



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MAÍSA VIANA DE HOLANDA

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* PELA
TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE
MUNICÍPIOS DO CEARÁ**

FORTALEZA - CE

2015

MAÍSA VIANA DE HOLANDA

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* PELA
TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE
MUNICÍPIOS DO CEARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Micobactérias.

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota

FORTALEZA – CE

2015

MAÍSA VIANA DE HOLANDA

**DETECCÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* PELA
TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE
MUNICÍPIOS DO CEARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Micobactérias

Aprovada em: 20 / 03/ 2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando Schemelzer Moraes Bezerra

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por ter estado presente em todos os momentos da minha vida acadêmica. Agradeço por ter me dado sabedoria, força nos momentos de desespero, por ter iluminado minhas escolhas e por ter colocado pessoas excelentes no meu caminho que tanto contribuíram com a obtenção do título de mestre.

Aos meus pais, José Moreira de Holanda e Maria das Virgens Viana Lima de Holanda, por nunca terem medido esforços para me proporcionar instrução educacional adequada, pela compreensão aos meus momentos de ausência, cansaço e estresse e pelo suporte financeiro necessário quando o dinheiro da bolsa acabava e o mês ainda estava no início.

Às minhas irmãs, Milena Viana de Holanda e Michelle Viana de Holanda Lima, pelo carinho, pela amizade e pelo apoio fornecidos para a concretização desse sonho. À minha sobrinha, Manuela Holanda Lima, por ter compreendido meus momentos de ausência quando em vez de levá-la à praia ou ao parque, eu tive que ficar em casa trancada no quarto, estudando e escrevendo essa dissertação.

À minha orientadora, Cristiane Cunha Frota, por ser uma ótima orientadora, sempre fornecendo ensinamentos, relacionados ou não a assuntos acadêmicos, durante esses quase 5 anos de convívio. Por sempre me cumprimentar alegremente, por responder os e-mails de dúvidas, marcações de reuniões e correções com o máximo de rapidez possível e pela paciência quando surgia alguma “pedra no caminho” durante a execução dos experimentos.

Ao meu noivo, Alan Kleber Barros Demétrio, pelo amor, pelo amparo e pela paciência frente minhas constantes alterações de humor durante a elaboração dessa dissertação. Pela cooperação quando o assunto era gerar um ambiente tranquilo que propiciasse o meu estudo, mesmo que seja abrir mão de ir ao cinema. Obrigada pela colaboração nas minhas dúvidas de português, no auxílio para conferir todas as referências, figuras, tabelas e quadros da dissertação e pelo apoio psicológico durante os meus momentos de nervosismo. O suporte emocional proporcionado foi essencial para essa conquista!

Aos companheiros do Laboratório de Micobactérias, Gizele Almada e Thales Alves pela companhia diária no laboratório, na ida ao Restaurante Universitário e pelas palavras de

incentivo quando o desânimo me cercava. Aos técnicos de laboratório, Socorro Souza e José Olavo Moraes, pelo auxílio fornecido e pela disposição a ajudar.

À todo pessoal do Laboratório de Bioquímica Humana do CCS da UECE, por me receberem de “braços abertos” no laboratório e pela compreensão quando eu estava disputando algum equipamento, como a capela de fluxo laminar ou o adaptador da tomada. Um agradecimento muito especial à doutoranda, Lívia Érika Carlos Marques, por ter me ensinado e me auxiliado nos ensaios de qPCR, por ter dedicado seu tempo a analisar meus resultados e por ter contribuído de maneira ímpar para a realização desse estudo!

Ao geólogo responsável pelas coletas, José Sabadia e ao Instituto Evandro Chagas, em especial à Luana Nepomuceno, por contribuírem com a realização da pesquisa.

As minhas adoráveis amigas de graduação, Jéssica de Castro Fonseca, Luana Letícia Alves Dutra e Luciana de Brito Siebra e Oliveira; que continuaram contribuindo com sua amizade na pós-graduação, compartilhando vários momentos desesperadores do mestrado e por estarem sempre dispostas a auxiliar, mesmo que seja somente com uma palavra de encorajamento ou com o empréstimo do GraphPad Prism!

Aos meus colegas da turma de mestrado pelo companheirismo durante as disciplinas e pela ajuda ou lembretes através de mensagens no grupo do WhatsApp.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Patologia, pelas aulas e ensinamentos repassados. Às secretárias da coordenação da Pós-graduação, Paula Palácio e Valéria de Oliveira, pela atenção e por toda ajuda.

Ao CNPq pelo essencial apoio com o financiamento da minha bolsa de auxílio e pelo apoio financeiro aos custos da pesquisa.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica e granulomatosa responsável por afetar a pele e os nervos periféricos, sendo ocasionada pelo *Mycobacterium leprae*, um agente intracelular obrigatório incapaz de ser cultivado em meios de cultura axênicos. No ano de 2012, foram detectados 232.857 casos novos no mundo, sendo desses 33.303 (14, 30%) detectados somente no Brasil. O Estado do Ceará diagnosticou 2.066 casos novos só no ano de 2012, com um coeficiente de detecção geral de 24,0/100.000 habitantes. A transmissão da doença está relacionada com eliminação dos bacilos provenientes de pacientes multibacilares através do trato respiratório superior e, como a bactéria fica em suspensão no ar, ocorre a posterior contaminação de outra pessoa. A existência de casos clínicos da doença nos quais os pacientes não tiveram nenhum contato anterior com portadores de hanseníase e, ainda, áreas com casos próximos de fontes de água sugere infecção do ser humano com fontes ambientais. Por isso, atualmente, pesquisa-se a possível interferência de fatores ambientais e animais silvestres na transmissão da hanseníase, como solo, água, vegetação e tatus. O ambiente funcionaria como uma espécie de reservatório, permitindo que o bacilo permaneça infeccioso após longos períodos fora do corpo humano. Este estudo tem como objetivo principal detectar e quantificar bacilos de *M. leprae* por qPCR em amostras de águas ambientais provenientes de municípios cearenses. Foram coletadas cinco réplicas de cada um dos 30 reservatórios selecionados, totalizando 149 amostras. O DNA total foi extraído através de kit específico para amostras ambientais de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi realizado a amplificação do gene *16S rRNA* de *M. leprae* através de qPCR com o uso do kit SYBR Green PCR Master Mix. Utilizou-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de plasmídeo pIDTBlue 16SrRNAMlep para quantificar o DNA presente nas amostras ambientais. As amostras ambientais do município de Juazeiro do Norte e as amostras clínicas provenientes de pacientes atendidos no CDREM foram genotipadas e subtipadas por PCR-RFLP. O DNA de *M. leprae* foi detectado em todos os municípios estudados. Do total de 149 amostras de água analisadas, 81 (54,4%) foram positivas para a pesquisa de DNA. O número de cópias de *M. leprae* se manteve no intervalo de $1,42 \times 10^{-1}$ a $1,44 \times 10^{+2}$. A maioria das amostras clínicas apresentou genótipo 4 (64%) enquanto que 100% das amostras de Juazeiro do Norte foram SNP 4. Com relação a subtipagem, o SNP 4-N foi o mais presente dentre as amostras analisadas. Este estudo indica a existência de DNA de *M. leprae* nas amostras de águas ambientais, mostrando fundamentalmente a presença de bacilos nas águas analisadas. Também relata que a maioria das cepas de *M. leprae* das fontes ambientais estudadas é do mesmo subtipo das isoladas do homem. Dessa forma, são necessários mais estudos a fim de ampliar o conhecimento da influência da água na transmissão da hanseníase.

Palavras-chave: *M. leprae*, qPCR, DNA, água ambiental

ABSTRACT

Leprosy is a chronic granulomatous infectious disease occasioning damage in skin and peripheral nerves, caused by *Mycobacterium leprae*, an intracellular agent unable to grow in axenic culture media. In 2012, 232.857 new cases were detected, and out of these 33.303 (14, 30%) were detected only in Brazil. Ceará diagnosed 2,066 new cases only in 2012, with an overall detection ratio of 24.0 / 100,000 inhabitants. Transmission is related to the bacilli eliminate from MB patients by the upper respiratory route and consequent contamination the air. The existence of clinical cases in which patients had no previous contact with leprosy patients and also the finding of cases near water sources suggests infection of humans by environmental sources. Currently, it is suggested the possible influence of environmental factors and wild animals in the transmission of leprosy as soil, water, vegetation and armadillos. The environment behave as a kind of reservoir, allowing infectious bacilli remain viable after long periods outside the body. This study aims to detect and quantify *M. leprae* bacillus by qPCR environmental water samples from Ceará municipalities. Five samples from each one of the 30 water reservoir were collected, being a total of 149 samples. Total DNA was extracted by specific environmental samples kit according to the manufacturer's recommendations. Subsequently, was performed the amplification of *M. leprae 16S rRNA* gene by qPCR using the SYBR Green PCR Master Mix kit. We used a standard curve with known concentrations of pIDTBlue 16SrRNAMlep plasmid to quantify the DNA present in environmental samples. Environmental samples of Juazeiro do Norte municipality and clinical samples from patients treated at CDREM were genotyped and subtyped by PCR-RFLP. *M. leprae's* DNA was detected in all the districts studied. Out of the total of 149 water samples analyzed, 81 (54.4%) were positive for the detection of DNA. The number of copies of *M. leprae* was in the range of $1,42 \times 10^{-1}$ to $1,44 \times 10^{+2}$. Most clinical samples presented genotype 4 (64%) whereas 100% of Juazeiro samples were SNP 4. The SNP 4-N was the most present both among the clinical and environmental samples. This study indicates the presence of *M. leprae* DNA in samples of environmental water, essentially demonstrates the presence of bacilli in the water analyzed. Thus, further studies are needed in order to enhance knowledge of the influence of the water in the transmission of leprosy.

Keywords: *M. leprae*, qPCR, DNA, environmental water

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxa de incidência da hanseníase relatado pela OMS no início de 2012. .	20
Figura 2 – Esquema representativo dos 4 genótipos de SNPs.....	30
Figura 3 – Mapa do Estado do Ceará com destaque para os municípios de Boa Viagem, Crato, Juazeiro do Norte, Mulungu e Sobral.....	35
Figura 4 – Fluxogramas resumidos contendo os principais ensaios realizados no estudo.	36
Figura 5 – Imagem gráfica do plasmídeo pIDTBlue confeccionado pela empresa <i>Integrated DNA Techonologies</i> (IDT®).....	39
Figura 6 - PCR- RFLP para detecção do genótipo de <i>M. leprae</i>	42
Figura 7 – Frequência de positividade da amplificação do DNA referente à região <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> nos 149 reservatórios de águas ambientais dos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral, Boa Viagem e Mulungu.	45
Figura 8 – Curva de amplificação da diluição seriada do plasmídeo pIDT16SrRNAMleprae para detecção da sensibilidade analítica da qPCR.....	46
Figura 9 – Curva de dissociação da qPCR do ensaio de sensibilidade analítica dos iniciadores 16S3 rRNA.....	47
Figura 10 – Curva de dissociação da qPCR do ensaio de especificidade dos iniciadores 16S3 rRNA	48
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto de amplificação do ensaio de especificidade dos iniciadores 16S3 rRNA	49
Figura 12 – BLAST da região genômica de 158 pb do gene <i>16S rRNA</i> de <i>M. leprae</i>	50
Figura 13 – Frequência de amplificação do DNA referente ao gene <i>16S rRNA</i> de <i>M. leprae</i> nos 149 reservatórios de águas ambientais dos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral, Boa Viagem e Mulungu.	51

Figura 14 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene 16S rRNA de <i>M. leprae</i> por qPCR nos 9 reservatórios de águas ambientais dos municípios de Juazeiro do Norte (N= 25) e Crato (N= 20).	52
Figura 15 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene 16S rRNA de <i>M. leprae</i> por qPCR nos 8 reservatórios de águas ambientais do município de Sobral (N=40).	52
Figura 16 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene 16S rRNA de <i>M. leprae</i> por qPCR nos 7 reservatórios de águas ambientais do município de Boa Viagem (N= 34).	53
Figura 17 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene 16S rRNA de <i>M. leprae</i> por qPCR nos 6 reservatórios de águas ambientais do município de Mulungu (N= 30).	53
Figura 18 – Regressão linear entre os valores de C_T e as diluições do DNA plasmidial de <i>M. leprae</i>	55
Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose 3% da PCR-RFLP envolvendo o produto de amplificação da região 14676 e a digestão enzimática com 10U/ μ L da enzima de restrição <i>SmlI</i>	57
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 2% com o produto de amplificação da região de deleção 1476519 referente a subtipagem do SNP 4.	59
Figura 21 – Os municípios de Juazeiro do Norte e Crato e os nove (09) pontos de coleta (J1 – J5/ C1 – C4).	81
Figura 22 – O município de Boa Viagem e os sete (07) pontos de coleta (B1 – B7)..	81
Figura 23 – O município de Sobral e os oito (08) pontos de coleta (S1 – S8).	82
Figura 24 – O município de Mulungu e os seis (06) pontos de coleta (M1 – M6)	82

Figura 25 - Eletroferograma de sequenciamento do gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> da amostra de água ambiental J1a.....	83
Figura 26 - Alinhamento do sequenciamento do gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> das amostras de água J1a e S1a com a referência de <i>M. leprae</i> (Br4923 GenBank: FM211192.1) no NCBI.	83
Quadro 1 - Iniciadores para amplificação de 158pb do gene da <i>16S rRNA</i>	40
Quadro 2 - Iniciadores para detecção do genótipo de <i>M. leprae</i>	42
Quadro 3 - Iniciadores para detecção do subgenótipo 4 do <i>M. leprae</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de contingência da análise dos resultados de todos os municípios estudados pelas técnicas de PCR convencional e qPCR.	54
Tabela 2 – Média dos C_{Ts} , desvio padrão e intervalo do número de cópias de <i>M. leprae</i> nas amostras ambientais de cada ponto de coleta dos municípios pesquisados	56 e 57
Tabela 3 – Caracterização molecular de <i>M. leprae</i> proveniente das amostras clínicas de pacientes atendidos no CDERM e das amostras ambientais DNA positivas do município de Juazeiro do Norte.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	antes de Cristo
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C _T	<i>Threshold Cycle</i>
DLL	Hanseníase lepromatosa difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
fg	fentograma
FRLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IB	Índice Baciloscópico
IgM	Imunoglobulina M
kDa	kilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
MB	Multibacilar
MBL	<i>Mannose-binding Lectine</i>
mg	miligrama
MRC 1	<i>Mannose Receptor type C 1</i>
MORHAN	Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NRAMP 1	<i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACRG	<i>Parkin Coregulated Gene Protein</i>
PARK 2	<i>Parkin Ubiquitin Protein Ligase</i>
PB	Paucibacilar
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGL-1	Glicopeptídeo fenólico 1
PNL	Hanseníase Neural Pura
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RLEP	Elemento específico repetitivo de <i>M. leprae</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SNP	Polimorfismo de base única
VDR	Receptor de vitamina D
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Hanseníase: Visão geral e relatos históricos.....	16
1.2 Características de <i>Mycobacterium leprae</i>	18
1.3 Epidemiologia.....	19
1.4 Hanseníase e suas formas clínicas.....	21
1.5 Transmissão.....	22
1.6 Diagnóstico.....	24
1.7 Diagnóstico Molecular.....	26
1.8 Tratamento.....	27
1.9 Fonte Ambiental.....	27
1.10 Polimorfismo de Nucleotídeo Único.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Tipo e local de estudo.....	35
4.2 Amostras ambientais: coleta e processamento.....	35
4.3 Amostras clínicas: coleta e processamento.....	37
4.4 Detecção do gene <i>gyrA</i> específico de <i>M. leprae</i> por PCR convencional.....	38
4.5 Confeção do plasmídeo pIDTBlue e obtenção da curva padrão.....	39
4.6 PCR em tempo real das amostras ambientais.....	40
4.6.1 Determinação da sensibilidade analítica e da especificidade da qPCR para a detecção de <i>M. leprae</i>	40
4.7 Técnicas de Genotipagem de <i>M. leprae</i>	41
4.8 Subtipagem do SNP tipo 4.....	43
4.9 Sequenciamento do produto amplificado na PCR convencional para a região <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i>	43
4.10 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 PCR convencional da região <i>gyrA</i> específica de <i>M. leprae</i>	45
5.2 Sensibilidade analítica e especificidade da qPCR.....	45

5.3 Pesquisa do DNA de <i>Mycobacterium leprae</i> nas amostras ambientais por PCR em tempo real	50
5.4 Quantificação do número de cópias de <i>Mycobacterium leprae</i> por PCR em tempo real	54
5.5 Genotipagem das amostras clínicas e amostras ambientais de Juazeiro do Norte DNA positivas	56
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CDERM	76
ANEXO B – Protocolo para extração de DNA de bactérias a partir de colônias em ágar	77
ANEXO C – Protocolo para extração de DNA de biópsia com utilização do kit <i>DNeasy Blood & Tissue</i> (QIAGEN®)	78
ANEXO D – Protocolo de extração de DNA proveniente de água ambiental com o kit PowerWater DNA Isolation (Mo Bio®)	79
ANEXO E – Visão espacial das cidades estudadas com os respectivos pontos de coleta.	81
ANEXO F - Confirmação dos ácidos nucleicos de <i>M. leprae</i> por sequenciamento	83
ANEXO G – Relação $A_{260}/_{280}$ e concentração do DNA total extraído das amostras ambientais	84
ANEXO H – Apresentações em Congressos e Encontros Universitários	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase: Visão geral e relatos históricos

A hanseníase, antigamente conhecida pelo termo lepra, é uma doença infecciosa crônica e granulomatosa responsável por afetar principalmente a pele e os nervos periféricos, ocasionando alterações de sensibilidade (térmica, dolorosa e tátil), neuropatia, espessamento neurais, lesões na pele e deformidades desabilitantes (ARAÚJO, 2003; WALKER; LOCKWOOD, 2007).

