixa qualidade de sequência de *flaA*, *pilE* e *asd*, sendo que os dois últimos identificaram apenas a combinação mais próxima (Tabela 4.3). O ST parcial não retornou nenhum ST provável, indicando a possibilidade de um novo ST.

Tabela 4.3. Análise pelo *Sequence Quality Tool* e a *Sequence Type* (ST) de cada isolado.

ID	<i>flaA</i>			<i>pilE</i>			<i>asd</i>			<i>Mip</i>			<i>mompS</i>			<i>proA</i>			<i>neuA</i>			ST
	Q%	CP	CE	Q%	CP	CE	Q%	CP	CE	Q%	CP	CE	Q%	CP	CE	Q%	CP	CE	Q%	CP	CE	
20934	86.62	0	2	76.88	0	10	88.25	0	15	88.15	0	28	88.49	0	19	82.17	0	4	89.42	0	3	1464
20935	77.25	0	2	79.67	0	10	87.84	0	15	87.57	0	28	86.29	0	19	77.63	0	4	89.41	0	3	1464
21122	77.85	0	3	78.88	0	13	85.08	0	1	87.47	0	3	87.82	0	14	78.10	0	9	84.87	0	9	664
21123	76.03	0	3	80.72	0	13	85.25	0	1	87.59	0	3	87.68	0	14	74.43	0	9	74.84	0	9	664
28694	85.20	0	1	75.17	0	4	82.98	0	3	78.78	0	1	88.36	0	1	81.60	0	1	88.51	0	21	2960
36800	86.33	0	1	85.22	0	4	83.49	0	3	87.92	0	1	84.78	0	1	83.12	0	1	86.64	0	1	1
36802	74.67	0	1	85.01	0	4	86.92	0	3	86.79	0	1	84.80	0	1	78.75	0	1	88.59	0	1	1
36803	76.43	0	1	81.23	0	4	86.38	0	3	84.99	0	1	87.60	0	1	85.35	0	1	78.55	0	1	1
37064	70.66	0	3	75.45	0	4	BQS	x	x	79.07	0	1	86.47	0	14	BQS	x	X	84.97	0	1	*
37065	BQS	x	x	83.48	0	12	88.73	0	31	85.95	0	6	88.23	0	48	86.85	0	31	85.10	0	3	*
65699	84.49	0	1	72.46	0	4	86.67	0	3	86.71	0	1	83.51	0	1	85.18	0	1	88.40	0	21	2960
66905	70.49	0	28	78.8	0	21	83.39	0	12	81.48	0	19	80.67	70	0	85.89	0	21	77.94	3	0	*
66931	77.21	0	16	80.53	0	21	87.55	0	12	80.96	0	19	88.35	0	31	82.76	0	21	82.54	13	0	**
67865	73.66	0	1	81.26	0	4	88.20	0	3	87.90	0	1	87.32	0	1	84.44	0	1	89.59	0	21	2960
18HP02	86.29	0	3	79.24	0	10	84.63	0	1	83.60	0	28	88.93	0	1	82.42	0	9	85.47	0	3	242
18HP03	84.72	0	1	82.16	0	4	88.98	0	3	79.13	0	1	85.05	0	1	82.74	0	1	88.30	0	1	1
18HP04	85.84	0	1	85.94	0	4	87.84	0	3	83.34	0	1	88.58	0	1	82.86	0	1	79.65	0	3	152
18HP06	78.04	0	1	86.93	0	4	88.12	0	3	85.21	0	1	87.77	0	1	78.35	0	1	89.44	0	1	1

18HP10	71.30	0	20	78.53	0	26	88.27	0	27	77.40	0	34	81.65	0	46	86.20	0	27	83.73	0	1	2962
18HP11	88.01	0	3	83.39	0	6	88.01	0	1	86.63	0	28	88.23	0	14	79.95	0	9	79.95	0	3	1642
18HP12	86.37	0	16	78.49	0	21	89.20	0	12	86.64	0	19	88.51	0	31	82.17	0	21	76.94	0	21	2963
18HP13	85.93	0	1	81.22	0	4	88.37	0	3	86.62	0	1	88.71	0	1	80.84	0	1	87.90	0	1	1
18HP14	87.00	0	3	80.91	0	13	85.19	0	1	78.12	0	3	76.03	na	na	78.96	0	9	84.71	0	1	*
18HP15	85.03	0	1	76.08	0	4	80.19	0	3	84.27	0	1	88.78	0	1	76.22	0	1	84.84	0	1	1
18HP16	89.76	0	1	81.02	0	4	84.61	0	3	83.73	0	1	88.11	0	1	86.78	0	1	86.89	0	1	1
18HP17	87.66	0	3	78.75	0	10	88.00	0	1	81.26	0	28	88.16	0	1	80.36	0	9	88.47	0	3	242
18HP19	86.41	0	1	79.46	0	4	86.32	0	3	84.22	0	1	87.16	0	1	86.81	0	1	81.67	0	1	1
18LI01	88.60	0	1	82.53	0	4	82.66	0	3	84.42	0	1	84.99	0	1	82.28	0	1	84.74	0	21	2960
18LP09	83.84	0	3	73.17	0	14	81.88	0	16	82.28	0	16	87.95	0	15	78.66	0	13	88.92	0	2	1185
18SI05	80.60	0	1	81.32	0	4	87.76	0	3	85.30	0	1	85.98	0	1	86.22	0	1	86.51	0	21	2960
18SI20	82.85	0	1	79.19	0	4	88.70	0	3	85.86	0	1	87.86	0	1	85.13	0	1	86.79	0	21	2960
18SI21	84.34	0	1	84.7	0	4	88.52	0	3	85.19	0	1	87.39	0	1	83.10	0	1	84.08	0	21	2960
18SI22	83.97	0	1	83.62	0	4	85.44	0	3	84.36	0	1	87.88	0	1	79.83	0	1	88.80	0	21	2960
ISHP01	86.75	0	1	83.67	0	4	84.37	0	3	83.74	0	1	87.57	0	1	82.46	0	1	89.13	0	1	1
ISHP02	82.92	0	1	83.01	0	4	84.25	0	3	85.75	0	1	85.27	0	1	83.07	0	1	88.66	0	1	1
ISHP03	BQS	x	x	70.99	17	0	79.69	1	0	86.89	0	53	87.39	0	14	86.35	0	1	89.76	0	21	*
ISHP04	82.34	0	1	76.17	0	4	84.30	0	3	87.44	0	1	87.49	0	1	82.46	0	1	88.38	0	1	1
ISHP05	85.27	0	1	84.83	0	4	86.06	0	3	84.51	0	1	87.59	0	1	85.05	0	1	88.31	0	1	1
ISHP06	87.11	0	1	87.11	0	4	77.43	0	3	83.50	0	1	87.12	0	1	76.10	0	1	87.69	0	1	1
ISHP07	88.84	0	7	85.32	0	6	89.18	0	3	84.38	0	8	79.90	0	13	72.90	0	11	87.00	0	3	80

BQS: baixa qualidade de sequência. na: não aplicável. * perfil parcial indica um novo ST. ** o perfil parcial indica um ST conhecido, como também há probabilidade de se tratar de um novo perfil.

4.6. Dendrograma e MST

O dendrograma agrupou os dados obtidos com a identificação do perfil alélico das amostras de acordo com a similaridade entre eles. O grau de similaridade entre os STs obtidos, origem da amostra e estado estão representados na figura 4.10.

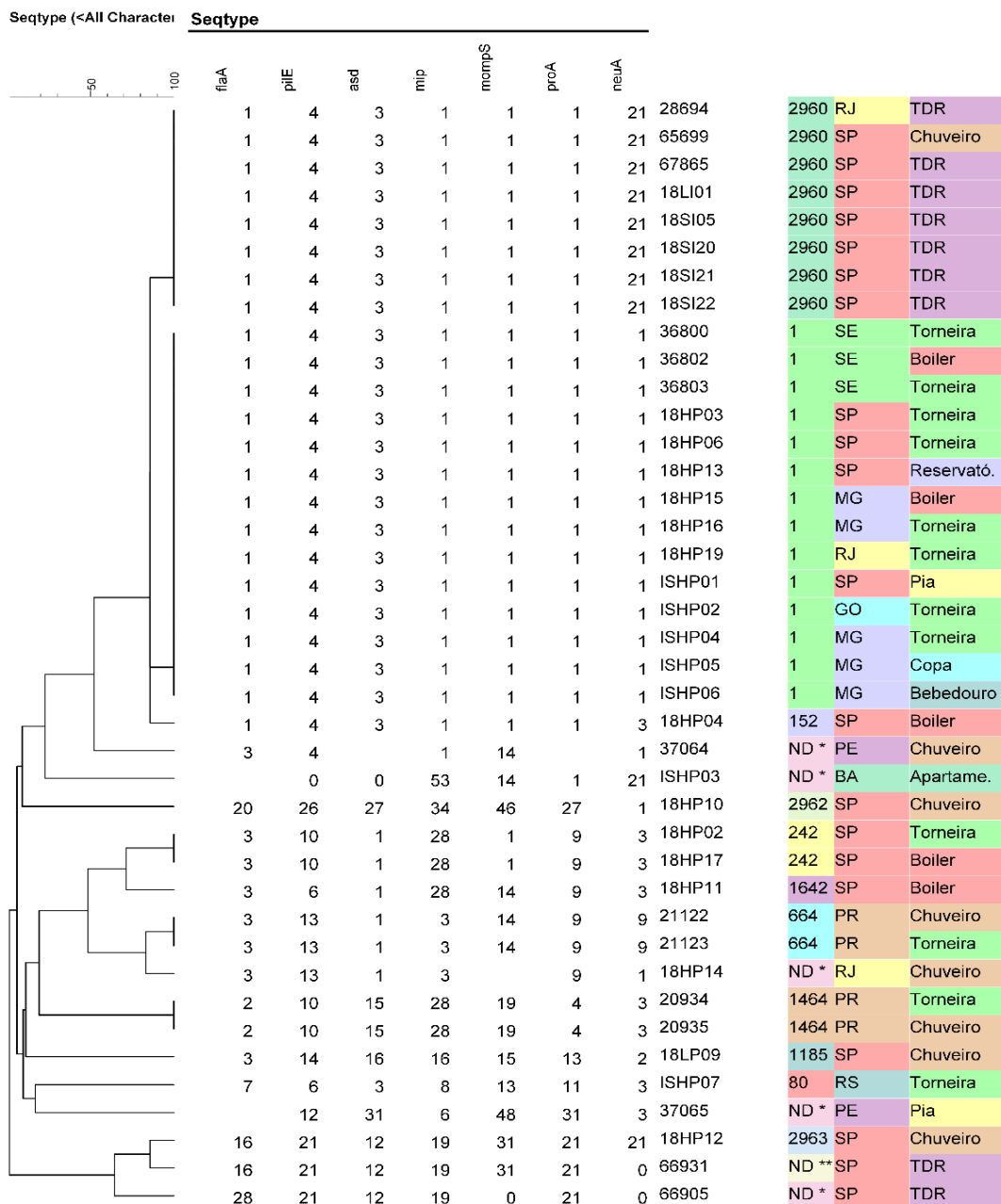


Figura 4.10. Resultado do agrupamento de dados obtidos pela análise SBT. Os alelos e STs, ID das amostras, estado e origem são apresentados no dendrograma. ST = sequence type; ND = ST não definido; * = indica a possibilidade de ser um novo ST ** = indica a possibilidade de ser um novo ST, ou um ST previamente descrito; TDR = Torre de resfriamento.

O maior *cluster* foi formado pelo ST1, ST152 e ST2960 que diferem em apenas um *locus* (*neuA*). Embora a amostra 37064 não tenha um ST definido os alelos identificados indicam que esta cepa também faz parte deste cluster, pois o único *locus* que difere dos STs acima é *mompS*. Para confirmar a relação exata entre o genótipo dessas amostras e os STs descritos acima é necessário um novo sequenciamento dos alelos que não foram determinados (*asd* e *proA*).

Os STs ST242 e ST1642 possuem apenas dois *loci* diferentes *pile* e *mompS*. Embora ST1642 e ST664 sejam semelhantes e apresentem uma diferença em apenas dois *loci* (*pile* e *mip*), quando o ST664 é comparado com ST242 os dois perfis apresentam apenas três *locus* iguais. A amostra 18HP14 apresenta alta similaridade com o ST664 baseado nos seis alelos identificados, porém é necessário que o gene *mompS* seja sequenciado novamente para se determinar o ST desta amostra.

O novo ST2963 indica a formação de um novo *cluster* quando comparado ao perfil alélico parcial das amostras 66931 e 66905. Todos os alelos identificados na amostra 66931 são iguais aos alelos obtidos no ST2963, porém é necessário que o gene *neuA* seja sequenciado novamente para compreender se trata-se do mesmo ST ou diferem apenas neste *locus*. A amostra 66905 teve os alelos identificados para cinco genes e estes são iguais ao ST2963, o qual difere apenas no *locus flaA*. Para a compreensão da relação de similaridade entre esses genótipos o sequenciamento de *mompS* e *neuA* deve ser feito.

Alguns STs não apresentaram nenhuma relação com os outros perfis identificados. Isto torna ST80, ST1185 e ST2962 genótipos únicos pois não correspondem a nenhum complexo clonal mencionados anteriormente.

A construção de uma MST (árvore geradora mínima) permitiu a visualização do agrupamento dos STs relacionados (*clusters*) em três complexos clonais como mostra a figura 4.11. O resultado apresentado pela MST confirma que ST1, ST152, o novo ST2960 e o perfil parcial de 37064 pertencem ao mesmo complexo clonal ST1. Já os perfis alélicos ST664, ST1642, ST242 e o perfil parcial do isolado 18HP14 pertencem ao complexo clonal ST1642. Mesmo com o perfil parcial das amostras 66931 e 66905 é possível observar que estes isolados pertencem ao complexo clonal ST2963.

Quando analisada a distribuição dos STs obtidos entre os estados de origem das amostras é possível observar que o estado de SP apresentou uma maior variação entre os genótipos, seguido pelo RJ e PR. Em SP foram encontrados um total de oito STs identificados no estado

(ST1, ST152, ST2960, ST2962, ST242, ST1642, ST1185 e ST2963). No estado do RJ dois STs foram encontrados (ST1 e ST2960) e um perfil alélico parcial que provavelmente faz parte do complexo clonal do ST664. No PR foram identificados os ST664 e ST1464.

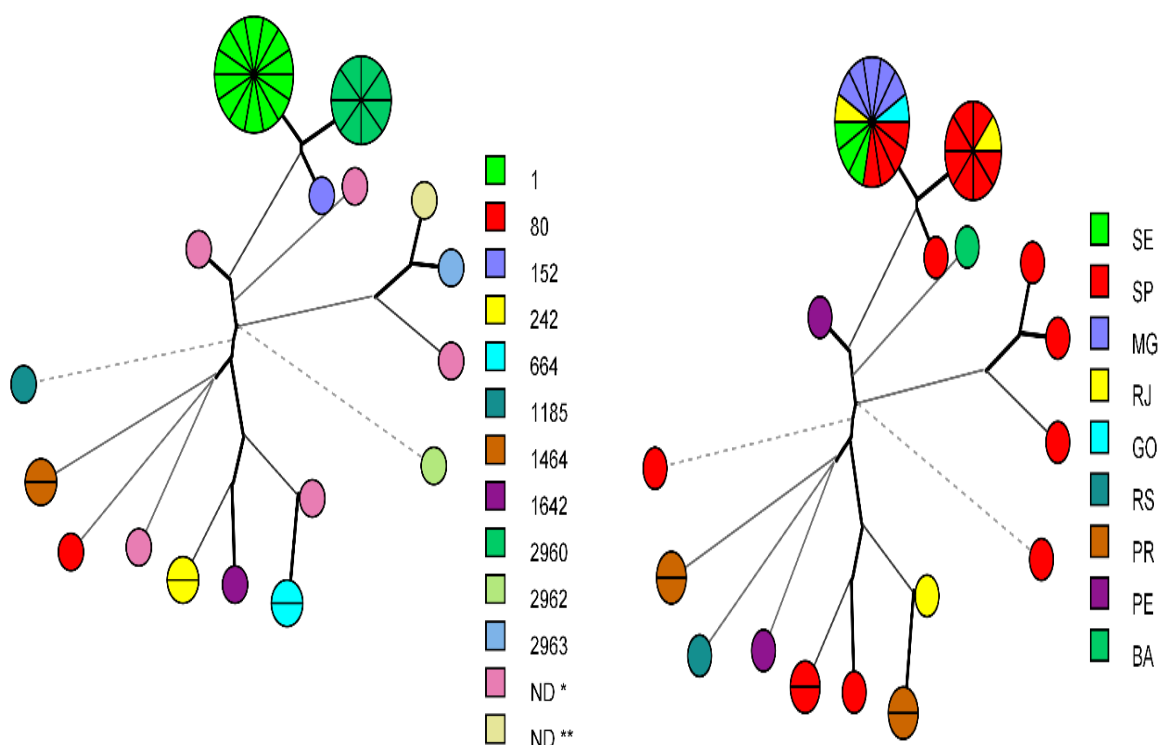


Figura 4.11. *Minimum Spanning Tree* baseado nos STs encontrados (a) e baseada nos estados de origem dos STs identificados (b). Os STs são representados por círculos cujo tamanho indica o número de isolados com este ST. Linhas sólidas e grossas conectam dois STs que diferem dentro de um único *locus*, linhas sólidas e finas conectam variantes de *locus* duplo, linhas pontilhadas grossas conectam variantes de *locus* triplo e linhas pontilhadas finas conectam STs que diferem em quatro *locus*.

4.7. Sequenciamento genômico

O controle de qualidade das sequências genômicas (*reads*) das amostras 20935 e 37063 demonstrou boa qualidade, conforme a descrição da Figura 4.12. Não houve contaminação por adaptadores provenientes da etapa de Biblioteca e a média do conteúdo GC foi em torno de 38%, o esperado para o gênero *Legionella* spp.