O agente etiológico da hanseníase foi uma das primeiras bactérias a ser relacionada com o desenvolvimento de uma doença. A descoberta foi atribuída ao médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, que aboliu a ideia de uma enfermidade hereditária, defendendo a hipótese de contagiosidade da hanseníase com publicação em 1874 (SCHMIDT, 2012). A doença é conhecida desde a Antiguidade, com relatos que apontam evidências da hanseníase em múmias da Índia de 2000 anos a.C. (ROBBINS *et al.*, 2009).

Mycobacterium leprae é um agente intracelular obrigatório que possui um longo período de incubação no hospedeiro, levando cerca de dois a 12 anos para desenvolvimento da doença (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). Alguns aspectos sobre a fisiologia básica do bacilo, como o mecanismo exato da transmissão da doença, permanecem sem entendimento completo. Uma análise do DNA de cepas de *M. leprae* indicou que a bactéria teve origem na África e distribuiu-se para Ásia, sendo considerados continentes berço da hanseníase (VISSCHEDIJK *et al.*, 2000; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Considera-se que a doença chegou ao Brasil por volta do século XVIII por meio da colonização europeia e, principalmente, através dos navios de tráfico negreiro oriundos da África (MONOT *et al.*, 2005, LASTÓRIA; ABREU, 2014a).

O isolamento de pacientes com hanseníase no Brasil foi iniciado pelo sanitarista Oswaldo Cruz. Porém, foi o médico Ernani Agrícola que iniciou a campanha de centralização como método de combate a hanseníase durante os anos de 1933 e 1935. A campanha era dividida em três locais: os leprosários, estabelecimentos nos quais todos os hanseníacos deveriam ficar isolados socialmente dos cidadãos sadios para impedir a transmissão da doença; os centros de prevenção, cuja função seria tratar os filhos de pais doentes; e as dispensarias. A política de segregação compulsória era bastante rígida de forma que os doentes eram completamente impedidos de manter contatos com seus familiares (MACIEL; OLIVEIRA; GALLO, 2003).

O tratamento para hanseníase utilizado naquele período tinha origem em uma tradição dos povos hindus empregada há muitos séculos para o tratamento de doenças de pele: óleo de chaulmoogra. Na composição do óleo existem os ácidos hidocárpico e chaulmúgrico, considerados os responsáveis pela ação terapêutica nos casos de hanseníase. O mecanismo de ação exato desses ácidos não é conhecido, porém acreditava-se que eles atuavam por uma ação bactericida e uma influência no setor imunológico (SANTOS; SOUZA; SIANI, 2008).

Por fim, em 1923, o bacteriologista Emílio Gomes verificou que o tratamento com o óleo de chaulmoogra não levava ao desaparecimento de *M. leprae* das lesões de pele dos doentes. Em 1941, foi introduzido no laboratório do Leprosário Nacional dos Estados Unidos da América o uso das sulfonas como tratamento substituto para a hanseníase, as quais demonstraram ser um medicamento bem mais eficiente (SANTOS; SOUZA; SIANI, 2008).

Na década de 1980 ocorreram importantes mudanças a respeito da enfermidade. Primeiro, foi implementado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a política de poliquimioterapia, que diminuiu consideravelmente o tempo de tratamento da hanseníase. Segundo, foram realizadas numerosas campanhas para difundir o emprego do termo hanseníase no lugar de lepra, substituição definida em 1970. Além disso, ocorreu a criação do MORHAN (Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase) com finalidade de garantir a reinserção social dos cidadãos doentes, eliminando o preconceito e estigma em torno da doença e garantindo o direito dos pacientes (MACIEL; OLIVEIRA; GALLO, 2003; MOVIMENTO DE REINTEGRAÇÃO DAS PESSOAS ATINGIDAS PELA HANSENÍASE, 2011).

Trabalhos têm demonstrado a descoberta de um novo patógeno causador de uma forma característica da enfermidade conhecida como hanseníase lepromatosa difusa (DLL), a qual é endêmica no México e na Costa Rica. Essa forma da doença afeta dispersamente a pele, causando infiltração cutânea não nodular, oclusão vascular e vasculite na derme. O novo agente, chamado de *Mycobacterium lepromatosus* diverge do *M. leprae* em 9,1% dos nucleotídeos analisados de 20 genes e pseudogenes além de 2,1% no gene *16S rRNA*. Todavia as duas espécies seriam provenientes de um mesmo ancestral que se especializou no parasitismo obrigatório celular e seguiu dois caminhos evolucionários diferentes a aproximadamente 10 milhões de anos atrás. Hipóteses variam em como os bacilos causadores da hanseníase iniciaram seu contato com humanos. Uma delas aponta que o ancestral comum de hanseníase infectou espécies ancestrais de macacos e, alguns milhões de anos depois, os hominídeos infectados deram origem ao homem moderno. Em vez disso, a outra hipótese propõe que o ancestral da hanseníase infectava diversos hospedeiros, incluídos macacos, e acidentalmente a

uns cem mil anos atrás foi transmitido para os humanos (HAN *et al.*, 2008, HAN; SILVA, 2014).

1.2 Características de *Mycobacterium leprae*

M. leprae pertence à classe Schizomycetes, à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (EICHELMANN *et al.*, 2013). É um bacilo imóvel, não formador de esporos, microaerófilo e apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou levemente curvo. Mede aproximadamente 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura, sendo considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) e corado exclusivamente pela técnica de Ziehl-Neelsen, com preferência de organização em cadeias paralelas, conhecido como globia (ELLIS; ZABROWARNY, 1993; LASTÓRIA; ABREU, 2014a).

A parede celular, assim como ocorre nas outras micobactérias, é altamente rica em lipídios, o que lhe confere as características de crescimento lento, resistência a detergentes, a antibióticos comuns e ao descolorimento da fucsina frente à álcool e ácidos (MURRAY *et al.*, 2000). Externamente à membrana plasmática, encontra-se uma densa camada de peptidoglicano ligado covalentemente ao arabinogalactano. Os ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa com cerca de 60 a 90 átomos de carbono) apresentam-se ancorados a camada de arabinogalactano. Outros componentes importantes presentes na parede celular são o lipoarabinomanana e o glicopeptídeo fenólico 1 (PGL 1) (VINCENT *et al.* 2000, SCOLLARD *et al.*, 2006).

O PGL 1 é o componente trissacarídeo antigênico presente em maior concentração na parede celular, sendo considerado o responsável pelo mecanismo de escape do bacilo frente aos reativos intermediários de oxigênio produzidos pelos macrófagos e pela capacidade de interação entre o bacilo e a laminina α -2 presente especificamente na lâmina basal das células de Schwann (VINCENT *et al.* 2000, SANTOS *et al.*, 2005, SCOLLARD *et al.*, 2006).

O bacilo se reproduz por meio de fissão binária e o tempo de geração demora em média 11 a 14 dias para ocorrer em coxim plantar de camundongo, principalmente devido à alta concentração de conteúdo lipídico da parede celular. A preferência por infectar macrófagos (presentes na pele) e células de Schwann (presente nos nervos periféricos), revela que a temperatura ideal para crescimento permanece em torno de 27 a 30°C. (EICHELMANN *et al.*, 2013, LASTÓRIA; ABREU, 2014a).

M. leprae obtém energia a partir de duas formas: a conversão da glicose em piruvato pela via de Embden-Meyehorf-Parnas e, preferencialmente como fonte de carbonos, a β oxidação lipídica. Percebe-se que macrófagos infectados pelo bacilo tornam-se ricos em

fosfolípídeos e ácidos graxos contidos em corpúsculos de gordura. Estudos indicam que esses lipídeos têm origem do hospedeiro e que a bactéria inibe a lipólise celular, ativa a regulação de genes relacionados com síntese de colesterol e aumenta a captação de colesterol exógeno para garantir sua sobrevivência e multiplicação dentro da célula (SCOLLARD *et al.*, 2006, MATTOS *et al.*, 2010, SINGH; COLE, 2011, MATTOS *et al.*, 2014).

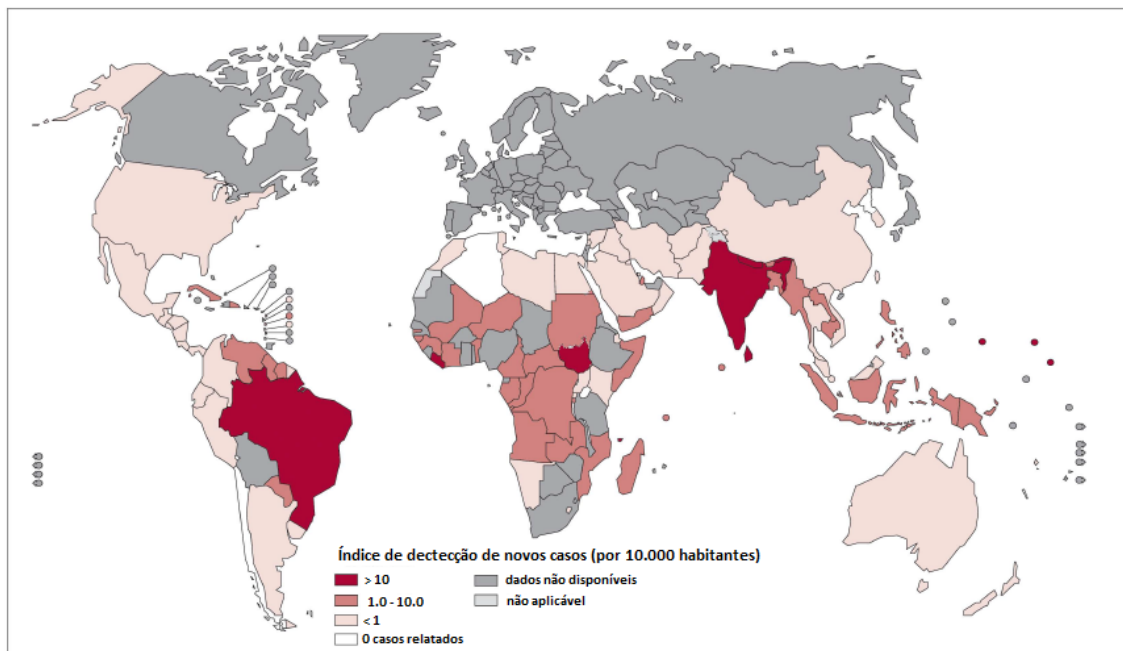
Em estudo analisando comparativamente o genoma completo do *M. leprae* obtido de tatu com o genoma de *M. tuberculosis*, observou-se que houve uma perda maciça de genes durante a evolução por parte de *M. leprae*. Possuindo um genoma com 3.268.203 pb e um conteúdo de citosina + guanosina de 57,8%. Também foi observado que somente 49,5% do genoma é capaz de codificar para a produção de proteínas. Sabe-se que *M. leprae* possui o maior número de pseudogenes do gênero *Mycobacterium* e a maior relação entre pseudogenes e tamanho do genoma das bactérias conhecidas. Foram observadas mutações em genes relacionados ao reparo do DNA, transporte e efluxo de aminoácidos, peptídeos, cátions e ânions importantes. Os pseudogenes estão particularmente relacionados com os mecanismos de degradação, enquanto que as vias de síntese, principalmente dos componentes da parede celular, permanecem praticamente intactos (COLE *et al.*, 2001; VISSA; BRENNAN, 2001; SCOLLARD *et al.*, 2006; AKAMA *et al.*, 2010).

A combinação da grande quantidade de pseudogenes (1.116) e da redução de genoma podem ter afetado vários mecanismos bioquímicos catabólicos essenciais, resultando na inabilidade de crescimento bacilar em meios de cultura axênicos e na compensação dessas ausências de caminhos metabólicos pela obrigatoriedade do parasitismo celular para sobrevivência (COLE *et al.*, 2001; VISSA; BRENNAN, 2001; SCOLLARD *et al.*, 2006).

1.3 Epidemiologia

No ano de 2012, foram detectados 232.857 casos novos distribuídos em 115 países, sendo desses 33.303 (14, 30%) detectados somente no Brasil. Apenas no primeiro trimestre do ano de 2013, foi obtida uma taxa de prevalência mundial de 0,33/10.000 habitantes com 189.018 casos novos. Países como Índia, Brasil, Indonésia, Nepal, Myanmar, Madagascar e Moçambique são responsáveis por aproximadamente 90% de todos os casos de hanseníase detectados em todo o mundo (WHO, 2013).

Figura 1 – Taxa de incidência da hanseníase relatado pela OMS no início de 2012.



Fonte: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_DR_2011.pdf

O Brasil é o segundo país em números de casos novos, perdendo somente para a Índia. Com relação ao continente americano, 80% dos casos da doença ocorrem no Brasil. No ano de 2010, foram registrados no país 34.894 casos novos, sendo 2.461 casos em menores de 15 anos e um coeficiente geral de detecção de 18,2/100.000 habitantes (BRASIL, 2010a).

Segundo a OMS, uma enfermidade é considerada eliminada quando a prevalência é reduzida para menos de um caso por 10.000 habitantes ao ano. O Brasil apresenta situações contrastantes, pois enquanto os estados das regiões Sul e Sudeste, com exceção do Espírito Santo, apresentaram baixos coeficientes de detecção e coeficientes de prevalência, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são consideradas as mais endêmicas e permanecem preocupantes. Os estados de Rondônia, Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Pará, Maranhão e Piauí foram classificados como hiperendêmicos, com mais de 40 casos novos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2010a). Também é observada uma tendência de estabilização dos coeficientes de detecção, mas as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste concentram aproximadamente 55% dos casos detectados em apenas 17,5% da população brasileira (CEARÁ, 2013).

O Estado do Ceará diagnosticou 2.066 casos novos só no ano de 2012, ficando na 13ª posição nacional e o 4º lugar do Nordeste, com um coeficiente de detecção geral de 24/100.000 habitantes, atingindo a população economicamente entre 20 a 59 anos com 63,1%. Além disso, a ocorrência da doença em menores de 15 anos foi de 5,3% do total de casos notificados, revelando alto nível de endemicidade e a existência de focos de transmissão ativos de hanseníase (CEARÁ, 2013).

As cidades de Juazeiro do Norte e de Sobral apresentaram altos índices de hanseníase com 114 e 91 casos novos detectados, respectivamente, em 2012. Dessa forma, essas cidades representam o segundo e o terceiro municípios em número de casos novos no estado do Ceará (CEARÁ, 2013). Além disso, três municípios participantes do estudo figuram entre as seis cidades cearenses que iriam receber incentivo financeiro adicional no ano de 2012 do Ministério da Saúde para ampliar as ações contra a hanseníase (SAÚDE, 2012).

Enquanto isso, a cidade de Crato, vizinha da cidade de Juazeiro do Norte e na divisa com o estado de Pernambuco, aparece como hiperendêmica e com 53 casos novos em 2012. O município de Boa Viagem, componente do Sertão Central cearense, apresentou 9 casos novos detectados no mesmo ano, mas o município de Mulungu, localizado no maciço de Baturité a 801 metros de altitude, não obteve nenhum caso de hanseníase registrado em 2012 (CEARÁ, 2013).

1.4 Hanseníase e suas formas clínicas

A hanseníase é uma doença que pode evoluir de diversas maneiras, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). As manifestações clínicas da doença podem ser classificadas segundo: a) Classificação de Madri (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953 *apud* SOUZA, 1997), b) Classificação de Ridley & Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966) e c) Classificação adotada pela OMS (BRASIL, 2002).

Segundo a classificação de Madri, as formas clínicas da doença podem ser divididas nas formas polares, tuberculóide e virchowiana ou lepromatosa; na forma inicial da enfermidade, intermediária; e na forma instável, boderline ou diforma. Essa maneira de classificação considera quatro grandes critérios para definir a forma clínica, são eles: clínico, bacteriológico, imunológico e histológico (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953 *apud* SOUZA, 1997).

A classificação de Ridley & Jopling também utiliza uma divisão da doença em dois polos, mas inclui subgrupos dentro do espectro da polarização. São eles: tuberculóide-tuberculóide, boderline-tuberculóide, boderline-boderline, boderline-lepromatoso e lepromatoso-lepromatoso. Os casos no estágio inicial da doença são classificados como indeterminados. Tanto os critérios clínicos como os bacteriológicos são considerados, havendo uma ênfase nos aspectos imunológicos e histopatológicos (RIDLEY; JOPLING, 1966; SOUZA, 1997; WALKER; LOCKWOOD, 2007).

A classificação preconizada pela OMS em 1982 é bem mais simplificada e tem como finalidade de definir o tipo e o tempo de tratamento necessário, podendo ser realizada quando esfregaços de pele estão indisponíveis, tornando-o um método classificatório amplamente usado em serviços de saúde (WALKER; LOCKWOOD, 2007). Utilizando-se o número de lesões cutâneas e a baciloscopia intradérmica, quando possível, os pacientes podem ser agrupados em dois grupos: paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Os pacientes paucibacilares são aqueles pacientes tuberculóides e intermediários com reação de Mitsuda positiva, baciloscopia negativa e menos de cinco lesões. Já os pacientes multibacilares, referem-se aos pacientes lepromatosos e dimorfos, nos quais a baciloscopia é positiva, reação de Mitsuda negativa e mais de cinco lesões (BRASIL, 2010b).

Outro tipo de apresentação dessa enfermidade é a chamada hanseníase neural pura (PNL). Os pacientes afetados por essa condição não apresentam lesões cutâneas, mas apresentam acometimento assimétrico dos nervos periféricos, o que origina deficiência sensorial e/ou parestesia com ou sem danos motores na região de hipertrofia neural (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; GOULART; GOULART, 2008).

1.5 Transmissão

A principal forma de transmissão da hanseníase ocorre por meio do contato prolongado e contínuo pessoa-a-pessoa. Os pacientes MB, os quais podem abrigar por volta de sete bilhões de bacilos por grama de tecido e 100 milhões de bactérias viáveis na mucosa nasal, podem expelir bacilos através das vias áreas superiores por meio de espirros, secreções nasais, tosses e perdigotos, os quais podem contaminar outros indivíduos. Portanto, contatos sociais, vizinhos e contatos familiares de pacientes multibacilares são associados a um alto risco de infecção (van BERRS; HATTA; KLATSER, 1999; EICHELMANN *et al.*, 2013; LASTÓRIA; ABREU, 2014a).

Apesar da via nasal ser a rota primordialmente aceita, estudos também apontam para a influência da transmissão pela pele contaminada. Acredita-se que os bacilos provenientes da descamação celular de pacientes MB poderiam aumentar o risco da infecção, sendo esses capazes de penetrar na pele lesionada de indivíduos saudáveis. Job e colaboradores, em 2008, demonstraram presença de *M. leprae* em 80% dos lavados de pele de pacientes MB por meio de PCR e pela coloração álcool-ácido (JOB *et al.*, 2008). Além disso, a observação por microscopia eletrônica de bacilos nas células dendríticas, que podem transmitir essa carga bacteriana para os queratinócitos, os quais serão gradualmente eliminados pela descamação da pele, ofereceu um maior embasamento para essa hipótese (GIRDHAR, 2005).

Após invadir o organismo do hospedeiro, seja pela mucosa nasal ou pela pele lesionada, o bacilo se distribui pela via sanguínea para a pele e para os nervos periféricos. A invasão ao sistema nervoso ocorre de “fora para dentro”, isto é, a micobactéria penetra primeiro no epineuro para depois atingir o perineuro e o endoneuro por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos. O bacilo então se liga a membrana basal da célula de Schwann por meio da interação PGL-1 e laminina α -2, e posteriormente, a bactéria é ingerida pela célula, mas a mesma não possui a capacidade de destruir o bacilo. A partir daí, se a resposta imune celular não intervier precocemente, a infecção se instala no organismo (SCOLLARD *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2013).

Vários fatores são relatados com o risco de desenvolver a doença. As condições individuais, como fatores genéticos do hospedeiro, qualidade de vida, higiene, estado nutricional do paciente, presença ou não de cicatriz vacinal com BCG, taxa de exposição a *M.leprae* ou a outras micobactérias ambientais e infecções concomitantes. Além dessas condições, fatores relacionados a condições socioeconômicas desfavoráveis, as quais levam a baixos índices de escolaridade, elevado número de pessoas convivendo em um mesmo ambiente, experiência de escassez de comida e acesso ineficaz a serviços de saúde (VISSCHEDIJK *et al.*, 2000; KERR-PONTES *et al.*, 2006; JOYCE, 2012).

Alguns genes são relacionados com a susceptibilidade para a hanseníase. Por exemplo, os genes PARK2/PACRG (responsável pelo processamento de proteínas antigênicas em macrófagos para posterior apresentação a linfócitos), NRAMP1 (atribuído ao transporte de ferro e outros cátion pela membrana do fagossomo), MRC1, MBL (proteína presente no soro que se liga ao LAM e ativa a via das lectinas do complemento) possuem polimorfismos que podem estar associados ao desenvolvimento da doença (SCOLLARD *et al.*, 2006; SAPKOTA *et al.*, 2010). O antígeno leucocitário humano classe II possuem alelos associados ao tipo de hanseníase apresentada. Dessa forma, os pacientes que possuem alelo HLA-DQ1 desenvolvem hanseníase lepromatosa enquanto que HLA-DR2 e HLA-DR3 estão presentes nos pacientes do polo tuberculóide. Essa mesma associação é feita com alelos do gene do receptor para vitamina D (VDR), pois a homozigose recessiva (tt) está mais presente nos pacientes tuberculóides e a homozigose dominantes (TT) é frequentemente encontrado nos pacientes lepromatosos (ROY *et al.*, 1999; SCOLLARD *et al.*, 2006; EICHELMANN *et al.*, 2013; LASTÓRIA; ABREU, 2014a).

Frota e colaboradores (2010) detectaram que a soropositividade IgM PGL-1 de contatos e não contatos de casos em área endêmica do Ceará se demonstrou similar, indicando que grande parte da população já entrou em contato anterior com o bacilo e desenvolveu anticorpos protetores. Apesar de a soropositividade para IgM PGL-1 não ser uma boa

ferramenta investigativa, porque não existe um ponto de corte para diferenciar os casos de hanseníase da infecção subclínica, os pesquisadores concordam que contatos soropositivos possuem 7,2 maiores chances de apresentar hanseníase (FROTA *et al.*, 2010; LASTÓRIA; ABREU, 2014a).

Portanto, os contatos de pacientes hansênicos são um grupo de risco e devem ser acompanhados continuamente para prevenir o surgimento da doença. Goulart e colaboradores observaram que os contatos colonizados por *M. leprae* no nariz (4,7% positivos para PCR no swab nasal) e que apresentavam a doença subclínica (13% positivos para IgM) podem ser os responsáveis pela disseminação da doença (GOULART *et al.*, 2012). Em um estudo para detecção de IgM PGL-1 em contatos, foram diagnosticados com hanseníase 3,3% dos contatos selecionados para o trabalho (FOSS *et al.*, 2011). Além disso, a consanguinidade demonstra ser um fator importante, porque o diagnóstico de hanseníase é maior para os filhos de pacientes hansênicos e cônjuges com parentesco (32%) do que para cônjuges sem relação familiar (2,87%). Os contatos crianças são um grupo maior de risco e o risco de transmissão aumenta com a idade (JOYCE, 2012).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é basicamente baseado na histórica clínica e epidemiológica do paciente (BRASIL, 2002). O tipo mais comum de exame laboratorial solicitado é a baciloscopia. Porém, se o seu resultado for negativo, não se exclui a possibilidade de hanseníase. Dessa maneira, a OMS (BRASIL, 2010b, p. 2) definiu como paciente com hanseníase aquele que apresentar uma ou mais de uma das seguintes características:

- a) lesão(ões) e/ou área(s) da pele com alteração de sensibilidade;
- b) acometimento de nervo(s) periférico(s), com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou anatômicas; e
- c) baciloscopia positiva de esfregaço intradérmico.

O diagnóstico precoce da hanseníase é um fator fundamental para o combate eficaz da doença, pois diagnóstico tardio conduz a continuidade da transmissão e ao aumento do risco de provocar incapacidades físicas e deformidades (VISSCHEDIJK *et al.*, 2000; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Durante a anamnese do paciente, procura-se qualquer indício de sinais e sintomas da doença, além de possíveis vínculos epidemiológicos. Normalmente, os pacientes com hanseníase se queixam de manchas dormentes na pele, dores, câimbras e formigamentos. A avaliação dermatológica procura investigar as lesões características da hanseníase, sendo as

manchas hansênicas encontradas na face, na orelha, nos braços, nas pernas, nas costas e nas nádegas (BRASIL, 2002).

Também são realizados testes para averiguar a sensibilidade térmica, dolorosa e tátil nas lesões, além da avaliação neurológica. Os nervos frequentemente afetados são: trigêmeo, facial, radial, ulnar, mediano, fibular comum e tibial posterior. Procura-se por espessamento neural ou sensações de dor ou dormência e, por fim, é realizada a avaliação da força muscular (BRASIL, 2002; SANTOS *et al.*, 2005).

A baciloscopia é solicitada pela facilidade de execução e pelo custo baixo envolvido, possuindo uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 50%. Os raspados de tecido dérmico dos lóbulos auriculares, cotovelos e de lesão suspeita são corados por Ziehl-Neelsen à frio (coloração de Wade) e lidos à procura do bacilo de Hansen para expressar o resultado sob a forma de índice baciloscópico (IB), numa escala desenvolvida por Ridley que vai de 0 a 6+. Os pacientes com baciloscopia negativa se encontram no extremo tuberculóide, enquanto que a forma virchowiana e algumas variações de borderline apresentam baciloscopia fortemente positiva (BAPTISTA; SARTORI; TRINO, 2006; ARAÚJO, 2003; SANTOS *et al.*, 2005; EICHELMANN *et al.*, 2013).

O exame histopatológico pode ser necessário em casos de dúvida diagnóstica ou para esclarecer classificação da forma clínica. É realizada com uma parcela da lesão da pele ou do nervo afetado e a utilização da coloração hematoxilina-eosina ou com a técnica de Fite-Faraco (EICHELMANN *et al.*, 2013; LASTÓRIA; ABREU; 2014b)

Porém, a baciloscopia mostra-se falha nos casos de pacientes PB, porque para serem detectados, os bacilos de Hansen devem estar presentes em uma quantidade de 10^4 bacilos por grama de tecido. Além de possuir sensibilidade baixa, em alguns casos, o IB permanece inalterado durante e após o tratamento, demonstrando a ineficiência da baciloscopia no acompanhamento dos casos (HIRAWATI *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2009).

A PNL é de difícil diagnóstico, pois a ausência de manchas de pele pode indicar outra doença causadora de neurite. Além disso, a detecção de bacilos pela baciloscopia é ineficaz e complicada pela histopatologia da biópsia de nervo, que é considerada o padrão ouro para esse tipo de apresentação da hanseníase (GOULART; GOULART, 2008).

Existem outros testes que não possuem valor diagnóstico em si por não possuírem especificidade e sensibilidade satisfatórias, mas são úteis como auxiliares na classificação da forma clínica da doença ou como avaliadores de prognóstico. São eles: reação de Mitsuda e pesquisa de anticorpo anti- PGL1.

A reação de Mitsuda é um teste de aplicação intradérmica de 0,1 mL de lepromina, uma suspensão inativada de tecidos lepromatosos (BEIGUELMAN, 2002; LASTÓRIA; ABREU, 2014b). O antígeno PGL 1 está presente na parede celular de *M. leprae* e é específico para o bacilo de Hansen. Como é uma molécula glicolípida, ocorre a formação de anticorpos sem a participação de linfócitos T, com predominância de anticorpos da classe IgM. Porém, nos estudos sorológicos, pesquisam-se os títulos de IgM por estarem correlacionados com a forma clínica, a atividade da doença e episódios reacionais. Pela característica da forma virchowiana, esses pacientes apresentam níveis elevados do anti- PGL1, os quais tendem a diminuir com o tratamento específico (SANTOS *et al.*, 2005; MOURA, 2008; LASTÓRIA; ABREU, 2014b).

1.7 Diagnóstico Molecular

Diversos estudos têm demonstrado a possibilidade da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou da transcrição reversa para identificação do *M. leprae* em espécimes biológicas, como sangue, esfregaços nasais, biópsias de pele e lesões de nervo. Entretanto, essas técnicas, apesar de serem altamente específicas e sensíveis, não são utilizadas rotineiramente (MADELEINE *et al.*, 1993; HIRAWATI *et al.*, 2006; PHETSUKSIRI *et al.*, 2006; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Alguns iniciadores conhecidos para a detecção do *M. leprae* são: antígeno 18kDa (WILLIAMS *et al.*, 1990), antígeno 36kDa (HARTSKEERL; DE WIT; KLATSER, 1989), 16S rRNA (KURABACHEW; WONDUMI; RYON, 1998) e RLEP (DONOGUE; HOLTON; SPIGLEMANN, 2001).

A principal vantagem do uso da técnica de PCR é a detecção de *M. leprae* em espécies biológicas mesmo com poucas bactérias presentes no material analisado, principalmente útil na avaliação de pacientes PB e PNL. Além disso, a possibilidade de aplicação da técnica em diversos materiais clínicos torna a PCR uma ferramenta bastante proveitosa. A desvantagem da PCR convencional encontra-se no fato que é um método puramente qualitativo, não permitindo quantificar o número de bacilos presentes. Porém, a qPCR (PCR em tempo real), a qual vem sendo muito utilizada, propicia a rápida quantificação e detecção do espécime durante o curso da reação pelo monitoramento da fluorescência emitida quando o fluoróforo ou sonda específica se liga ao amplicon gerado na reação, sendo que a fluorescência lançada é diretamente proporcional à quantidade do produto formado. Assim sendo, as ferramentas moleculares (PCR e qPCR) encontram-se aplicadas na detecção de DNA

e RNAm tanto para a detecção do bacilo quanto para o acompanhamento do tratamento (KUBISTA *et al.*, 2006; RUDEEANESKIN *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2014).

Martinez e colaboradores avaliaram o uso da PCR convencional e da qPCR para detecção de *M. leprae* em biópsias de pacientes com hanseníase utilizando o gene do antígeno 85-B e obtiveram o limite de detecção para 10pg para a PCR convencional contra 25fg para qPCR. Além disso, a qPCR identificou 79,2% dos casos PB e 83,3% dos pacientes PNL enquanto que a reação convencional verificou 62,5% e 50%, respectivamente. Já o trabalho de Rudeeaneksin e colaboradores analisaram os resultados da qPCR com alvo o gene *16S rRNA* com aqueles obtidos pela baciloscopia, observando um limite de detecção inferior a 20fg de DNA de *M. leprae* na qPCR e uma sensibilidade 25 vezes maior do que na baciloscopia (MARTINEZ *et al.*, 2006; RUDEEANESKIN *et al.*, 2008).

1.8 Tratamento

A classificação operacional adotada pela OMS, a qual divide os enfermos em paucibacilares e multibacilares, indica o tipo de tratamento poliquimioterápico específico utilizado para o paciente hanseníaco implementado pela OMS em 1982 e oficialmente estabilizado no Brasil em 1993. Assim, os PB devem ser tratados durante seis meses com rifampicina (dose mensal supervisionada de 600mg) e dapsona (dose mensal supervisionada de 100mg e dose diária autoadministrada de 100mg), mas as crianças devem receber doses de 450mg de rifampicina e 50mg de dapsona. Já os pacientes MB são tratados durante um ano com clofazimina (dose mensal supervisionada de 300mg e dose diária autoadministrada de 50mg), rifampicina e dapsona, sendo a posologia dos dois últimos fármacos semelhante aos dos pacientes PB. Nesse último esquema, as crianças MB devem receber doses mensais de 150mg de clofazimina e 50mg em dias alternados (BRASIL, 2010b; LASTÓRIA; ABREU, 2014b).