Identificação	% Dups (reads duplicadas)	Média do conteúdo GC (%)	Média do comprimento das sequências	Sequências totais
37063_R1.p	70.6%	38%	134 bp	10.4
37063_R2.p	67.9%	38%	127 bp	10.4
20935_R1.p	63.0%	38%	135 bp	3.9
20935_R2.p	57.2%	39%	123 bp	3.9

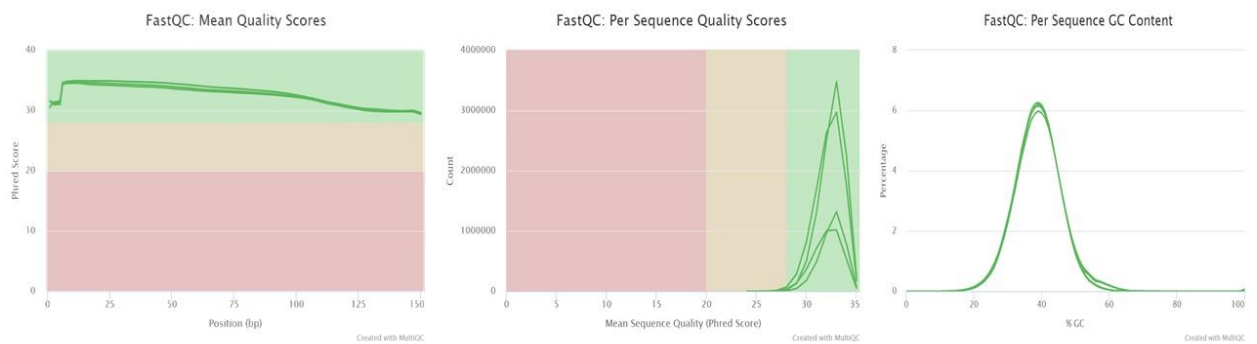


Figura 4.12. Visualização gráfica da qualidade das *reads* sequenciadas para os isolados 20935 e 37063.

O resultado da montagem está descrito na Tabela 4.4. A cobertura média das amostras 20935 e 37063 foi 783 e 345 respectivamente.

Tabela 4.4. Resultado da montagem *de novo* por *Unicycler* após avaliação por *Quast*.

ASSEMBLY (MONTAGEM)	AMOSTRA 20935	AMOSTRA 37063
# CONTIGS (>= 0 BP)	43	106
# CONTIGS (>= 1000 BP)	33	83
# CONTIGS (>= 5000 BP)	27	65
# CONTIGS (>= 10000 BP)	24	59
# CONTIGS (>= 25000 BP)	21	46
# CONTIGS (>= 50000 BP)	19	25
COMPRIMENTO TOTAL (>= 0 BP)	3357064	3999412
COMPRIMENTO TOTAL (>= 1000 BP)	3351156	3987522
COMPRIMENTO TOTAL (>= 5000 BP)	3337889	3940438
COMPRIMENTO TOTAL (>= 10000 BP)	3318318	3897545
COMPRIMENTO TOTAL (>= 25000 BP)	3266648	3658011
COMPRIMENTO TOTAL (>= 50000 BP)	3179040	2888238

# CONTIGS	39	95
MAIOR CONTIG	381752	331658
COMPRIMENTO TOTAL	3355879	3995917
GC (%)	38.18	37.96
N50	227930	91777
N75	108901	47015
L50	6	12
L75	12	28
# N'S PER 100 KBP	0.00	0.00

As principais características da anotação estão descritas na tabela abaixo.

Tabela 4.5. Características da anotação dos isolados.

	Isolado 20935	Isolado 37063
<i>sequência de codificação de proteína - protein coding sequence (CDS)</i>	3013	3655
rRNA	4	4
tRNA	43	43
tmRNA	1	1

As amostras 20935 e 37063 foram identificadas como *L. pneumophila* LS483410.1 (100,00%) e *L. anisa* CP029563.1 (98,45%) por meio da sequência do gene 16S RNA obtida a partir da anotação genômica.

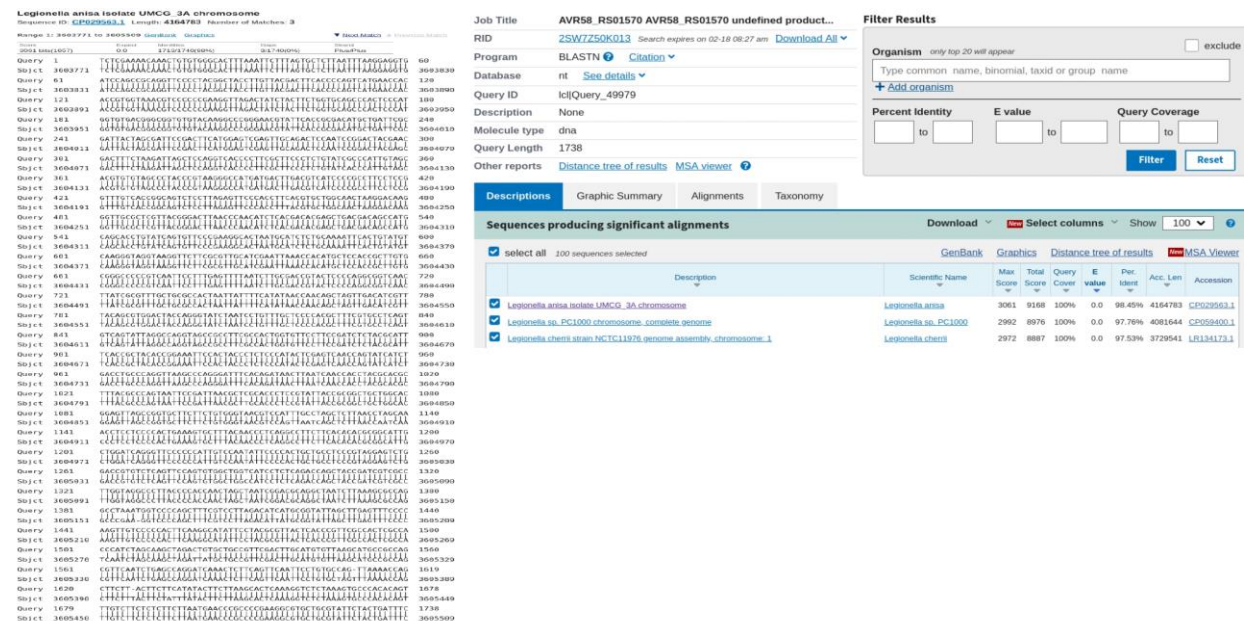


Figura 4.13. Blast da região 16S rRNA da amostra 37063 apresentou similaridade de 98,45% com a espécie *L. anisa*.

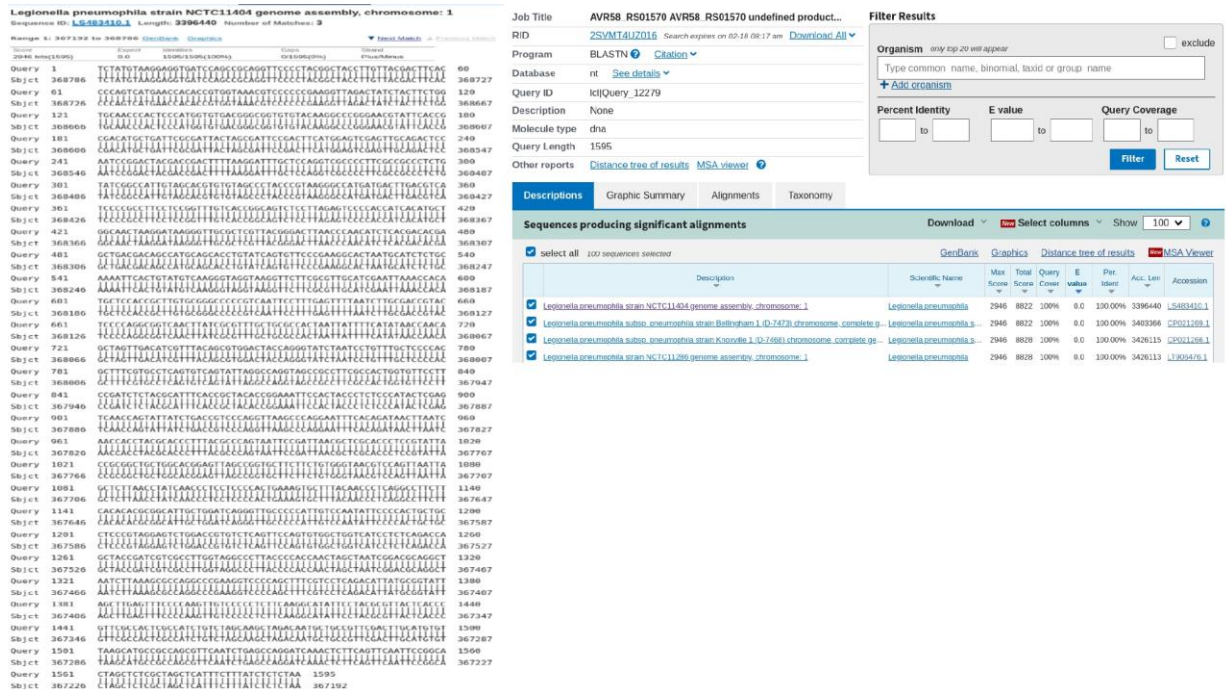


Figura 4.14. Blast da região 16S rRNA da amostra 20935 apresentou similaridade de 100% com a espécie *L pneumophila*.