1.9 Fonte Ambiental

A transmissão da hanseníase é atribuída principalmente através da liberação de bacilos do trato respiratório superior de pacientes MB não tratados. Porém, vem sendo pesquisado a possível contribuição de fatores ambientais e animais silvestres na transmissão da hanseníase, por exemplo: água, solo, vegetação e tatus. O ambiente funcionaria como uma espécie de reservatório, permitindo que o bacilo permaneça infeccioso após longos períodos fora do corpo humano e, dessa forma, exista a transmissão e a contaminação continuada da doença (TRUMAN; FINE, 2010).

A existência de casos clínicos da doença nos quais os pacientes não tiveram nenhum contato anterior com hansênicos e, ainda, áreas com casos próximos de fontes de água sugere infecção do ser humano com fontes ambientais (KERR-PONTES *et al.*, 2006; TRUMAN; FINE, 2010). Além disso, um estudo realizado por Desikan e Sreevatsa em 1995 demonstrou a viabilidade de *M. leprae* fora do corpo humano em diversas condições desfavoráveis, sendo verificado que os bacilos sobreviveram sete dias em meio à exposição direta de luz solar durante 3 horas por dia, ou permaneceram vivos por 46 dias em solo úmido (DESIKAN; SREEVATSA, 1995 *apud* TURANKAR *et al.*, 2012).

O tatu (*Dasypus novemcinctus*) é o único hospedeiro natural de *M. leprae* além do ser humano. O primeiro relato de hanseníase em tatus foi realizado em 1975, em Lousiana nos Estados Unidos. Depois dessa comprovação, abriu-se precedentes para questionar a probabilidade de transmissão de hanseníase entre tatus e humanos (TRUMAN, 2005; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Nos Estados Unidos, foram relatados casos de pacientes que não tiveram contato com nenhum outro caso conhecido, mas esses pacientes tiveram de alguma forma contato com tatus, seja na manipulação, tratamento ou consumo da carne do animal. Em 2011, Truman e colaboradores observaram a presença de uma cepa de *M. leprae* encontrada em tatus e em pacientes hansênicos com genótipo similar e característico da região do sul dos Estados Unidos, sendo mais um indicativo da possibilidade de transmissão entre essas espécies (TRUMAN *et al.*, 2011).

No Brasil, em um estudo caso-controle realizado em Vitória, foi demonstrado que o contato direto com tatus era altamente significativo entre os doentes entrevistados, indicando um possível acréscimo do risco de desenvolver a doença (DEPS *et al.*, 2008). Um estudo realizado no Ceará apontou para a presença do *M. leprae* em 21% dos tatus analisados capturados em regiões rurais endêmicas (FROTA *et al.*, 2012).

Outro fator presente na hipótese da contribuição do ambiente na transmissão da hanseníase gera em torno do fato de que amebas de vida livre, naturalmente presentes no solo e na água, podem permitir a sobrevivência e multiplicação de bactérias dentro de sua célula (DRANCOURT, 2014). Ou seja, quando essas bactérias são fagocitadas para servirem como fonte de alimento, elas conseguem driblar o sistema lisossomal e passam a ter um relacionamento endossimbiótico com as amebas de vida livre.

Em 1975, Jadin descobriu que *M. leprae* era capaz de crescer dentro da *Acanthamoeba culbertsoni* (JADIN, 1975 *apud* LAHIRI; KRAHENBUHL, 2008). Foi demonstrado em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos que *M. leprae* sobreviveu e

permaneceu viável pelo menos quatro dias no interior do *A. castellani*, fortalecendo a hipótese que o bacilo de Hansen pode permanecer viável e infeccioso no ambiente durante o tempo que levaria para infectar outro paciente (LAHIRI; KRAHENBUHL, 2008).

Como as amebas são capazes de formarem cistos em situações de estresse ambiental, isso forneceria também proteção e resistência às bactérias fagocitadas frente a temperaturas extremas e biocidas, permitindo a sobrevivência, replicação e distribuição das bactérias no ambiente (BARKER; BROWN, 1994). A interação entre bactérias e amebas de vida livre permite o desenvolvimento de uma relação endossimbionte que se assemelha a patogênese das infecções crônicas bacterianas dentro de células mamíferas (YU *et al.*, 2007).

Estudos realizados na Índia mostraram a detecção de DNA e RNA no solo de áreas endêmicas de pacientes com hanseníase e sem hanseníase, sendo estatisticamente significativa para a área de pacientes (LAVANIA *et al.*, 2006; LAVANIA *et al.*, 2008). Além disso, destacou-se uma presença maior de ácidos nucleicos nas regiões próximas a lugares utilizados para banho e lavagem, além da observação que as amostras de solo possuíam o mesmo tipo de Polimorfismo de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism*) das amostras de pacientes e contatos positivos para DNA. Esse mesmo grupo de pesquisa também detectou 17 amostras de solo DNA positivas para *M. leprae* dentre as 52 amostras coletadas ao redor de casas de pacientes hansenícos (TURANKAR *et al.*, 2012; TURANKAR *et al.*, 2014).

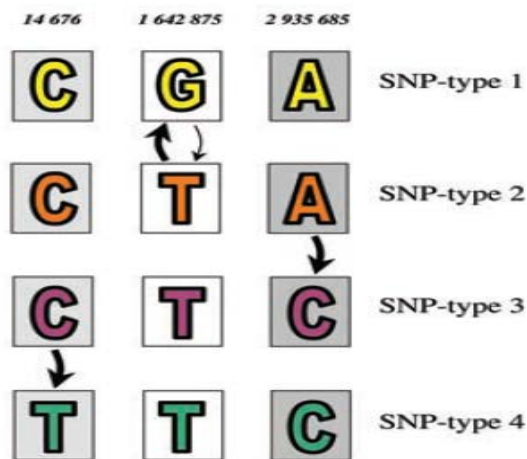
Foram realizadas pesquisas na Indonésia no estudo da presença de DNA de *M. leprae* em fontes de água. Em estudo realizado por Matsuoka e colaboradores, foi detectado a presença de DNA do *M. leprae* em fontes de água utilizadas para banho e consumo humano de vilas endêmicas para hanseníase, sendo a taxa de prevalência da doença significativamente maior para os usuários de água bacilo-positivo. Entretanto, em 2010, Wahyuni e colaboradores pesquisaram a presença de DNA do bacilo em poços de usuários conhecidamente diagnosticados com hanseníase como também em águas provenientes de poços utilizados por pessoas que não possuíam a doença para tentar associar a presença de *M. leprae* em água de consumo humano com a existência de casos da doença. Demonstrou-se que não houve diferença estatística na positividade dos poços utilizados por pacientes (23%) e por não pacientes (26%) e, além disso, todos os sedimentos das águas pesquisadas apresentaram BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen (MATSUOKA *et al.*, 1999; WAHYUNI *et al.*, 2010).

1.10 Polimorfismo de Nucleotídeo Único

Polimorfismo de base única (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* ou SNP) é definido como uma variação em apenas um nucleotídeo na sequência de DNA frequente em mais de 1% na população. Essa alteração pode estar presente tanto em regiões codificadoras (o que caracteriza um gene possuir mais de um alelo) como em regiões não codificantes do DNA (SCITABLE BY NATURE EDUCATION, 2014).

Após o avanço do sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* em 2001, Monot e colaboradores (2005) analisaram cepas provenientes da Índia, do Brasil, da Etiópia, do México, da Tailândia e dos Estados Unidos e detectaram três SNP que se repetiam entre duas ou mais cepas estudadas. Posteriormente, ao pesquisarem diversos materiais clínicos, foram encontrados ao nível global 4 genótipos SNPs informativos provenientes de um único clone (SNP tipos 1, 2, 3 e 4) de *M. leprae*. Assim, apesar do bacilo da hanseníase ter sofrido redução do seu genoma ao longo dos anos, o genoma bacilar é altamente conservado e a ocorrência dos SNPs é rara, acontecendo em cada 28kb. Dessa forma, os SNPs têm sido usados para compreender a evolução e disseminação global do bacilo (MONOT *et al.*, 2005; SAKAMURI *et al.*, 2009; MONOT *et al.*, 2009).

Figura 2 – Esquema representativo dos 4 genótipos de SNPs



Fonte: MONOT *et al.*, 2005. O genótipo 1 é definido pela presença do nucleotídeo G na posição 1641875pb enquanto que o genótipo 2 apresenta o nucleotídeo T nessa mesma posição. O genótipo 3 ocorre pela troca do nucleotídeo A pelo C na posição 2935685pb e o genótipo 4 é resultado da substituição do nucleotídeo C pelo T na posição 14676pb no genoma de *M. leprae*.

Em 2009, depois da análise de novas amostras clínicas, incluindo amostras originadas da Europa e Oriente Médio e de um novo sequenciamento das cepas do Brasil, da Tailândia, da Índia e dos Estados Unidos, foi descoberto que os 4 genótipos SNPs podem ser ramificados em 16 subtipos. O SNP 2 originado no leste da África é dividido em quatro subtipos (E-H), depois

surgiu o SNP 1 decomposto em quatro formas (A-D). O SNP 1 se espalhou pela Ásia, onde apareceu o SNP 3 com cinco subtipos (I-M). Esse último se disseminou para o Oriente Médio e Europa para depois originar o SNP 4, que apresenta três ramificações (N-P), presente no oeste da África e nas Américas (MONOT *et al.*, 2009).

Assim, os estudos de genotipagem vêm sendo realizados com a finalidade de compreender a propagação de *M leprae* no mundo e como uma ferramenta epidemiológica investigativa para avaliar a transmissão da hanseníase em comunidades endêmicas (WENG *et al.*, 2007). Os estudos corroboram os achados de Monot e colaboradores (2009), com a constatação da presença maciça do SNP 3 na China e no Japão, as Filipinas apresentam alta porcentagem de SNP 1, mas também encontra-se SNP3, o México possui todos os 4 genótipos no seu território, assim como a Colômbia, e a Índia com predomínio de SNP 1 (WENG *et al.*, 2007; CARDONA-CASTRO *et al.*, 2009; MATSUOKA *et al.*, 2009; SAKAMURI *et al.*, 2009; KAI *et al.*, 2013; LAVANIA *et al.*, 2013).

No Brasil, as pesquisas demonstraram a prevalência de SNP 3 de cepas procedentes do Sudeste brasileiro, a grande presença de SNP 4 no Nordeste do país e a ausência de cepas com SNP 2. O predomínio da similaridade de SNP por região vai ao encontro da história de colonização das regiões brasileiras. O Nordeste possui hegemonia de SNP 4, um genótipo de origem africana, pela grande utilização de trabalho escravo como mão de obra de forma compulsória e abundantes dos negros africanos nas instalações canavieiras do século XVI. Já o domínio de SNP 3 (presente na África, na América do Norte e na Europa) no Sudeste se explica pela grande imigração de europeus, originada pela abolição da escravatura no país, para trabalhar nas lavouras de café a partir da segunda metade do século XIX (FONTES *et al.*, 2009; FONTES *et al.*, 2012).

A associação de genotipagem de *M. leprae*, por identificação de SNPs, subtipagem com georreferenciamento de casos e o uso de questionários estruturados para investigação de características da população têm sido utilizados para se obter informações sobre agrupamentos de casos e rotas de transmissão do bacilo (CARDONA-CASTRO *et al.*, 2013; WENG *et al.*, 2013)

Como mencionado na seção anterior, a aplicação do SNP também está sendo usada para compreender a importância do ambiente na transmissão da doença. Turankar e colaboradores (2012) encontraram em amostra ambiental de solo presença de RNA de *M. leprae*, indicando viabilidade, com o mesmo genótipo (SNP 1) da amostra clínica do paciente que reside na mesma área. Além disso, observando a dinâmica de genotipagem de uma família, foi observado que a mãe e a filha, casos de hanseníase, possuíam o mesmo subtipo (SNP 1D), mas o marido,

contato que estava apresentando sinais indicativos de infecção com hanseníase, tinha um subtipo diferente (SNP 1C). Assim, essas evidências apontam para que o contato tenha entrado em contato com o bacilo proveniente de outra fonte que não seja os casos presente na casa (TURANKAR *et al.*, 2012).

Outro estudo desse mesmo grupo verificou a presença de DNA do bacilo em amostras de solo coletadas ao redor da casa de casos hansenícos. Após a obtenção de uma positividade de 32,69% das amostras de solo para DNA de *M. leprae*, a análise do tipo de genótipo SNP das amostras DNA positivas e das amostras clínicas dos casos demonstrou que tanto as amostras ambientais quanto as amostras obtidas dos pacientes com hanseníase possuíam a mesmo genótipo SNP 1 (TURANKAR *et al.*, 2014).

Esses trabalhos envolvendo amostras provenientes do ambiente e de pacientes com a realização da genotipagem vêm sugerindo a possibilidade de interação entre os bacilos expelidos dos pacientes MB no ambiente e o posterior contato deles com outros indivíduos susceptíveis, indicando uma nova rota de transmissão do *M. leprae* (TURANKAR *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase continua endêmica no estado do Ceará e a existência de casos novos nos quais não houve contato anterior com outros pacientes MB proporciona questionamentos sobre o envolvimento de fatores ambientais na transmissão da doença (KERR-PONTES *et al.*, 2006; TURANKAR *et al.*, 2012; FROTA *et al.*, 2012). A detecção e a quantificação de DNA de *M. leprae* por qPCR assim como a caracterização genética dos isolados de *M. leprae* presentes nas águas ambientais poderá contribuir para esclarecer o papel do meio ambiente como fonte alternativa de infecção para o homem, independente do contato direto entre o indivíduo suscetível e o caso, assim como explicar a dificuldade de controle da doença em regiões endêmicas (LAVANIA *et al.*, 2008; TURANKAR *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Detectar e quantificar DNA de *M. leprae* por qPCR obtidos de amostras de águas ambientais de cinco municípios cearenses: Boa Viagem, Crato, Juazeiro do Norte, Mulungu e Sobral.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a detecção de DNA de *M. leprae* por PCR convencional das amostras provenientes dos cinco municípios participantes do estudo;
- Comparar os dados obtidos da detecção do bacilo por PCR convencional com aqueles alcançados pela qPCR;
- Avaliar e estabelecer a variabilidade genética dos isolados de *M. leprae* em relação aos quatro SNPs, seguido de subtipagem obtidos de amostras ambientais DNA positivas;
- Comparar o padrão de caracterização molecular das amostras ambientais com os registros da literatura científica;
- Comparar o padrão de caracterização molecular das amostras ambientais com a das amostras clínicas de biópsia de pacientes atendidos no Centro de Referência Dona Libânia;

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo e local de estudo

O estudo do tipo observacional, transversal e analítico aconteceu durante o período de novembro de 2013 e outubro de 2014. O processamento das amostras, as reações de PCR convencional e de genotipagem foram realizadas no Laboratório de Micobactérias do Bloco de Biomedicina da UFC, enquanto que as reações de qPCR ocorreram no Laboratório de Bioquímica Humana do Centro de Ciências da Saúde da UECE e o sequenciamento das amostras foi realizado no Instituto Evandro Chagas em Belém – PA.

4.2 Amostras de águas ambientais: coleta e processamento

As amostras de águas ambientais utilizadas na pesquisa estão armazenadas no Banco de DNA do Laboratório de Micobactérias da UFC. Essas amostras foram coletadas de açudes, rios, riachos, balneários e lagoas pertencentes aos municípios de Boa Viagem, Crato, Juazeiro do Norte, Mulungu e Sobral (Figura 3). Em cada local de coleta, obtiveram-se cinco alíquotas de 1000 mL em frascos âmbar estéreis, totalizando 149 amostras de águas ambientais, as quais foram transportadas refrigeradas em isopor com gelo, dentro do período de 24 horas, para o Laboratório de Micobactérias no bloco de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará. Uma das amostras do município de Boa Viagem foi extraviada e não pode participar do estudo.

Figura 3 – Mapa do Estado do Ceará com destaque para os municípios de Boa Viagem, Crato, Juazeiro do Norte, Mulungu e Sobral.

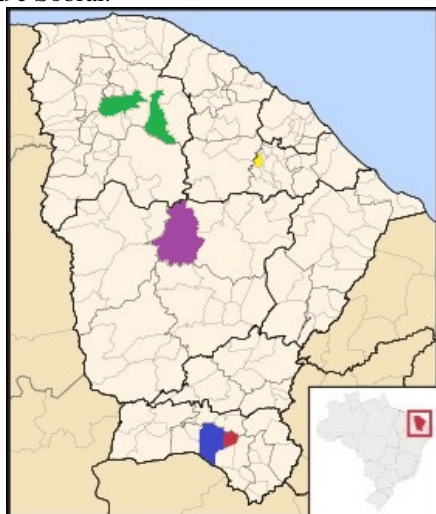


Imagem modificada da fonte:

http://www.cariri.ufc.br/portal/index.php?Itemid=46&id=34&option=com_content&task=view

Destaque em vermelho para o município de Crato, em azul para o município de Juazeiro do Norte, em amarelo para o município de Mulungu, em roxo para o município de Boa Viagem e em verde para o município de Sobral.

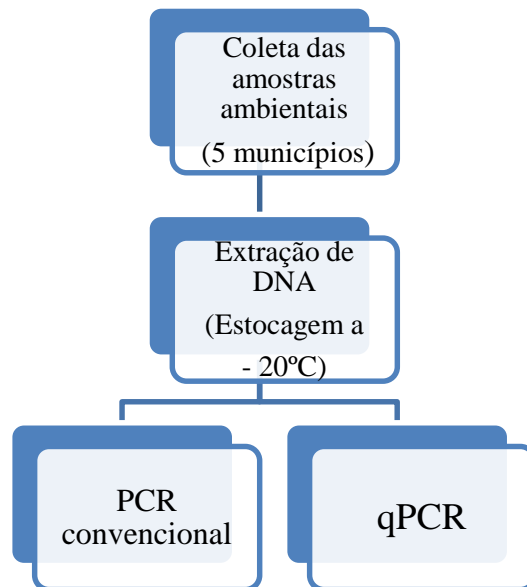
Os municípios foram selecionados de acordo com os dados de prevalência da hanseníase, sendo Juazeiro do Norte, Sobral e Crato municípios com alta prevalência da doença, enquanto que Boa Viagem e Mulungu, de baixíssima ou nenhuma prevalência. Além disso, os pontos de coleta dos municípios foram designados por agentes de saúde locais, os quais indicaram as coleções de água utilizadas para fins de lazer e/ou uso doméstico pelos moradores da comunidade estudada.

A quantificação absoluta do DNA de *M. leprae* foi realizada para os cinco municípios pesquisados. Porém, a genotipagem e a subtipagem somente pode acontecer com as amostras provenientes do município de Juazeiro do Norte, visto que a quantidade de DNA das amostras das outras localidades não foi suficiente para os ensaios.

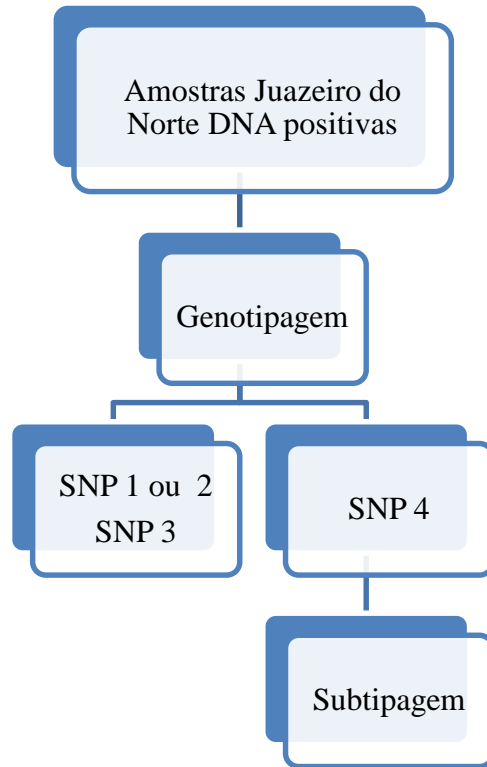
O estudo seguiu o fluxograma da figura 4 (4a e 4b):

Figura 4 – Fluxogramas resumidos contendo os principais ensaios realizados no estudo.

4a. Fluxograma da realização das amplificações por PCR convencional e PCR em tempo real.



4b. Fluxograma da genotipagem das amostras de Juazeiro do Norte.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para extração de DNA das amostras utilizou-se o kit PowerWater DNA Isolation (Mo Bio®). Esse kit requer uma etapa anterior consistindo em uma filtragem à vácuo com os Water Filter de 0,22 μm (Mo Bio®) para concentração das bactérias presentes. Dessa forma, após a homogeneização do conteúdo da garrafa, 100 mL da amostra foram filtradas. Posteriormente, as membranas filtrantes foram removidas cuidadosamente com o auxílio de pinças estéreis e processadas de acordo com o fabricante. Esse processamento incluiu adição de reagentes responsáveis pela lise da parede celular, pela remoção dos inibidores, como o ácido húmico, que poderiam interferir na amplificação do DNA extraído e pela retirada de impurezas do DNA ligado à coluna de sílica, no qual os ácidos nucleicos extraídos ficavam retidos. O DNA obtido foi armazenado à temperatura de -20°C .

Após a extração de DNA, as amostras foram analisadas por espectrofotometria 260nm/280nm no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) para pesquisar a qualidade do DNA (ANEXO G).

4.3 Amostras clínicas: coleta e processamento

As amostras clínicas dessa pesquisa também estão armazenadas no Banco de DNA do Laboratório de Micobactérias da UFC. Esse material clínico foi obtido através da coleta de

biópsias com um *punch* de 6 mm de diâmetro retirados a partir da borda ativa de lesões cutâneas de casos novos não tratados de hanseníase atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia (CDERM) na cidade de Fortaleza, Ceará.

Essas 25 amostras compunham o projeto Portadores de Hanseníase: Estudo Clínico – Epidemiológico da Hanseníase em Área Endêmica do Nordeste do Brasil financiado pelo CNPq, com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CDERM. (ANEXO A)

O material coletado foi transferido para microtubos cônicos de 1,5 mL estéreis e mantidos à temperatura de -20°C até o momento da extração de DNA. O processamento das amostras foi realizado com a utilização do kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN®). Nele, as amostras passaram por uma lise com solução de proteinase K a temperatura de 56°C overnight. Posteriormente, adicionou-se solução que proporcionou a ligação do DNA à membrana de sílica da coluna, enquanto que os contaminantes foram eliminados. Após algumas lavagens do DNA unido à membrana de sílica, o material foi eluído em tampão AE e armazenado a -20°C.

4.4 Detecção do gene *gyrA* específico de *M. leprae* por PCR convencional

A PCR convencional das amostras ambientais foi realizada no período de março de 2012 a março de 2013 objetivo da Monografia intitulada “Detecção de ácidos nucleicos de *Mycobacterium leprae* em amostras de águas ambientais em municípios do Ceará”.

A reação ocorreu utilizando-se o kit Taq PCR Master Mix (QIAGEN®) com os iniciadores para amplificar o fragmento genômico referente à topoisomerase II subunidade A específica de *M. leprae*, sendo *gyrA*-Forward 5` - CCC GGA CCG TAG CCA CGC TAA GTC – 3` e *gyrA*-Reverse 5` – TAA TGA CCC ACC GGC AGC GAT G – 3`. O mix reacional foi composto da seguinte maneira: 3 µL do DNA genômico extraído das amostras de águas ambientais; 7µL de H₂O RNase-free; 1,25 µL de cada iniciador *gyrAF* e *gyrAR*; e 12,5 µL de Taq PCR Master Mix. O controle negativo recebeu 3 µL de H₂O RNase-free enquanto que o controle positivo utilizado foi DNA proveniente da extração de biópsias de pacientes MB.

A seguir as amostras foram amplificadas no termociclador Mastercycler personal 5332 (Eppendorf ®) e a reação se processou no seguinte esquema: aquecimento inicial a 94°C por 5 minutos, para que ocorresse a separação das fitas de DNA; seguido de 6 ciclos iniciais de: 94°C por 45 segundos para a desnaturação; 65°C por 45 segundos para o anelamento e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Posteriormente, seguiram-se 35 ciclos compostos por: 94°C por 45 segundos; 62°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após os 41 ciclos, houve um período de extensão final que ocorreu a 72°C por 10 minutos.

Depois, as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador e armazenadas a -20°C. O produto gerado por esta reação foi de 187 pb.

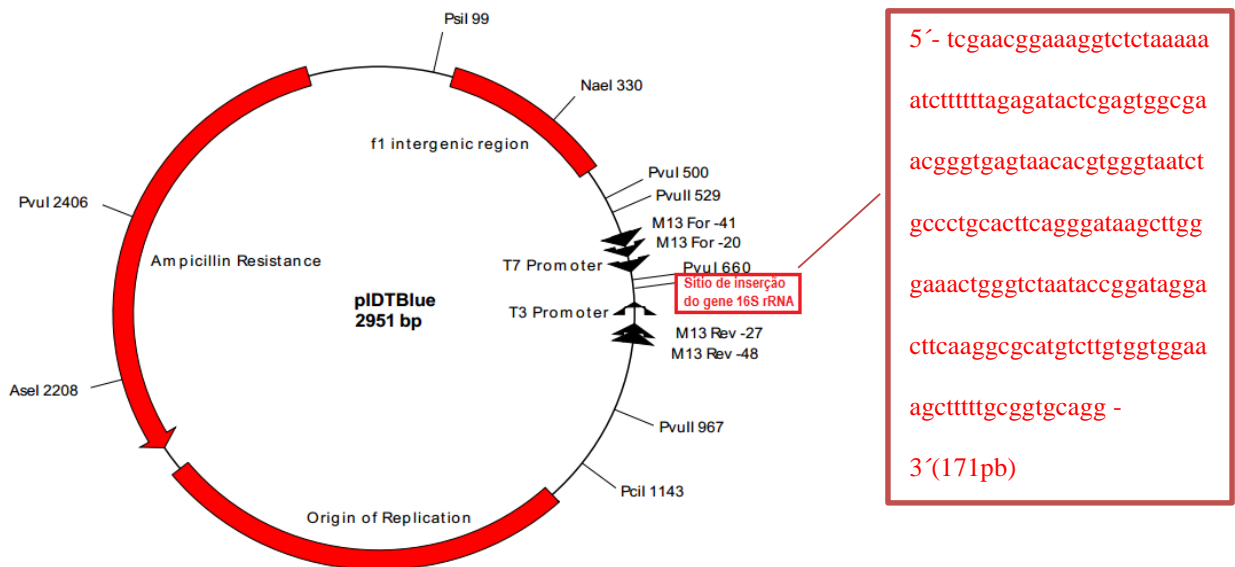
4.5 Confeção do plasmídeo pIDTBlue e obtenção da curva padrão

O plasmídeo pIDTBlue contendo o inserto de 171 pb da região 16S rRNA de *M. leprae* foi confeccionado pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT®) (Figura 5). Os iniciadores utilizados para construção da região de interesse foram baseados naqueles utilizados por Lavania e colaboradores em 2008, sendo Mlep16sfor: 5' - TCG AAC GGA AAG GTC TCT AAA AAA TC - 3' e Mlep16srev: 5' - CCT GCA CCG CAA AAA GCT TTC C - 3' (LAVANIA *et al.*, 2008).

A curva padrão foi construída a partir de diluições seriais do plasmídeo pIDTBlue16SrRNAMleprae (0,1 ng, 0,01 ng, 1pg, 0,1 pg, 0,01 pg e 1 fg). A finalidade da obtenção da curva padrão foi determinar a quantificação absoluta das amostras ambientais por meio extrapolação dos valores resultantes das diluições de concentração conhecida do pIDTBlue16SrRNAMleprae.

Os valores obtidos de eficiência da amplificação do DNA, inclinação da reta da curva padrão (slope), coeficiente de correlação de Pearson (r) ou coeficiente de determinação (R²) foram empregados para determinar a otimização do ensaio de qPCR.

Figura 5 – Imagem gráfica do plasmídeo pIDTBlue confeccionado pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT®)



Fonte: Imagem modificada do endereço eletrônico <http://eu.idtdna.com/pages/docs/synthetic-biology/pidtblue-gene-map-final.pdf>. Esse mapa genético do plasmídeo pIDT Blue mostra a região que contém o gene de resistência a Ampicilina (AMpR) e em destaque no retângulo vermelho o sítio de inserção para clonagem do gene de interesse 16S rRNA.

4.6 PCR em tempo real das amostras ambientais

As reações de qPCR foram realizadas com o auxílio do aparelho ESCO Spectrum 96 Real Time Thermal Cycler (ESCO®) com a utilização dos iniciadores que amplificam uma região do fragmento genômico referente ao RNA ribossômico específico de *M. leprae*.

Os iniciadores utilizados na qPCR foram gerados pelo programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), sendo a região escolhida a partir do gene *16S rRNA* de *M. leprae* tomando por base o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Os iniciadores (Quadro 1) foram fabricados pela empresa Invitrogen®.

Quadro 1 - Iniciadores para amplificação de 158pb do gene *16S rRNA*.

Iniciadores	Sequência (5' – 3')
16S3-Forward	5' - TCG AAC GGA AAG GTC TCT AAA – 3'
16S3-Reverse	5' – CTT TCC ACC ACA AGA CAT GC – 3'

Fonte: Elaborado pela autora

A quantificação absoluta por qPCR foi realizada com o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), no qual cada reação individual foi composta por 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de 16S3-Forward, 1 µL de 16S3-Reverse, 5,5 µL de água ultra-pura e 5 µL de DNA template das amostras ambientais, perfazendo um volume total de 25 µL.

A reação se processou no seguinte esquema: aquecimento inicial a 95°C por 10 minutos; seguido de 45 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão 72°C por 30 segundos. Posteriormente, houve um período de extensão final que ocorreu a 72°C por 10 minutos.

Os dados foram analisados pelo Swift Spectrum Real Time 96 Software (ESCO®) a fim de avaliar o ciclo limiar (C_T).

4.6.1 Determinação da sensibilidade analítica e da especificidade da qPCR para a detecção de *M. leprae*

Para determinar a sensibilidade analítica do ensaio de qPCR efetuou-se a diluição seriada do plasmídeo pIDTBlue16SrRNAMlep. O ponto da diluição que não contribuiu de

forma adequada para a obtenção de uma curva padrão de alta eficiência foi considerado o Limite de Detecção (LD) ou sensibilidade analítica do ensaio. Assim sendo, o LD foi fixado na concentração em que a amplificação foi alcançada antes dos 37 ciclos em 95% das vezes. Ao final, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% para se confirmar o tamanho dos produtos de PCR.

Pela natureza do reagente escolhido para detecção do produto de PCR através de PCR em tempo real, sabe-se que o corante SYBR Green tem finalidade por qualquer DNA de cadeia dupla, ou seja, esse método pode gerar sinais falsos positivos, por meio da ligação com produtos de PCR não específicos. Desse modo, foi realizado a análise da curva de dissociação após o período de extensão final de cada placa de qPCR.

Na curva de dissociação, a temperatura da reação aumentou 0,5°C a cada 20 segundos, começando a 55°C e terminando a 95°C. No final, gerou-se um gráfico com as alterações de fluorescências, permitindo verificar a existência de um ou mais picos de emissão fluorescente.

Além da curva de dissociação da qPCR, foi conduzido um teste de especificidade no qual foram empregadas diferentes espécies bacterianas. As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* tiveram o DNA extraído conforme descrito no Anexo B e, juntamente com o DNA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, foram testadas por qPCR com os iniciadores 16S3.

Após a extração de DNA das cepas para o teste de especificidade, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®). Posteriormente, os produtos gerados nessa qPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a ausência de amplificação e detecção desses patógenos. As imagens foram visualizadas e digitalizadas no transluminador ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®).

4.7 Técnicas de Genotipagem de *M. leprae*

Para a genotipagem das amostras positivas para o DNA de *M. leprae* referente a região genômica *I6S rRNA* do município de Juazeiro do Norte e das amostras clínicas foram utilizados dois pares de iniciadores (Quadro 2) para a identificação dos nucleotídeos na posição de 14676 e de 2935685 do genoma de *M. leprae* de acordo com a publicação de Monot e colaboradores (MONOT *et al.*, 2009). Para a amplificação dessas regiões genômicas utilizou-se o kit Taq PCR Master Mix (QIAGEN®).

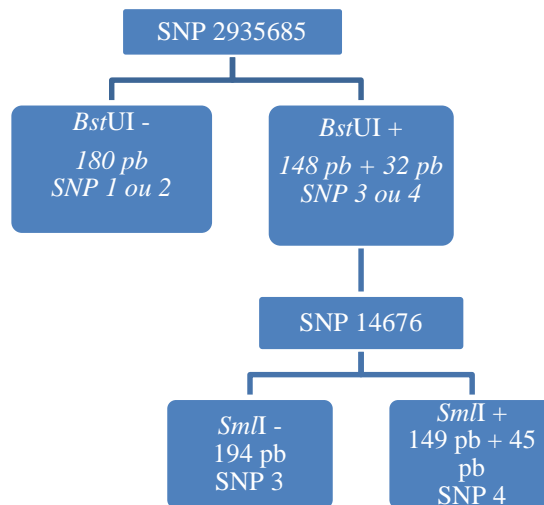
Quadro 2 - Iniciadores para detecção do genótipo de *M. leprae*.