A estimativa de ANI entre os genomas de 20935 e a referência (NZ_CP013742.1) foi de 96,5. Do total de 1.102 fragmentos de sequência do genoma da amostra, 1.001 foram alinhados como correspondências ortólogas ($\geq 95\%$). Para a amostra 37063 a estimativa ANI foi de 89, ou seja, do total de 1.328 fragmentos de sequência do genoma da amostra, 1015 ($\leq 95\%$), o que sugere não pertencer à mesma espécie.

Quanto à descrição das variantes descritas a partir do programa *Snippy* as variantes foram obtidas a partir da comparação com a sua respectiva referência, tem-se:

Tabela 4.6. Variantes descritas pelo programa *Snippy*.

	<i>Amostra 20935</i>	<i>Amostra 37063</i>
Variante-COMPLEXO	10743	43411
Variante-DEL	300	637
Variante-INS	322	604
Variante-MNP	1242	4398
Variante-SNP	52728	101391
Variante Total	65335	150441

A comparação genômica a partir do *Bionumerics* confirmou o observado no programa *Snippy*, apesar de demonstrarem diferentes números de SNPs, uma vez que possuem diferentes configurações para obtenção das variantes. Em síntese, a amostra 20935 possui um maior número de SNPs contra a sua referência, se comparado à amostra 37063 (Figura 4.16). Não houve a detecção de nenhum plasmídeo a partir da pesquisa realizada pelo *PlasmideoFinder*.

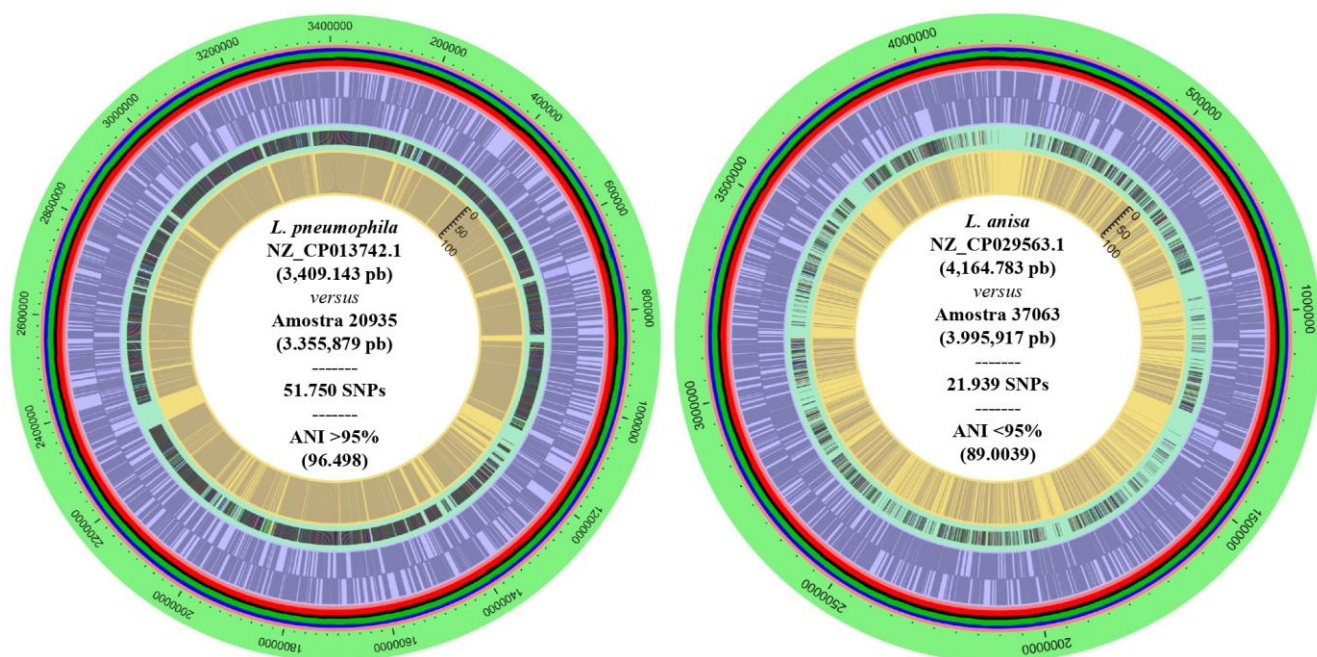


Figura 4.15. Representação gráfica dos genomas das amostras 20935 e 37063 utilizando o programa *Bionumerics*. O alo roxo representa a anotação, o alo interior verde representa as SNPs encontradas e o alo interior dourado representa a profundidade das SNPs.

5. DISCUSSÃO

Identificar *Legionella* spp. em fontes ambientais é essencial não apenas para traçar a origem de um surto, mas também como precaução, pois, uma vez que a presença desta bactéria é identificada na água, é possível iniciar o tratamento do ambiente e, posteriormente, verificar a efetividade da descontaminação. Este tipo de investigação é importante para *shoppings*, hotéis e indústrias devido ao grande número de pessoas expostas às possíveis fontes de contaminação. Tal controle é mais importante ainda em hospitais, pois indivíduos

hospitalizados apresentam maiores chances de desenvolver uma doença oportunista como a DL.

A maioria das amostras analisadas neste estudo foi proveniente de fontes de águas de hotéis devido a maior procura de serviços de análise de qualidade do ar e água por parte destes estabelecimentos. Isto ocorre porque, além de um hotel ter sido o local associado ao primeiro surto da Doença dos Legionários (1), de acordo com o CDC – EUA, viajar é um dos fatores de risco para as legioneloses devido à exposição dos indivíduos às possíveis fontes de contaminação, como ar condicionado, chuveiros, banheiras, *spas* etc. Somado a isso, é conhecido que o grau de contaminação por *Legionella* é mais elevado em sistemas de água de grandes edifícios devido à extensão de seus sistemas hidráulicos, diferente de sistemas mais simples, como os de residências (58).

A presença de *Legionella* spp. na amostra de água proveniente de um bebedouro (ISHP06) demonstra a necessidade de medidas de controle e prevenção nesses equipamentos, além de avaliar a qualidade de águas minerais comercializadas. A OMS recomenda que estes sistemas de água potável sejam descontaminados com uma concentração de cloro entre 0,2 mg/L⁻¹ e 0,5 mg/L⁻¹. Porém, num estudo realizado por Cervero-Aragó *et al.* (59) a *Lp* se mostrou resistente a descontaminação com cloro e o aquecimento da água não foi capaz de exterminar a presença de protozoários que, conseqüentemente, favorecem a recolonização por *Legionella* posteriormente. Sendo assim, outros estudos devem ser realizados para investigar a presença de *Legionella* spp. nessas fontes.

Embora o isolamento por cultura seja o método mais difundido para a identificação de *Legionella*, esta técnica apresenta diversas desvantagens. Por ser uma bactéria fastidiosa, o meio de cultura deve atender à demanda nutricional, além da suplementação com antibióticos para evitar o crescimento de outras bactérias e fungos frequentemente presentes nas amostras de água e que podem inibir o crescimento das *Legionellas*. Estas exigências resultam num meio de cultura dispendioso e, em países onde não há uma real preocupação com as legioneloses, como o Brasil, a compra destes produtos se torna complexa e ainda mais onerosa.

Outro aspecto importante é que uma cultura negativa para *Legionella* não significa necessariamente que seja um ambiente livre de *Legionella* spp. porque apenas uma porção dessas bactérias podem ser cultivadas. Alguns isolados não se adaptam ao meio de cultura ou podem se encontrar no estado VMNC. Este estado pode ser induzido por fatores ambientais

como a presença de descontaminantes. Algumas células no estado VMNC crescem apenas em co-cultura com protozoários. Além disso, os microrganismos aderentes à superfície ou que vivem em protozoários não são identificados por métodos convencionais. (3)

As técnicas moleculares, como a PCR, podem solucionar estas desvantagens porque, como demonstrado por Parthuisot e colaboradores (60), os *clusters* dominantes de *Legionella* identificados pelo sequenciamento do 16S rRNA são de isolados não cultiváveis. Porém, apesar de identificar todas as espécies de *Legionella* spp., incluindo isolados no estado VMNC, a identificação por PCR não é capaz de diferenciar as células vivas das células mortas numa análise pós descontaminação ambiental, por exemplo.

Várias metodologias de caracterização molecular foram desenvolvidas para o delineamento epidemiológico das *Legionellas* e hoje o método mais utilizado é a SBT que possibilita uma ampla troca de informações entre diferentes laboratórios, regiões e países através da comparação de perfis obtidos localmente com os depositados no banco de dados internacional *SBT – Database*. Por esse motivo, sabe-se que alguns STs estão amplamente distribuídos em diferentes países, enquanto outros podem ser únicos e somente encontrados em determinadas regiões.