Iniciadores	Sequência dos iniciadores
SNP 14676	Forward: 5' AAT GGA ATG CTG GTG AGA GC 3'
	Reverse 5' CAA TGC ATG CTA GCC TTA ATG A 3'
SNP 2935685	Forward: 5' ATC TGG TCC GGG TAG GAA TC 3'
	Reverse: 5' ACC GGT GAG CGC ACT AAG

Fonte: Elaborado pela autora

A ciclagem ocorreu da seguinte forma: desnaturação de 94°C por 3 minutos, prosseguida de 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minutos e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final de 72°C por 10 minutos (FONTES *et al.*, 2009).

Após a amplificação do fragmento genômico 2935685, as amostras foram submetidas à digestão enzimática com 10U/μl da enzima de restrição *BstUI* (New England BioLabs ®) à 60°C por 1 hora. Após a amplificação da região 14676, as amostras foram submetidas à digestão enzimática com 10U/μl da enzima de restrição *SmlI* (New England BioLabs ®) a 55°C por 1 hora. A Figura 6 mostra um desenho esquemático desse processamento descrito acima.

Figura 6 - PCR- RFLP para detecção do genótipo de *M. leprae*

Fonte: Elaborado pela autora

O produto das digestões enzimáticas foi analisado por eletroforese em gel de agarose PRA (Invitrogen®) 3% (w/v), usando transiluminador de luz ultra-violeta a 302 nm e as imagens digitalizadas no transluminador ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®). A eletroforese aconteceu a uma voltagem constante de 50 V/cm linear por aproximadamente 90 minutos em fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS – (GE Healthcare®)).

4.8 Subtipagem do SNP tipo 4

As amostras que forem classificadas como genótipo 4 foram submetidas a uma subgenotipagem para definir se possuem genótipo: 4-N, 4-O ou 4-P com os iniciadores descritos no Quadro 3.

Quadro 3 - Iniciadores para detecção do subgenótipo 4 de *M. leprae*.

Iniciadores	Sequência dos iniciadores
Ins-978589-F	5'- GCAGTTGCAGCACGATGG -3'
Ins-9789589-R	5'- CGGTGGAATTACCTAACGA -3'
Del-1476519-F	5'- TCGTGTTTCGGATCTCATCA -3'
Del-1476519-R	5'- AAATCCAGCACGACCAAGTC -3'

Fonte: Elaborado pela autora

A primeira reação foi realizada com kit Taq PCR Master Mix (QIAGEN®), utilizando 1,5 µl dos iniciadores Ins-978589 F e Ins-9789589-R. As condições de ciclagem foram: 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 68,6 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min. A segunda reação também foi realizada com o kit Taq PCR Master Mix (QIAGEN®), fazendo uso de 1,5 µl dos iniciadores Del-1476519-F e Del-1476519-R. As condições de ciclagem foram: 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 67,2 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min (MONOT *et al.*, 2009).

O produto de 276 pb, proveniente da primeira reação, e o produto de 242 pb, resultado da segunda reação, foram visualizados em gel de agarose (Invitrogen®) 1% (w/v), usando transiluminador de luz ultra-violeta a 302 nm e as imagens digitalizadas no transluminador ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®).

4.9 Sequenciamento do produto amplificado na PCR convencional para a região *gyrA* de *M. leprae*

O sequenciamento das amostras DNA positivas para a região *gyrA* obtidas pela PCR convencional foi realizado dentro do estudo “Detecção de ácidos nucleicos de *Mycobacterium leprae* em amostras de águas ambientais em municípios do Ceará”. As amostras de água foram submetidas ao sequenciamento no Instituto Evandro Chagas em Belém, Pará pelo equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), com a utilização dos kits BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) e BigDye XTerminator Purification

(Applied Biosystems®), com posterior realização de BLAST no site da NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando como referência o DNA de *M. leprae* (Br4923 GenBank FM211192.1).

4.10 Análise Estatística

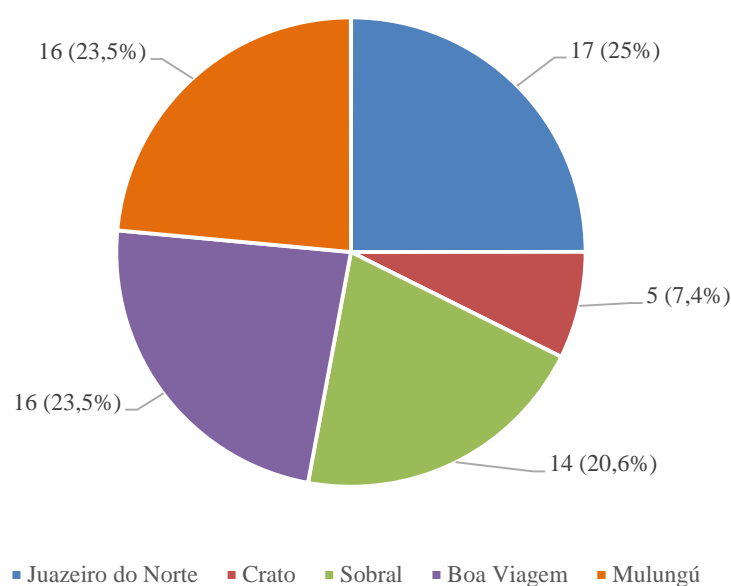
Os dados foram tabulados no Microsoft Office Excel 2007 para realização da análise descritiva dos dados e os testes de estatísticos de Kolmogorov-Smirnov, Qui-quadrado, one-way ANOVA e two-way ANOVA executadas no programa GraphPad Prism versão 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 PCR convencional da região *gyrA* específica de *M. leprae*

Do total de 149 amostras testadas na PCR convencional, 68 amostras (45,6%) foram positivas para o gene *gyrA*. Dessas, 17 amostras pertenciam ao município de Juazeiro do Norte, 5 ao município de Crato, 14 ao município de Sobral, 16 ao município de Boa Viagem e 16 ao município de Mulungu conforme ilustrado na figura 7.

Figura 7 – Frequência de positividade da amplificação do DNA referente à região *gyrA* de *M. leprae* nos 149 reservatórios de águas ambientais dos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral, Boa Viagem e Mulungu.



Fonte: Elaborado pela autora

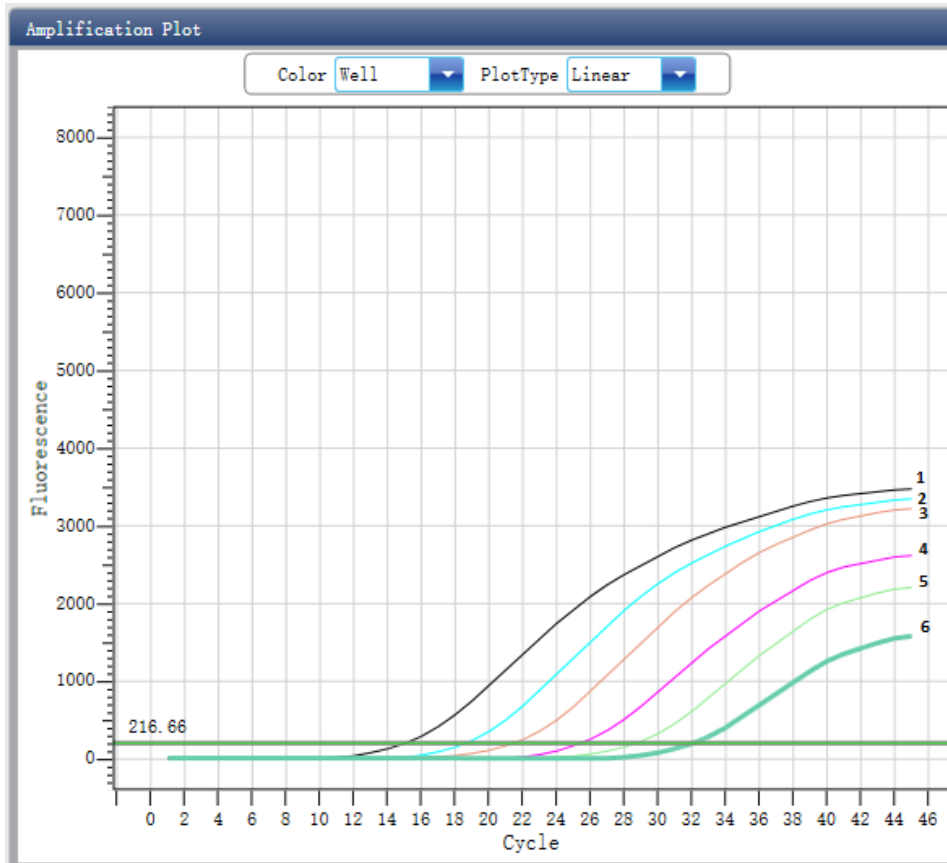
As figuras 25 e 26 presentes no ANEXO F apresentam o resultado do sequenciamento das amostras J1a e S1a e do alinhamento com a referência de *M. leprae* (Br4923 GenBank FM211192.1). Das cinco amostras enviadas para análise, houve confirmação da amplificação da região *gyrA* de *M. leprae* nas amostras de água analisadas.

5.2 Sensibilidade analítica e especificidade da qPCR

A sensibilidade analítica ou limite de detecção para o ensaio de qPCR foi definido como a menor quantidade de DNA de *M. leprae* detectado utilizando os iniciadores 16S3-Foward e 16S3-Reverse. A diluição de 10 fg do plasmídeo pIDT16SrRNAMleprae foi detectada com um valor de C_T menor que 37 ciclos em todas as corridas de curva padrão realizadas, contribuindo de maneira adequada para a obtenção de curva de alta eficiência (Figuras 8 e 9). Como o

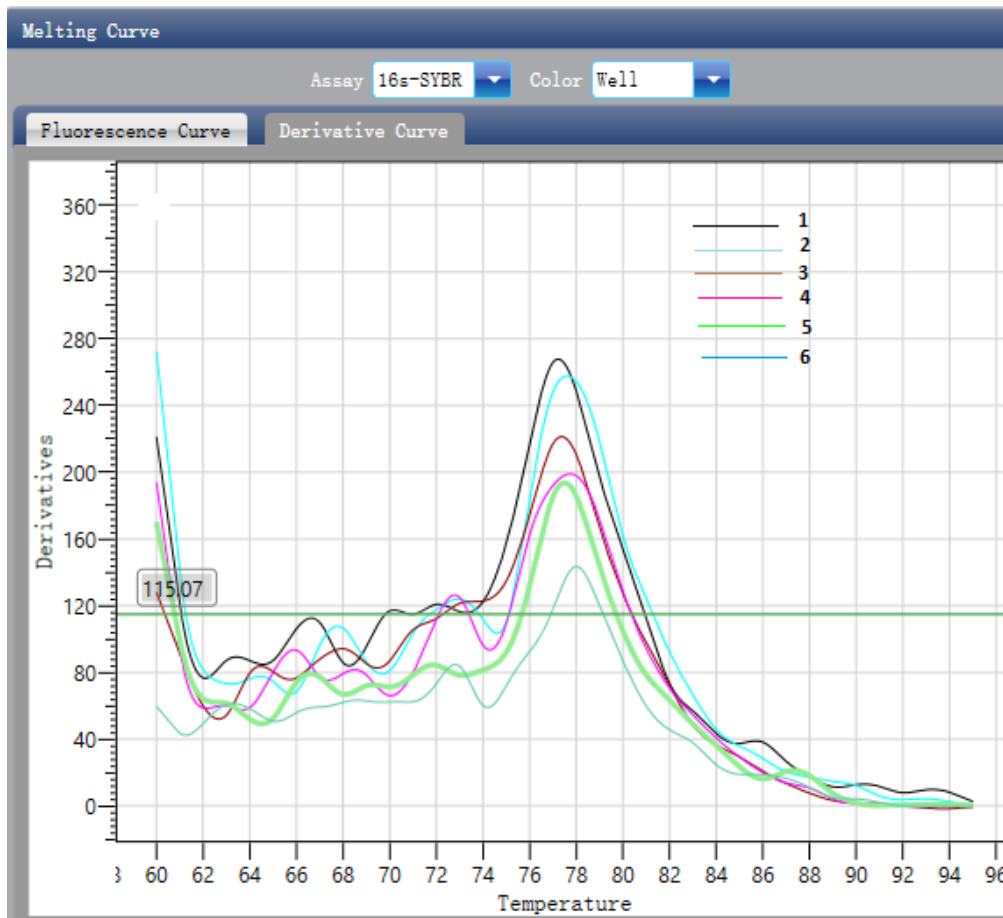
genoma de *M. leprae* é equivalente a 3 fg, essa reação de qPCR é capaz de detectar amostras com até 30 bacilos.

Figura 8 – Curva de amplificação da diluição seriada do plasmídeo pIDT16SrRNAMleprae para detecção da sensibilidade analítica da qPCR.



Fonte: Software Swift Spectrum Real Time 96 Software (ESCO®). A sensibilidade analítica da qPCR para detecção de DNA foi avaliada com concentrações diferentes do plasmídeo pIDT16SrRNAMleprae variando de 0,1ng a 1fg. O sinal de fluorescência foi detectado durante o progresso da reação, ou seja, em tempo real. Linha: 1 – 0,1 ng; 2 – 10 pg; 3 – 1 pg; 4 – 100 fg; 5 – 10 fg; 6 – 1 fg.

Figura 9 – Curva de dissociação da qPCR do ensaio de sensibilidade analítica dos iniciadores 16S3 rRNA

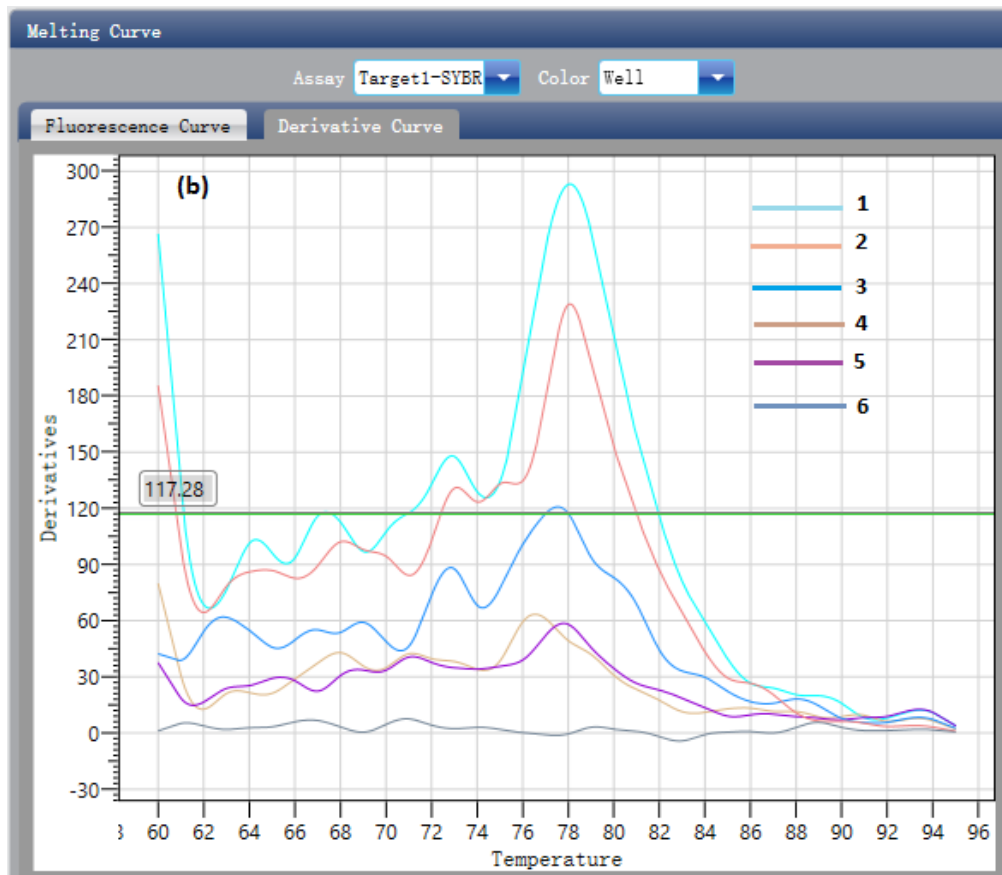


Fonte: Software Swift Spectrum Real Time 96 Software (ESCO®). Análise da curva de dissociação do limite de detecção dos produtos da qPCR, mostrando os produtos obtidos a partir da diluição seriada do plasmídeo pIDT16SrRNAleprae variando de 0,1 ng a 1 fg. Linha: 1 – 0,1 ng; 2 – 10 pg; 3 – 1 pg; 4 – 100 fg; 5 – 10 fg; 6 – 1 fg.

Todas as cepas utilizadas no teste de especificidade obtiveram razão de absorvância 260nm/280nm maior que 1,6, indicando que o DNA extraído não apresentou contaminação por proteínas. As concentrações obtidas foram: *Staphylococcus aureus* – 103,4 ng/μL, *Streptococcus pneumoniae* - 25,6 ng/μL e *Escherichia coli* – 30,8 ng/μL.

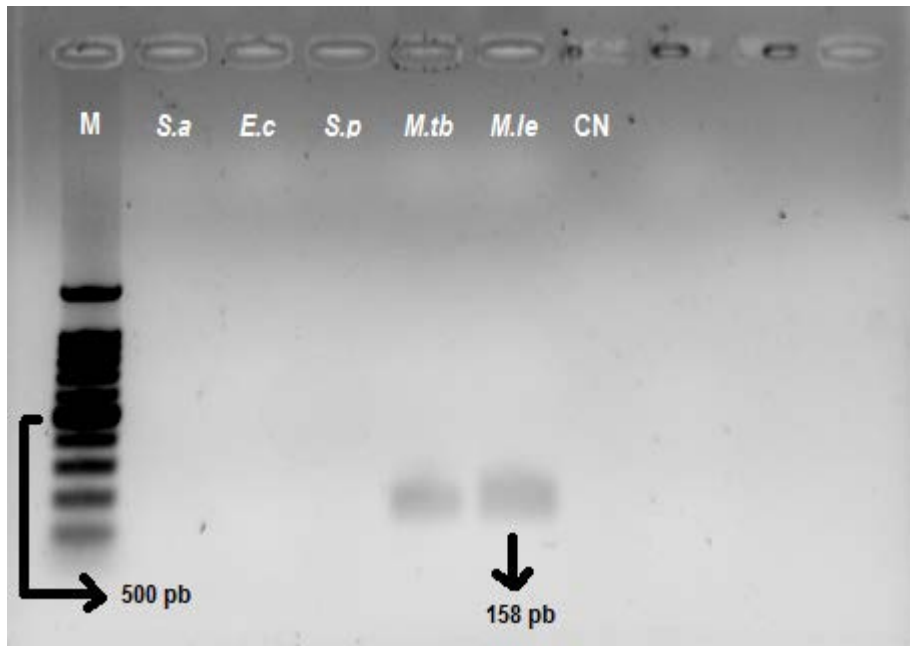
Sobre a especificidade da reação de qPCR e dos primers utilizados, foi observado somente a amplificação do DNA da espécie *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mas em uma temperatura de fusão diferente (T_m de 77,5°C) do que no obtido com *Mycobacterium leprae* proveniente de biópsia de paciente (T_m de 78,1°C). Não ocorreu amplificação das espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*, como demonstrado nas figuras 10 e 11.

Figura 10 – Curva de dissociação da qPCR do ensaio de especificidade dos iniciadores 16S3 rRNA



Fonte: Software Swift Spectrum Real Time 96 Software (ESCO®). Análise da curva de dissociação utilizando o DNA de cinco espécies bacterianas diferentes. Linha: 1 - pIDT16SrRNAMleprae na concentração de 0,1 ng (T_m de 78,1 °C); 2 - *Mycobacterium leprae* (T_m de 78,1 °C); 3 - *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (T_m de 77,5 °C); 4 - *Staphylococcus aureus*; 5 - *Escherichia coli*; 6 - *Streptococcus pneumoniae*.

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto de amplificação do ensaio de especificidade dos iniciadores 16S3 rRNA



Fonte: Elaborado pela autora. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação do teste de especificidade (158 pb). O poço “M” contém 6,0 µL do marcador de peso molecular de 100 pb, onde a banda mais forte tem peso de 500 pb. O poço “S.a” representa a amostra de *Staphylococcus aureus*, o poço “E.c” contém amostra de *Escherichia coli*, o poço “S.p” representa a amostra de *Streptococcus pneumoniae*, o poço “M.tb” contém amostra de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e o poço “M.le” representa a amostra de *Mycobacterium leprae*. O poço CN indica o controle negativo da reação.

A sequência de nucleotídeos da região de 158 pb amplificada pelos iniciadores 16S3 rRNA foi submetida ao BLAST com sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados do NCBI, sendo observada 100% de identidade com *Mycobacterium leprae* BR4923 e 93% de identificação com a sequência de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (figura 12).

Figura 12 – BLAST da região genômica de 158 pb do gene *16S rRNA* de *M. leprae*

Mycobacterium leprae TN chromosome, complete genome (a)
 Sequence ID: ref|NC_002677.1| Length: 3268203 Number of Matches: 1
 Range 1: 1341207 to 1341364

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
292 bits(158)	5e-77()	<u>158/158(100%)</u>	0/158(0%)	Plus/Plus	

Features:
rRNA-16S ribosomal RNA

```

Query 1      TCGAACGGAAAGGTCTCTAAATAAATCTTTTTAGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAG 60
Sbjct 1341207 TCGAACGGAAAGGTCTCTAAATAAATCTTTTTAGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAG 1341266

Query 61     TAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACCTTCAGGGATAAGCTTGGGAAACTGGGTCTAATAC 120
Sbjct 1341267 TAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACCTTCAGGGATAAGCTTGGGAAACTGGGTCTAATAC 1341326

Query 121    CGGATAGGACTTCAAGGCGCATGTCTTGTGGTGGAAAG 158
Sbjct 1341327 CGGATAGGACTTCAAGGCGCATGTCTTGTGGTGGAAAG 1341364
  
```

Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome (b)
 Sequence ID: ref|NC_000962.3| Length: 4411532 Number of Matches: 1
 Range 1: 1471931 to 1472054

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
180 bits(97)	4e-43()	<u>116/125(93%)</u>	1/125(0%)	Plus/Plus	

Features:
rRNA-Ribosomal RNA 16S

```

Query 34     GAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACCTTCAGGG 93
Sbjct 1471931 GAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACCTTC-GGG 1471989

Query 94     ATAAGCTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACTTCAAGGCGCATGTCTTGTGGTG 153
Sbjct 1471990 ATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTG 1472049

Query 154    GAAAG 158
Sbjct 1472050 GAAAG 1472054
  
```

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Sequência produzida a partir do alinhamento da região genômica de 158 pb produzida pelos primers 16S3 rRNA do gene *16S rRNA* de *M. leprae*. (a) Em relação ao genoma de *Mycobacterium leprae* BR4923. Em amarelo as regiões de alinhamento dos iniciadores 16S3 rRNA.

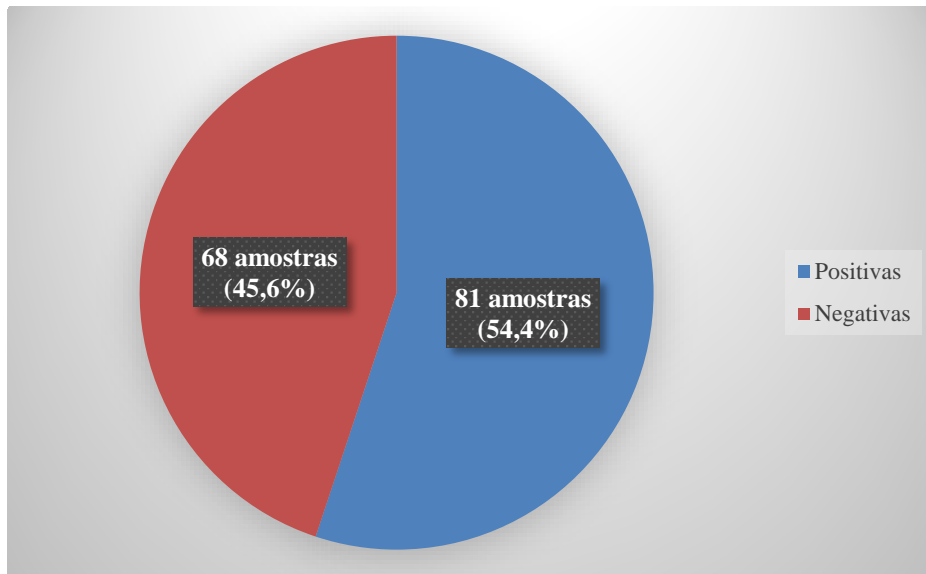
(b) Em relação ao genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Em vermelho o percentual de identificação da sequência a ser amplificada em cada espécie do BLAST.

5.3 Pesquisa do DNA de *Mycobacterium leprae* nas amostras ambientais por PCR em tempo real

As amostras que obtiveram amplificação do DNA do gene *16S rRNA* de *Mycobacterium leprae* capaz de ultrapassar a linha do limiar de detecção (*threshold*) e que possuíam uma temperatura de dissociação entre 77,6°C e 78,6°C na análise da curva de dissociação foram consideradas positivas para DNA de *M. leprae*. Se o sinal de fluorescência não apresentou aumento significativo durante os 45 ciclos da reação ou se a temperatura de dissociação do produto de PCR não ficou dentro da faixa definida, a amostra foi definida como negativa. O controle negativo não apresentou amplificação em nenhuma das reações realizadas.

Do total de 149 amostras analisadas nos 5 municípios pesquisados, 81 (54,4%) foram positivas para a detecção do DNA de *M. leprae* e 68 (45,6%) foram negativas (Figura 13).

Figura 13 – Frequência de amplificação do DNA referente ao gene *16S rRNA* de *M. leprae* nos 149 reservatórios de águas ambientais dos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral, Boa Viagem e Mulungu.

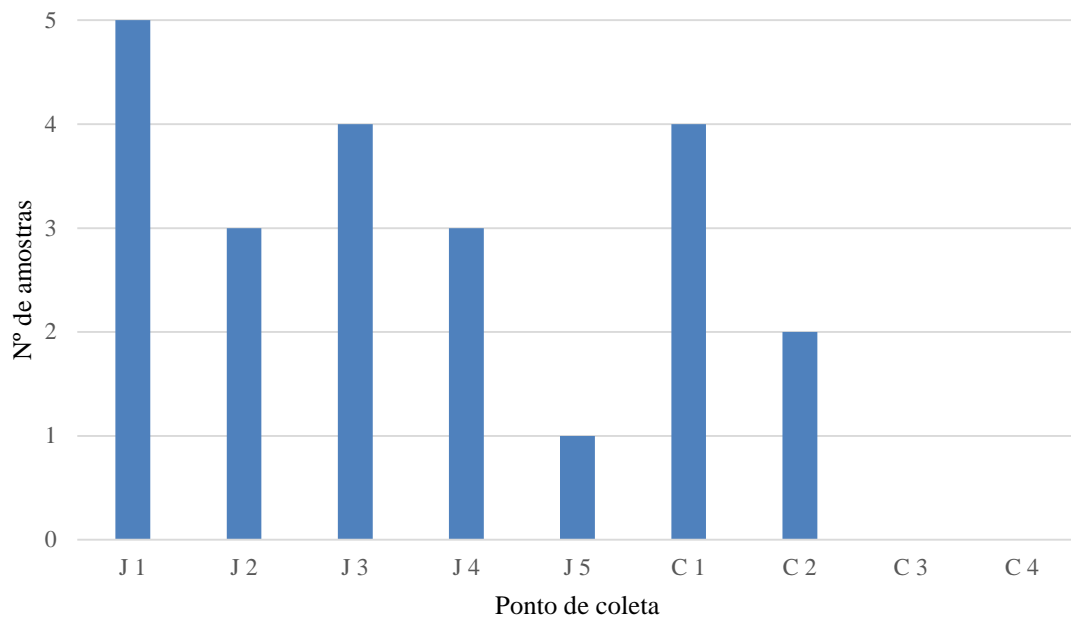


Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação aos pontos de coleta de cada cidade, Juazeiro do Norte, com cinco pontos, e Mulungu, com seis pontos, apresentaram as maiores positivities (100%), pois todos os sítios pesquisados exibiram pelo menos uma amostra positiva. O município de Sobral obteve sete pontos positivos dos oito analisados (87,5%) enquanto que dos sete pontos de coleta de Boa Viagem, seis foram positivos (85,7%). Além disso, Crato mostrou positividade em dois dos quatro sítios de coleta (50%).

No município de Juazeiro do Norte, foi detectado DNA de *M. leprae* da região *16S rRNA* em 16 amostras (64%) das 25 coletadas nos pontos J1, J2, J3, J4 e J5, enquanto que a pesquisa na cidade de Crato apresentou 6 amostras (30%) positivas para DNA dentre as 20 réplicas coletadas, nos pontos de coleta C1 e C2. A figura 14 representa a distribuição das amostras positivas nos diferentes sítios de pesquisa desses dois municípios.

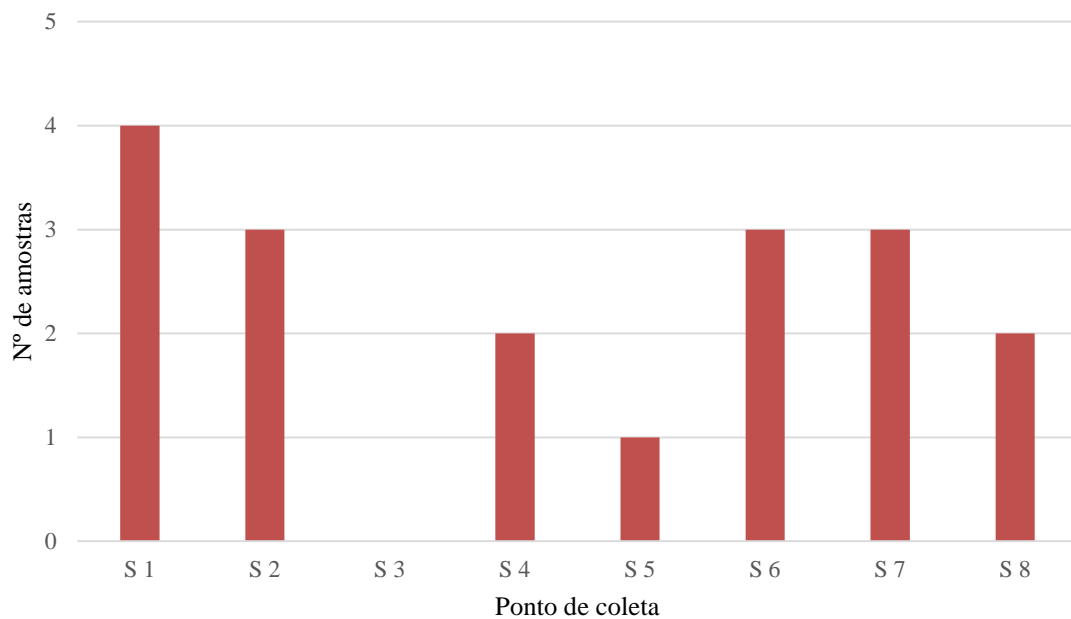
Figura 14 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene *16S rRNA* de *M. leprae* por qPCR nos 9 reservatórios de águas ambientais dos municípios de Juazeiro do Norte (N= 25) e Crato (N= 20).



Fonte: Elaborado pela autora.

O município de Sobral, com maior número de amostras coletadas (40 réplicas), exibiu 18 amostras (45%) positivas para pesquisa do DNA de *M. leprae* nos pontos S1, S2, S4, S5, S6 S7 e S8 (Figura 15).

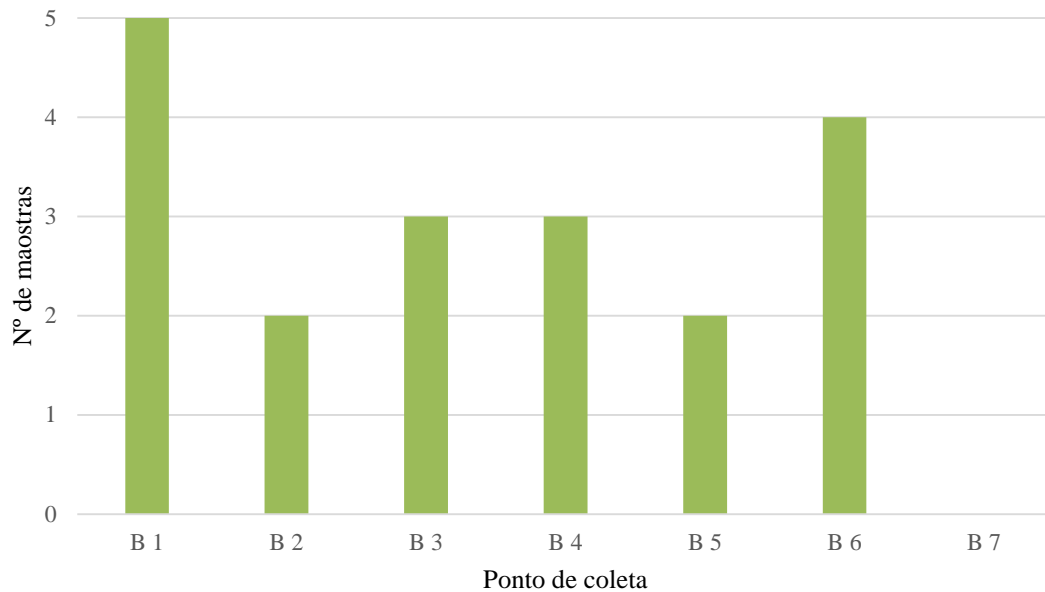
Figura 15 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene *16S rRNA* de *M. leprae* por qPCR nos 8 reservatórios de águas ambientais do município de Sobral (N=40).