No Brasil houve uma preocupação com a tentativa de minimizar as *Legionellas* no ambiente somente em 1998, após a morte do ministro das comunicações Sergio Motta em decorrência da DL. Devido a isso, nesta época foi apresentado pelo Ministério da Saúde a Portaria 3523/1998 e a Resolução 09/2003 que tratam sobre a qualidade do ar de interiores. Entretanto, *Legionella* spp. não está incluída nesta portaria (61). Isto revela o equívoco e pouco conhecimento a respeito das legioneloses e a qualidade do ar de interiores no Brasil. Além disso, informações sobre a incidência deste patógeno não estão disponíveis, pois raramente os testes diagnósticos são realizados e os estudos disponíveis na literatura tem como objetivo, na maioria das vezes, apenas identificar a presença de *Lp* no ambiente.

Como consequência pouco se sabe sobre as características das *Legionellas* no Brasil. Portanto, este estudo é o primeiro a investigar o genótipo de amostras ambientais provenientes de diferentes estados brasileiros.

Em nosso estudo foram incluídas 50 amostras, obtidas de diferentes fontes ambientais, provenientes de várias regiões do Brasil (Tabela 3.2), das quais obtivemos os *Sequence Types* (perfis alélicos completos) para 34 isolados, e o ST mais frequente foi o ST1, identificado em 41% das amostras. O ST1 é um genótipo amplamente distribuído pelo mundo, já foi

identificado no Japão, China, Índia, EUA e diversos países da Europa indicando que este ST se adapta às diferentes condições climáticas e ambientais. As cepas que pertencem a este *Sequence Type* são conhecidas por serem bem adaptadas à sobrevivência em fontes artificiais de água enquanto a sua capacidade de se adaptar a ambientes naturais é considerada baixa, pois este genótipo é encontrado com mais frequência nas amostras provenientes de ambientes artificiais (49).

ST1 também apresenta relevância clínica, pois, além de ser identificado em cepas ambientais, também é predominante entre as amostras clínicas de pacientes com DL. Devido a isso, é considerado mais virulento que os outros STs. ST1 foi descrito por vários estudos como principal agente causador da DL globalmente, apoiando sua alta patogenicidade. Algumas cepas patogênicas, raramente são encontradas no ambiente, o que não ocorre com ST1, pois estudos demonstraram que o ST1 é predominante entre as cepas ambientais de *Lp-SG1* (48).

Uma análise realizada em amostras de água provenientes de 168 hotéis em Israel constatou que o ST1 foi mais frequente (62) e também foi predominante em amostras clínicas de pacientes com a DL entre os anos de 2006 e 2011 (38). Na China, em um estudo com amostras de água provenientes de torres de resfriamento, banheiras e sistemas de água potável, mostrou que o ST1 foi o mais frequente (63). Um estudo realizado na Espanha, na região da Catalunha, mostrou que o ST1 estava associado tanto as amostras provenientes de fontes ambientais quanto àqueles associados aos casos clínicos de DL (64).

Embora o surto na convenção dos legionários em 1976 na Filadélfia tenha sido causado pelo ST36, nos EUA a maioria das cepas *Lp-SG1* isoladas de casos esporádicos da DL entre 1982 e 2012 corresponde ao ST1(65). A presença clínica e ambiental de ST1 tem sido amplamente relatada no Canadá, Inglaterra e País de Gales, Europa continental, Oriente Médio, Austrália e vários países da Ásia (66).

Tanto ST1464 quanto ST664 foram identificados em 6% das amostras. O ST1464 está associado às amostras de fontes ambientais na Indonésia, China e Índia, mas não está, nestes países, associados a casos clínicos (49) enquanto o ST664 foi associado a dois casos de DL na Bélgica; um caso de origem desconhecida e outro caso de pneumonia associada à viagem (67).

Encontramos o perfil ST242 em uma amostra e este perfil foi descrito na China em diversos estudos realizados em amostras ambientais (fontes naturais e artificiais). Este mesmo ST

também foi relatado previamente no Japão e no Reino Unido em fontes ambientais (46, 68, 69). No Arizona – EUA, este perfil alélico foi identificado em uma amostra clínica (70).

Identificamos em nosso estudo uma cepa com ST152 proveniente de uma amostra de boiler num hotel em SP, e na literatura este ST também foi descrito em uma amostra de fonte ambiental de dois hospitais em 2001 e 2005 na Polônia. De acordo com Pancer (71), este ST é visto com frequência em cepas provenientes de fontes ambientais hospitalares e, também, em amostras clínicas de pacientes com PAC ou pneumonia associada a viagem.

O ST1642 foi encontrado em um isolado e o mesmo foi relatado em uma análise realizada em amostras do sistema de água de hotéis em Israel e estava amplamente distribuído no país, junto com o ST1 (62).

Embora o banco de dados SBT possua informações que poderiam enriquecer este estudo, a manutenção do *SBT-Database* foi iniciada em maio de 2019 e desde então o site está indisponível. Devido à situação que nos encontramos, os esforços foram direcionados no combate a COVID-19 o que, infelizmente, interferiu na manutenção do *site*. Portanto, a investigação sobre os STs previamente descritos se deu pelos dados coletados na literatura. O perfil ST1185 identificado em uma amostra de São Paulo e o perfil ST80 identificado na única amostra do Rio Grande do Sul não foram encontrados na literatura, embora ambos sejam STs previamente descritos.

Além dos STs já descritos (ST1, ST1464, ST664, ST242, ST152, ST1642, ST1185 e ST80), três STs novos foram identificados na nossa amostragem: ST2960, ST2962 e ST2963. O ST2962 foi identificado em uma amostra e ST2963 também foi identificado em apenas uma amostra.

O novo ST2960 foi identificado em nossa amostragem, formando um *cluster* com oito isolados sendo, portanto, o segundo ST mais frequente, após o ST1, nas amostras analisadas neste estudo. Quando comparados os perfis alélicos ST1 (1,4,3,1,1,1,1), ST2960 (1,4,3,1,1,1,21) e ST152 (1,4,3,1,1,1,3) é possível observar que eles diferem apenas no gene *neuA*, no qual há uma troca do alelo 1 para 21 e 3 nas sequências obtidas, formando um complexo clonal. Este *cluster* deve ser analisado futuramente pelo sequenciamento do genoma completo para avaliar com maior precisão as características e os processos de recombinação que levaram à formação desses STs.

As amostras pertencentes ao ST2960 foram obtidas de cinco locais diferentes (centro comercial – RJ, empresa – SP, centro comercial – SP, laboratório – SP e *shopping* – SP); no qual a origem das amostras foram torres de resfriamento, exceto para a cepa 65699, que foi obtida de um chuveiro. As torres de resfriamento utilizam água como fluido térmico para realizar a refrigeração de processos industriais ou em prédios com sistema central de ar condicionado. Esses equipamentos são úmidos, quentes (temperatura de 30°C a 45°C) e possuem zonas de estagnação, favorecendo o desenvolvimento de biofilmes. Segundo um levantamento realizado pela Conforlab Engenharia Ambiental, 21% das amostras de água recolhidas em torres de resfriamento em empresas brasileiras estão contaminadas com *Legionella* spp., incidência similar à encontrada em outros países, incluindo os EUA.

Esse achado confirma que cepas ambientais idênticas podem ser encontradas em diferentes locais de amostragem, indicando uma rede ambiental complexa. Além disso, o fato desse novo ST ter sido encontrado em diferentes locais, sugere que a liberação de aerossóis contaminados não só leva à exposição humana, mas também facilita a troca de populações de *Lp* (14).

As amostras 37064 e 37065 foram obtidas, respectivamente, do chuveiro e da pia de um mesmo hotel em Recife. Embora nenhum ST tenha sido estabelecido para esses isolados devido à ausência de alguns marcadores, os alelos identificados não são os mesmos nas duas cepas (37064 = 3, 4, -, 1, 14, -, 1) e (37065 = -, 12, 31, 6, 48, 31, 3) mesmo que tenham sido obtidas no mesmo sistema de abastecimento (Tabela 4.2). Como demonstrado por Sharaby et al., amostras obtidas pela coleta de água de um mesmo sistema de distribuição, porém, de pontos adjacentes, podem apresentar genótipos diferentes e, conseqüentemente, características distintas em termos de suscetibilidade antimicrobiana, como outras características fisiológicas (15).

Os genes que codificam proteínas relativas ao flagelo (*flaA*), pilina (*pilE*), proteína da membrana externa (*mompS*), potencializador de infectividade de macrófago (*mip*) e zinco metaloproteinase (*proA*) podem interagir com ambientes externos; portanto, a adaptação das bactérias à uma determinada fonte ambiental pode resultar em STs específicos e adequados para cada ambiente (49), como é o caso do ST1 que está associado majoritariamente a fontes artificiais.

Baseado na análise da distribuição dos STs, SP apresentou uma maior variação entre os STs identificados nas amostras. Este resultado já era esperado uma vez que 50% dos isolados são

provenientes de materiais coletados neste estado. Estas amostras pertencem aos *singletons* ST1185 e ST2962 além dos três complexos clonais CC - ST1, CC - ST1642 e CC - ST2963. Em contrapartida, os quatro isolados do Paraná (provenientes de dois hotéis) cujo ST foi definido pertencem a um único complexo clonal (CC – ST1642). Entre as três amostras provenientes do RJ dois STs identificados pertencem ao mesmo complexo clonal ST1 (ST1 e ST2960), porém o perfil parcial da amostra 18HP14 indica um genótipo diferente que pertence a outro complexo clonal (CC – ST1642). Todas as amostras provenientes de MG e a única cepa de GO pertencem ao ST1 e o ST80 foi identificado apenas na amostra do RS.

Estes dados demonstram que alguns STs são capazes de se adaptar às diferentes condições ambientais e o rearranjo entre alguns alelos podem definir diferentes STs, mas que ainda possuem alta similaridade entre eles. Para compreender a adaptação dos STs às diferentes condições climáticas e ambientais nos estados brasileiros é necessário aumentar a variabilidade da amostragem, pois como mencionado anteriormente, metade dos isolados são provenientes do estado de SP e 70% da região sudeste.

Algumas amostras não foram identificadas devido a falhas na amplificação primária ou pela baixa qualidade das sequências. Apenas quatro amostras não amplificaram alguns alvos e este fato pode ser explicado por duas hipóteses: (i) a identificação molecular pela SBT foi desenvolvida para identificar os genótipos da espécie *Lp* e, embora a *Lp* seja a espécie mais abundante, o gênero possui outras 58 espécies e neste estudo não houve a identificação das espécies; (ii) podem ter ocorrido mutações na sequência alvo, inibindo a ligação do *primer* e, consequentemente, impedindo a amplificação dos genes.

Algumas sequências que apresentaram baixa qualidade passaram por um novo sequenciamento, mas o problema persistiu. É provável que isso tenha acontecido por falhas nos processos anteriores (extração de DNA, amplificação primária e purificação dos *amplicons*), portanto, as amostras devem ser repetidas desde a extração de DNA para uma nova análise. Neste ponto a criopreservação foi bastante útil, pois, permite que o processo de extração seja refeito quando necessário. Assim como o repique das culturas elevou o número de colônias, tornando a concentração do DNA mais elevada e facilitando o armazenamento.

O sequenciamento genômico (WGS) foi realizado para as amostras 20935 e 37063. A amostra 20935 obtida a partir do material coletado do chuveiro de um hotel em Foz do Iguaçu – PR apresentou o tamanho de 3.355.879 pb e conteúdo GC de 38,18%. Este resultado foi compatível com as características do genoma da *L. pneumophila*. A amostra 37063, obtida a

partir do material coletado da pia do banheiro de um hotel em Recife – PE, apresentou um tamanho de 3.995.917 pb e conteúdo GC de 37,9%. Embora o conteúdo GC fosse o esperado, o tamanho obtido é maior do que o genoma de *L. pneumophila*. Devido a isso uma análise da região 16S rRNA foi realizada para a identificação das espécies.

Para a amostra 20935 o alinhamento local (*Blast*) e a estimativa de ANI para o fragmento 16S rRNA apresentou, respectivamente, identidade de 100% e 96,5% comparado à sequência referência da *Lp*, confirmando que este isolado pertence a espécie *Lp*. Em contrapartida, o alinhamento local da amostra 37063 resultou em 98,45% de identidade com o genoma de referência da espécie *Legionella anisa*.

A *L. anisa* é a espécie não-*pneumophila* mais encontrada no ambiente frequentemente isolada de torres de resfriamento, água potável e sistema de água em hospitais (72). No ambiente essa espécie já foi identificada em biofilmes logo após o processo de descontaminação da água com choque térmico e biodispersantes (3). Embora esta espécie já tenha sido associada a casos da Doença dos Legionários na Espanha, Austrália, Reino Unido, EUA e Japão a *L. anisa* é mais relatada em surtos ou casos da Febre Pontiac, além de estar relacionada a infecções extra pulmonares (72,73).

Embora o alinhamento local indique que a amostra 37063 seja da espécie *L. anisa*, a estimativa de ANI (89%) sugere a possibilidade da amostra se tratar de outra espécie. Correspondendo a isso não houve qualquer semelhança com o genoma de outras espécies do gênero através das comparações realizadas até o momento. Para confirmar se esta amostra se trata de uma nova espécie do gênero é necessário realizar outras análises como a comparação de *housekeeping* genes e análise das características morfológicas por exemplo.

O aumento da demanda de água para consumo humano para abastecimento, produção energética, atividade industrial ou agricultura somado a exposição humana a sistemas de água que produzem aerossóis, como ar condicionado e torres de resfriamento tornam a DL uma doença emergente desde a década de 1970 cujos casos vêm aumentando significativamente ao redor do mundo. Os achados deste estudo demonstram que a epidemiologia da DL no Brasil pode ser semelhante a países como os EUA, onde mais de 10 mil pessoas são contaminadas pelas *Legionellas* anualmente.

Ficou claro muito recentemente que a pandemia pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) também representa um fator de risco para as legioneloses. As infecções virais podem enfraquecer o sistema imunológico e permitir a infecção por patógenos oportunistas como a

Lp. A coinfeção e superinfecções bacterianas são comuns em infecções virais respiratórias e podem levar a complicações que acarretam prejuízos na resposta imune e aumentam a mortalidade em pacientes infectados. Um exemplo disto foi a pandemia de influenza A (H1N1) em 2009 que causou aproximadamente 300.000 mortes em todo o mundo, nas quais 30–55% dos casos morreram de pneumonia bacteriana. (74)

A coinfeção por *Lp*-SG1 em pacientes com COVID já foi relatada. Em meio à pandemia da COVID-19, um surto da DL atingiu Vila do Conde, Póvoa do Varzim e Matosinhos em Portugal no ano de 2020 devido à presença de *Legionella* spp. em torres de resfriamento industriais próximas a estes locais, tendo como consequência 72 casos e nove mortes. Neste mesmo período, um homem de 53 anos, obeso e fumante apresentou febre, tosse não produtiva e um baixo volume de hemoptise (expectoração de sangue originários dos pulmões). Visto que os sintomas são parecidos para a DL e a COVID-19, foram realizados testes para SARS-CoV-2 (RT-PCR) e o TAU para *Lp*-SG1 no qual ambos deram resultados positivos, confirmando a infecção concomitante pelos dois patógenos (75).

No Japão, um homem de 80 anos, não-fumante e com diabetes *mellitus* deu entrada no hospital com mal-estar, diarreia e febre após retornar de uma viagem ao Egito. Após sete dias os sintomas pioraram e evoluíram para gastroenterite, náuseas e perda de apetite. O TAU para *Lp*-SG1 realizado deu como positivo e com base nisso foi prescrito um tratamento com azitromicina e ceftriaxona. Embora a infecção por *Legionella* já estivesse confirmada, o exame de RT-PCR para coronavírus-2 (SARS-CoV-2) também foi realizado e apresentou resultado positivo. Após dez dias de internação, infelizmente, o paciente veio a óbito. (76)

Estes casos demonstram que as semelhanças clínicas entre essas duas infecções, ambas causadoras de pneumonia e com manifestações atípicas, permitem que alguns casos da DL não tenham sido diagnosticados neste contexto (75). Além disso, a pandemia de H1N1 em 2009 demonstrou que infecções secundárias e coinfeções por bactérias resultaram no aumento da morbidade e mortalidade. Assim, o diagnóstico diferencial durante a atual pandemia é fundamental para diagnosticar tanto as coinfeções, como também diagnosticar outras causas tratáveis de doenças com sintomas semelhantes que podem ser erroneamente rotuladas como COVID-19 (76).

A limitação deste estudo foi a análise de apenas 50 amostras de quatro regiões do Brasil, a maioria das amostras teve como origem o estado de SP e a região sudeste, resultando numa distribuição desproporcional da origem das amostras o que pode ter resultado numa

conformidade dos STs e impedindo uma conclusão mais abrangente a respeito dos genótipos de *Lp* circulante no país. Entretanto, até o momento, este é o primeiro estudo de identificação molecular realizado com isolados brasileiros e este estudo de cepas provenientes de fontes ambientais pode ser útil para uma previsão oportuna das características dos isolados no ambiente antes de ser evidenciado em amostras clínicas.

6. CONCLUSÃO

O monitoramento da qualidade da água em sistemas de distribuição é fundamental para verificar a presença de *Legionella* sp. no ambiente, e é a principal forma de prevenir a DL. Diversos países possuem uma vigilância rígida quanto às legioneloses, mas o mesmo não ocorre no Brasil, onde o controle para este patógeno é pouco realizado e quando existe é pontual. Além disso, pouco se sabe sobre a distribuição desse patógeno no país, seja no ambiente ou em casos clínicos.

Este trabalho mostrou a frequência dos 11 STs encontrados em amostras provenientes de nove estados brasileiros. Como esperado ST1 foi prevalente, pois é amplamente distribuído na maioria dos países, além de estar relacionado a maioria dos casos de DL. Os outros STs previamente descritos estão associados às legioneloses em outros países, reforçando a importância clínica destas amostras.

Isto reforça a necessidade da elaboração de normas de qualidade da água mais específicas para o controle e prevenção das legioneloses, além da implementação de metodologias de diagnóstico e tratamento. O comportamento epidemiológico do Brasil pode ser semelhante ao visto em outros países, portanto, baseado nos dados da literatura, como a prevalência e mortalidade, pode-se esperar cerca de seis mil óbitos anuais em decorrência a pneumonia por *Lp* (77).

7. PERSPECTIVAS

- Sequenciamento e análise de um maior número de genomas de *Legionella* spp. ambientais.
- Através da análise comparativa de genomas de isolados brasileiros e de outros países, buscar marcadores genéticos que permitem desenvolver métodos de tipagem de *Legionellas* spp. para estudos de transmissão.
- Comparação global dos genomas deste estudo contra todos os genomas de *Legionellas* spp. já publicados para análise filogenética e genômica comparativa.
- Obtenção de isolados ambientais dos demais estados brasileiros.
- Iniciar o isolamento de *Legionella pneumophila* provenientes de amostras clínicas de pacientes com pneumonia.
- Caracterização molecular de *Legionellas* spp. provenientes do Continente Antártico. Atividade realizada dentro do Projeto FioAntar.

8. REFERÊNCIAS

1. Mercante JW, Winchell JM. Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clin Microbiol Rev.* janeiro de 2015;28(1):95–133.
2. Center for Disease Control and Prevention. Legionnaires Disease History and Patterns [Internet]. 2020 [citado 12 de junho de 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/legionella/about/history.html>
3. Farhat M, Moletta-Denat M, Frère J, Onillon S, Trouilhé M-C, Robine E. Effects of Disinfection on Legionella spp., Eukarya, and Biofilms in a Hot Water System. *Appl Environ Microbiol.* outubro de 2012;78(19):6850–8.
4. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* setembro de 2016;43:108–22.
5. Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2017;31(1):7–27.
6. Byrne BG, McColm S, McElmurry SP, Kilgore PE, Sobeck J, Sadler R, et al. Prevalence of Infection-Competent Serogroup 6 Legionella pneumophila within Premise Plumbing in Southeast Michigan. *mBio* [Internet]. 6 de fevereiro de 2018 [citado 12 de junho de 2020];9(1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5801461/>
7. De Giglio O, Napoli C, Lovero G, Diella G, Rutigliano S, Caggiano G, et al. Antibiotic susceptibility of Legionella pneumophila strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environ Res.* 1º de outubro de 2015;142:586–90.
8. Bradley BT, Bryan A. Emerging respiratory infections: The infectious disease pathology of SARS, MERS, pandemic influenza, and Legionella. *Semin Diagn Pathol.* maio de 2019;36(3):152–9.
9. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol.* setembro de 1981;14(3):298–303.
10. Dybwad M, Aarskaug T, Fykse E-M, Henie Madslie E, Blatny JM. Complete Genome Sequences of Six Legionella pneumophila Isolates from Two Collocated Outbreaks of Legionnaires' Disease in 2005 and 2008 in Sarpsborg/Fredrikstad, Norway. *Genome Announc* [Internet]. 15 de dezembro de 2016 [citado 26 de janeiro de 2021];4(6). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5159569/>
11. Borges V, Nunes A, Sampaio DA, Vieira L, Machado J, Simões MJ, et al. Legionella pneumophila strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Sci Rep.* 19 de 2016;6:26261.

12. Buchrieser C, Hilbi H. *Legionella: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [citado 19 de junho de 2020]. 622 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 954). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-161-5>
13. Whiley H, Keegan A, Fallowfield H, Ross K. Uncertainties associated with assessing the public health risk from *Legionella*. *Front Microbiol.* 2014;5:501.
14. Wüthrich D, Gautsch S, Spieler-Denz R, Dubuis O, Gaia V, Moran-Gilad J, et al. Air-conditioner cooling towers as complex reservoirs and continuous source of *Legionella pneumophila* infection evidenced by a genomic analysis study in 2017, Switzerland. *Eurosurveillance* [Internet]. 24 de janeiro de 2019 [citado 29 de dezembro de 2020];24(4). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6351994/>
15. Sharaby Y, Nitzan O, Brettar I, Höfle MG, Peretz A, Halpern M. Antimicrobial agent susceptibilities of *Legionella pneumophila* MLVA-8 genotypes. *Sci Rep.* 16 de abril de 2019;9(1):6138.
16. Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol.* janeiro de 2009;7(1):13–24.
17. Best A, Kwaiq YA. Evolution of the Arsenal of *Legionella pneumophila* Effectors To Modulate Protist Hosts. *mBio* [Internet]. 7 de novembro de 2018 [citado 5 de janeiro de 2021];9(5). Disponível em: <https://mbio.asm.org/content/9/5/e01313-18>
18. Segal G, Shuman HA. *Legionella pneumophila* Utilizes the Same Genes To Multiply within *Acanthamoeba castellanii* and Human Macrophages. *Infect Immun.* 1º de maio de 1999;67(5):2117–24.
19. Horwitz MA, Maxfield FR. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol.* dezembro de 1984;99(6):1936–43.
20. Sharaby Y, Rodríguez-Martínez S, Pecellin M, Sela R, Peretz A, Höfle MG, et al. Virulence Traits of Environmental and Clinical *Legionella pneumophila* Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) Genotypes. *Appl Environ Microbiol.* 15 de 2018;84(10).
21. Cillóniz C, Miguel-Escuder L, Pedro-Bonet ML, Falcó V, Lopez Y, García-Vidal C, et al. Community-Acquired *Legionella* Pneumonia in Human Immunodeficiency Virus-Infected Adult Patients: A Matched Case-Control Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 31 de 2018;67(6):958–61.
22. Cunha CB, Cunha BA. Legionnaire's Disease Since Philadelphia. *Infect Dis Clin North Am.* março de 2017;31(1):1–5.
23. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J-I, Isobe J, et al. *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 15 de 2018;84(18).
24. Miyashita N, Higa F, Aoki Y, Kikuchi T, Seki M, Tateda K, et al. Clinical presentation of *Legionella* pneumonia: Evaluation of clinical scoring systems and therapeutic efficacy. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* novembro de 2017;23(11):727–32.

25. Center for Disease Control and Prevention. Legionnaires Disease: Diagnosis, and Prevention. [Internet]. 2020 [citado 16 de junho de 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/legionella/clinicians/diagnostic-testing.html>
26. Pierre DM, Baron J, Yu VL, Stout JE. Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 29 de agosto de 2017 [citado 12 de junho de 2020];16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5576257/>
27. Avni T, Bieber A, Green H, Steinmetz T, Leibovici L, Paul M. Diagnostic Accuracy of PCR Alone and Compared to Urinary Antigen Testing for Detection of Legionella spp.: a Systematic Review. *J Clin Microbiol*. fevereiro de 2016;54(2):401–11.
28. Chedid MBF, Ilha D de O, Chedid MF, Dalcin PR, Buzzetti M, Jaconi Saraiva P, et al. Community-acquired pneumonia by Legionella pneumophila serogroups 1–6 in Brazil. *Respir Med*. agosto de 2005;99(8):966–75.
29. Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, et al. Guidelines for the Management of Adults with Community-acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1º de junho de 2001;163(7):1730–54.
30. Gomes M. Community-acquired pneumonia: challenges of the situation in Brazil. *J Bras Pneumol*. agosto de 2018;44(4):254–6.
31. Bruin JP, Koshkolda T, IJzerman EPF, Lück C, Diederer BMW, Den Boer JW, et al. Isolation of ciprofloxacin-resistant Legionella pneumophila in a patient with severe pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. outubro de 2014;69(10):2869–71.
32. Koshkolda T, Lück C. Antibiotic susceptibility of clinical Legionella pneumophila serogroup 1 strains isolated in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 01 de 2018;73(2):541–2.
33. Pappa O, Chochlakis D, Sandalakis V, Dioli C, Psaroulaki A, Mavridou A. Antibiotic Resistance of Legionella pneumophila in Clinical and Water Isolates—A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. agosto de 2020 [citado 30 de janeiro de 2021];17(16). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7459901/>
34. Construção de Reservatórios e seus Impactos [Internet]. *Ambientebrasil - Ambientes*. 2009 [citado 27 de janeiro de 2021]. Disponível em: https://ambientes.ambientebrasil.com.br/energia/energia_hidrica/construcao_de_reservatorios_e_seus_impactos.html
35. Rucinski SL, Murphy MP, Kies KD, Cunningham SA, Schuetz AN, Patel R. Eight Years of Clinical Legionella PCR Testing Illustrates a Seasonal Pattern. *J Infect Dis*. 13 de 2018;218(4):669–70.
36. Leung Y-H, Lam C-K, Cheung Y-Y, Chan C-W, Chuang S-K. Epidemiology of Legionnaires' Disease, Hong Kong, China, 2005–2015 - Volume 26, Number 8—August 2020 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*. [citado 22 de janeiro de 2021]; Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/19-1244_article

37. Lam MC, Ang LW, Tan AL, James L, Goh KT. Epidemiology and Control of Legionellosis, Singapore. *Emerg Infect Dis.* julho de 2011;17(7):1209–15.
38. Moran-Gilad J, Mentasti M, Lazarovitch T, Huberman Z, Stocki T, Sadik C, et al. Molecular epidemiology of Legionnaires' disease in Israel. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* julho de 2014;20(7):690–6.
39. Legionella | National Collaborating Centre for Environmental Health | NCCEH - CCSNE [Internet]. [citado 22 de janeiro de 2021]. Disponível em: <https://ncceh.ca/environmental-health-in-canada/health-agency-projects/legionella>
40. Rabello L, Conceição C, Ebecken K, Lisboa T, Bozza FA, Soares M, et al. Tratamento da pneumonia grave adquirida na comunidade no Brasil: análise secundária de um inquérito internacional. *Rev Bras Ter Intensiva.* março de 2015;27(1):57–63.
41. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H. Legionella pneumophila Serogroup 1 Isolates from Cooling Towers in Japan Form a Distinct Genetic Cluster. *Microbiol Immunol.* 2005;49(12):1027–33.
42. Gaia V, Fry NK, Harrison TG, Peduzzi R. Sequence-based typing of Legionella pneumophila serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J Clin Microbiol.* julho de 2003;41(7):2932–9.
43. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol.* maio de 2005;43(5):2047–52.
44. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the Gene Encoding N-Acylneuraminyl Cytidylyl Transferase, Increases the Discriminatory Ability of the Consensus Sequence-Based Scheme for Typing Legionella pneumophila Serogroup 1 Strains. *J Clin Microbiol.* junho de 2007;45(6):1965–8.
45. Sequence-Based Typing (SBT) Database [Internet]. [ARCHIVED CONTENT] Legionella pneumophila Sequence Based Typing. 2019 [citado 30 de janeiro de 2021]. Disponível em: https://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20190501130700/http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php
46. Guo J, Liang T, Hu C, Lv R, Yang X, Cui Y, et al. Sequence Types Diversity of Legionella pneumophila Isolates from Environmental Water Sources in Guangzhou and Jiangmen, China. *Infect Genet Evol.* 31 de outubro de 2014;29.
47. Kozak-Muiznieks NA, Lucas CE, Brown E, Pondo T, Taylor TH, Frace M, et al. Prevalence of Sequence Types among Clinical and Environmental Isolates of Legionella pneumophila Serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol.* janeiro de 2014;52(1):201–11.
48. Lévesque S, Lalancette C, Bernard K, Pacheco AL, Dion R, Longtin J, et al. Molecular Typing of Legionella pneumophila Isolates in the Province of Quebec from 2005 to 2015. Mokrousov I, organizador. *PLOS ONE.* 5 de outubro de 2016;11(10):e0163818.

49. Sreenath K, Chaudhry R, Vinayaraj EV, Dey AB, Kabra SK, Thakur B, et al. Distribution of Virulence Genes and Sequence-Based Types Among *Legionella pneumophila* Isolated From the Water Systems of a Tertiary Care Hospital in India. *Front Public Health* [Internet]. 23 de novembro de 2020 [citado 28 de dezembro de 2020];8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7719716/>
50. Andrews S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. 2015 [citado 21 de fevereiro de 2021]. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>.
51. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma Oxf Engl*. 1º de agosto de 2014;30(15):2114–20.
52. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinforma Oxf Engl*. 1º de outubro de 2016;32(19):3047–8.
53. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Comput Biol*. 8 de junho de 2017;13(6):e1005595.
54. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinforma Oxf Engl*. 15 de abril de 2013;29(8):1072–5.
55. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma Oxf Engl*. 15 de julho de 2014;30(14):2068–9.
56. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun*. 30 de novembro de 2018;9(1):5114.
57. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother*. julho de 2014;58(7):3895–903.
58. Garner E, Brown CL, Schwake DO, Rhoads WJ, Arango-Argoty G, Zhang L, et al. Comparison of Whole-Genome Sequences of *Legionella pneumophila* in Tap Water and in Clinical Strains, Flint, Michigan, USA, 2016. *Emerg Infect Dis*. novembro de 2019;25(11):2013–20.
59. Cervero-Aragó S, Rodríguez-Martínez S, Puertas-Bennasar A, Araujo RM. Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free *Legionella* and Amoebae-Associated *Legionella*. *PloS One*. 2015;10(8):e0134726.
60. Parthuisot N, West NJ, Lebaron P, Baudart J. High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and impact of seasonal and anthropogenic effects. *Appl Environ Microbiol*. dezembro de 2010;76(24):8201–10.
61. d'Ávila Bensoussan M, H. Bensoussan F, Gonçalves Dilguerian M, Kozak-Muiznieks N. *Legionella* na visão de especialistas [Internet]. 1º ed. SETRI Consultoria em Sustentabilidade LTDA; 2014 [citado 23 de junho de 2020]. Disponível em: [../..../index.html](http://www.setri.com.br/legionella/index.html)

62. Yakunin E, Kostyal E, Agmon V, Grotto I, Valinsky L, Moran-Gilad J. A Snapshot of the Prevalence and Molecular Diversity of *Legionella pneumophila* in the Water Systems of Israeli Hotels. *Pathogens*. junho de 2020;9(6):414.
63. Qin T, Zhou H, Ren H, Guan H, Li M, Zhu B, et al. Distribution of Sequence-Based Types of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strains Isolated from Cooling Towers, Hot Springs, and Potable Water Systems in China. *Appl Environ Microbiol*. abril de 2014;80(7):2150–7.
64. Quero S, Párraga-Niño N, Barrabeig I, Sala MR, Pedro-Botet ML, Monsó E, et al. Population structure of Environmental and Clinical *Legionella pneumophila* isolates in Catalonia. *Sci Rep* [Internet]. 19 de abril de 2018 [citado 29 de dezembro de 2020];8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908911/>
65. Mercante JW, Morrison SS, Desai HP, Raphael BH, Winchell JM. Genomic Analysis Reveals Novel Diversity among the 1976 Philadelphia Legionnaires' Disease Outbreak Isolates and Additional ST36 Strains. *PLOS ONE*. 29 de setembro de 2016;11(9):e0164074.
66. Mercante JW, Caravas JA, Ishaq MK, Kozak-Muiznieks NA, Raphael BH, Winchell JM. Genomic heterogeneity differentiates clinical and environmental subgroups of *Legionella pneumophila* sequence type 1. Robinson DA, organizador. *PLOS ONE*. 18 de outubro de 2018;13(10):e0206110.
67. Vekens E, Soetens O, Mendonça R, Echahidi F, Roisin S, Deplano A, et al. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010. 25 de dezembro de 2012;6.
68. Zeng LZ, Liao HY, Luo LZ, He SS, Qin T, Zhou HJ, et al. An Investigation on the Molecular Characteristics and Intracellular Growth Ability among Environmental and Clinical Isolates of *Legionella pneumophila* in Sichuan Province, China. *Biomed Environ Sci BES*. julho de 2019;32(7):520–30.
69. Zhan X-Y, Zhu Q-Y. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. *PLoS ONE* [Internet]. 1º de fevereiro de 2018 [citado 28 de dezembro de 2020];13(2). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5794064/>
70. Raphael BH, Huynh T, Brown E, Smith JC, Ruberto I, Getsinger L, et al. Culture of Clinical Specimens Reveals Extensive Diversity of *Legionella pneumophila* Strains in Arizona. *mSphere*. 27 de 2019;4(1).
71. Pancer K. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water distribution systems as a complementary element of risk assessment of legionellosis in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 20 de setembro de 2013;20(3):436–40.
72. Vaccaro L, Izquierdo F, Magnet A, Hurtado C, Salinas MA, Gomes TS, et al. First Case of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella anisa* in Spain and the Limitations on the Diagnosis of *Legionella non-pneumophila* Infections. *PLOS ONE*. 21 de julho de 2016;11(7):e0159726.

73. Mee-Marquet N van der, Domelier A-S, Arnault L, Bloc D, Laudat P, Hartemann P, et al. Legionella anisa, a Possible Indicator of Water Contamination by Legionella pneumophila. J Clin Microbiol. 1º de janeiro de 2006;44(1):56–9.
74. Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, Soltani A, Aljanabi HAA, Jeda AS, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. IUBMB Life. outubro de 2020;72(10):2097–111.
75. Camões J, Lobato CT, Beires F, Gomes E. Legionella and SARS-CoV-2 Coinfection in a Patient With Pneumonia - An Outbreak in Northern Portugal. Cureus. 4 de janeiro de 2021;13(1):e12476.
76. Arashiro T, Nakamura S, Asami T, Mikuni H, Fujiwara E, Sakamoto S, et al. SARS-CoV-2 and Legionella co-infection in a person returning from a Nile cruise. J Travel Med. 18 de maio de 2020;27(3).
77. Ferreira AP, Cunha CDLN da. Pesquisa de *Legionella pneumophila* nas redes de abastecimento hospitalar. RECIIS. 20 de dezembro de 2007;1(2):85.