Fonte: Elaborado pela autora.

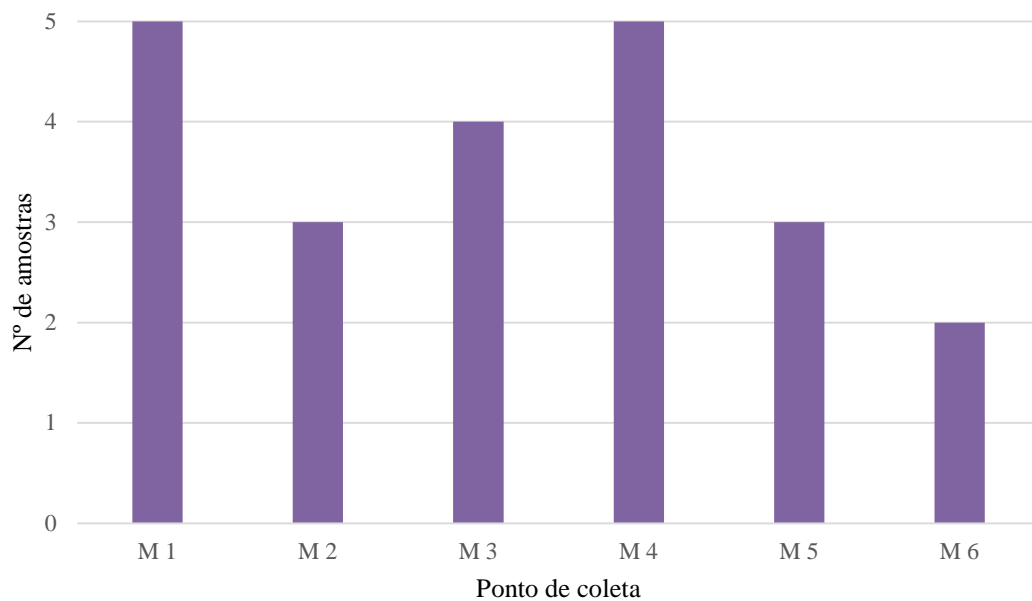
A cidade de Boa Viagem demonstrou 19 amostras (55,9%) positivas dentre as 34 analisadas sem amostras positivas somente no ponto B7 enquanto que Mulungu apresentou 22 réplicas (73,3%) positivas do total de 30 amostras pesquisadas em todos pontos de coleta - M1 a M6 (figuras 16 e 17).

Figura 16 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene *16S rRNA* de *M. leprae* por qPCR nos 7 reservatórios de águas ambientais do município de Boa Viagem (N= 34).



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 – Distribuição da positividade de amplificação do DNA referente ao gene *16S rRNA* de *M. leprae* por qPCR nos 6 reservatórios de águas ambientais do município de Mulungu (N= 30).



Fonte: Elaborado pela autora.

Pela imagem espacial obtida pelo Google Maps® demonstrado nas figuras 21, 22, 23 e 24 no ANEXO E, pode-se perceber que os pontos negativos C3 e C4 estão distantes da região urbana dos municípios de Juazeiro do Norte e Crato. Ao contrário, o ponto negativo S3 do município de Sobral encontra-se dentro do perímetro urbano endêmico de hanseníase e, além disso, nota-se a localização do ponto negativo B7 na cidade de Boa Viagem e a ausência de pontos negativos do município de Mulungu, uma região serrana não considerada endêmica para a hanseníase.

A tabela 1 mostra a análise estatística dos resultados obtidos de todos os municípios pelas técnicas de PCR convencional e qPCR com a utilização do teste de Qui-quadrado, demonstrando a inexistência de uma diferença significativa de resultados entre as duas técnicas de biologia molecular utilizadas, com um $p = 0,1320$. A análise estatística da tabela de contingência por cada município estudado também não revelou nenhuma significância ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Tabela de contingência da análise dos resultados de todos os municípios estudados pelas técnicas de PCR convencional e qPCR.

	PCR Convencional (<i>gyrA</i>) N(%)	qPCR (<i>16S rRNA</i>) N(%)	Total N(%)	
Número de amostras positivas	68 (45,6%)	81 (54,4%)	149 (100%)	
Número de amostras negativas	81 (54,4%)	68 (45,6%)	149 (100%)	$p=0,1320$
Total	149 (100%)	149 (100%)	298	

Fonte: Elaborado no programa GraphPad Prism versão 6.0 utilizando o teste de Qui-quadrado.

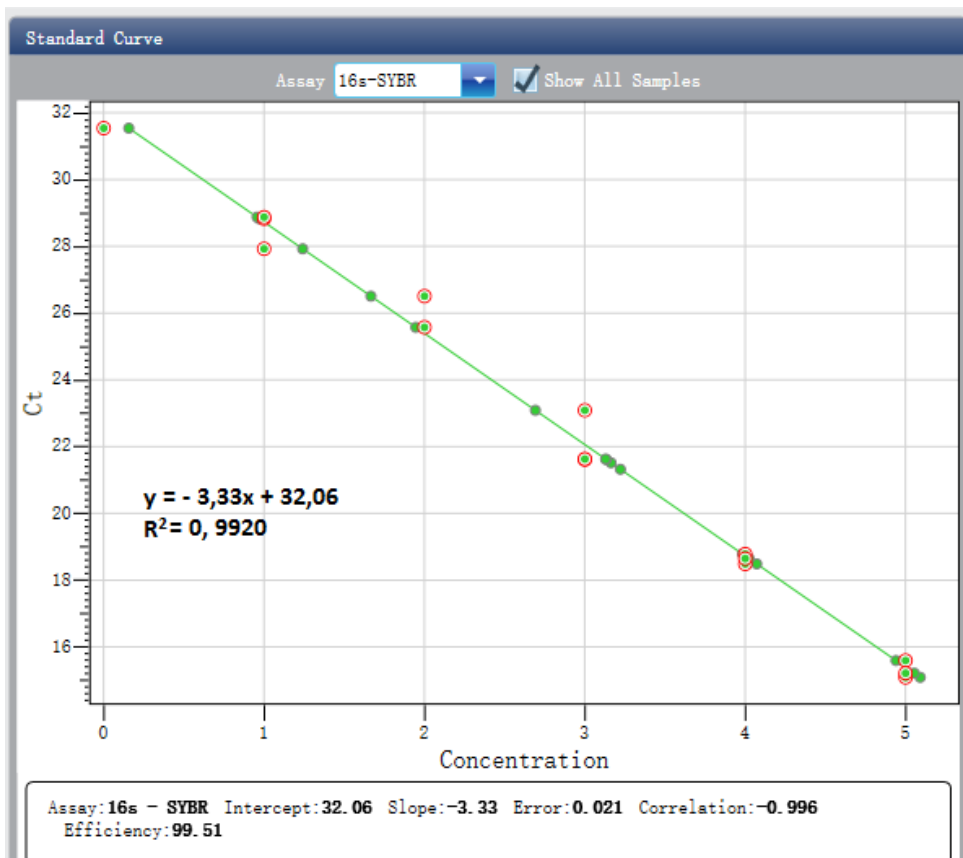
5.4 Quantificação do número de cópias de *Mycobacterium leprae* por PCR em tempo real

A amplificação do DNA de *M. leprae* a partir das amostras ambientais dos municípios cearenses foi obtida através do método de quantificação absoluta da PCR em tempo real. Dessa forma, a quantidade inicial de ácido nucleico pode ser determinada com base na definição do ciclo limiar (C_T), que é considerado o número de ciclos requerido para o sinal de fluorescência exceder o limiar de detecção.

Com base nos valores de C_T alcançados, foi possível identificar o número de cópias de *M. leprae* presente nas amostras ambientais. Para tanto, foi necessário utilizar a equação da reta

padrão gerada através da regressão linear entre o número do C_T (eixo das ordenadas) e a concentração logarítmica do DNA do plasmídeo pIDT16SrRNAMleprae (eixo das abscissas). A curva padrão utilizada na análise quantitativa foi linear, no qual foi determinado um coeficiente de correlação de Pearson (r) de $-0,996$, um coeficiente de correlação (R^2) de $0,9920$, inclinação da reta ou *slope* de $-3,33$ e uma eficiência de amplificação de $99,51\%$ (Figura 18).

Figura 18 – Regressão linear entre os valores de C_T e as diluições do DNA plasmidial de *M. leprae*.



Fonte: Software Swift Spectrum Real Time 96 Software (ESCO®). Equação da reta obtida pela regressão linear dos valores de C_T e concentração logarítmica gerados pela curva padrão.

Utilizando o software Swift Spectrum Real Time 96 (ESCO®) e o Microsoft Excel 2007 para análise quantitativa, o número de cópias de *M. leprae* presente nas amostras ambientais pesquisadas se manteve no intervalo de $1,44 \times 10^2$ a $1,42 \times 10^{-1}$, com valores de C_T que variaram de 24,87 a 34,89 (Tabela 2).

O município de Juazeiro do Norte apresentou C_T de 28,00 a 30,11 enquanto que Crato demonstrou amostras com C_T de 25,53 a 33,41. A cidade de Sobral teve C_T de 27,03 a 31,20. O município de Boa Viagem expressou C_T de 24,87 a 29,96 no tempo em que Mulungu exibiu C_T de 27,82 a 34,89. A tabela 2 mostra a média dos C_T das amostras ambientais de cada cidade assim como o intervalo do número de cópias obtidos.

A análise dos C_{TS} obtidos de cada município com o teste de one-way ANOVA revelou uma diferença estatística significativa entre as médias dos C_{TS} , com um $p=0,0005$.

Tabela 2 – Média dos C_{TS} , desvio padrão e intervalo do número de cópias de *M. leprae* nas amostras ambientais de cada ponto de coleta dos municípios pesquisados - Continua

Cidade de estudo/ Ponto de coleta	Média do C_T	Intervalo do número de cópias ($C_T \leq 37$)
J1 (J1a – J1e)	28,56	$5,08 \times 10^0 - 1,66 \times 10^1$
J2 (J2a - J2c)	29,82	$4,08 \times 10^0 - 5,18 \times 10^0$
J3 (J3a- J3d)	29,28	$3,85 \times 10^0 - 1,29 \times 10^1$
J4 (J4a, J4c, J4d)	28,56	$1,02 \times 10^1 - 1,25 \times 10^1$
J5 (J5a)	28,37	$1,28 \times 10^1$
Juazeiro do Norte	Média C_T : 28,96 */ σ : 0,71	
C1 (C1b - C1e)	29,96	$3,95 \times 10^{-1} - 7,18 \times 10^1$
C2 (C2a – C2b)	28,54	$1,43 \times 10^0 - 9,11 \times 10^1$
Crato	Média C_T : 29,48 */ σ : 2,91	
S1 (S1a – S1d)	29,43	$2,91 \times 10^0 - 1,74 \times 10^1$
S2 (S2a, S2c, S2e)	29,22	$1,81 \times 10^0 - 1,69 \times 10^1$
S4 (S4a, S4e)	27,9	$9,76 \times 10^0 - 3,23 \times 10^1$
S5 (S5d)	28,17	$1,47 \times 10^1$
S6 (S6a, S6b, S6d)	27,42	$2,36 \times 10^1 - 2,71 \times 10^1$
S7 (S7a - S7c)	29,27	$1,83 \times 10^0 - 2,43 \times 10^1$
S8 (S8b, S8e)	29,77	$3,38 \times 10^0 - 6,96 \times 10^0$
Sobral	Média C_T : 28,83 */ σ : 1,32	
B1 (B1a - B1e)	27,45	$1,18 \times 10^1 - 6,58 \times 10^1$
B2 (B2d - B2e)	27,17	$2,32 \times 10^1 - 3,72 \times 10^1$
B3 (B3a, B3b, B3e)	28,12	$1,06 \times 10^1 - 2,53 \times 10^1$
B4 (B4a, B4b, B4e)	26,59	$1,10 \times 10^1 - 1,44 \times 10^2$
B5 (B5a, B5e)	28,51	$4,27 \times 10^0 - 3,18 \times 10^1$
B6 (B6b - B6e)	27,04	$2,21 \times 10^1 - 4,27 \times 10^1$
Boa Viagem	Média C_T : 27,41 */ σ : 1,12	

Tabela 3 – Média dos C_T s, desvio padrão e intervalo do número de cópias de *M. leprae* nas amostras ambientais de cada ponto de coleta dos municípios pesquisados – Continuação

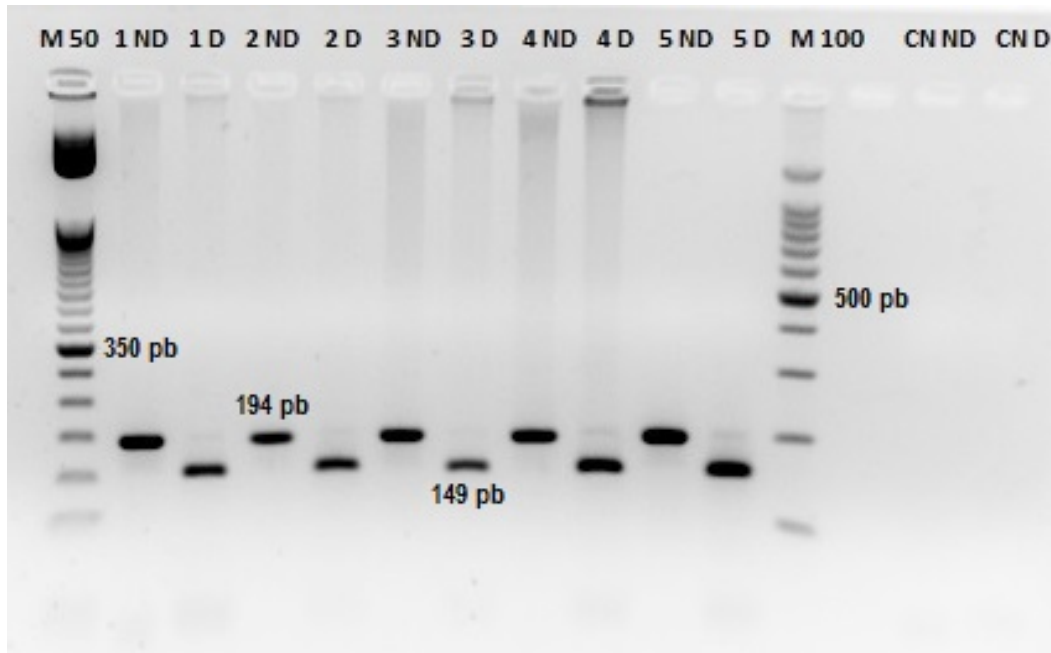
Cidade de estudo/ Ponto de coleta	Média do C_T	Intervalo do número de cópias ($C_T \leq 37$)
M1 (M1a - M1e)	29,63	$1,42 \times 10^{-1} - 1,54 \times 10^1$
M2 (M2b, M2c, M2e)	31,69	$1,90 \times 10^{-1} - 7,85 \times 10^0$
M3 (M3a, M3b, M3d, M3e)	30,17	$9,86 \times 10^{-1} - 1,10 \times 10^1$
M4 (M4a - M4e)	28,71	$5,11 \times 10^0 - 1,88 \times 10^1$
M5 (M5a, M5b, M5e)	28,36	$9,40 \times 10^0 - 1,74 \times 10^1$
M6 (M6a, M6e)	28,93	$7,48 \times 10^0 - 1,02 \times 10^1$
Mulungu	Média C_T : 29,56 */ σ : 1,94 * $p=0,0005$	

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Genotipagem das amostras clínicas e amostras ambientais de Juazeiro do Norte DNA positivas

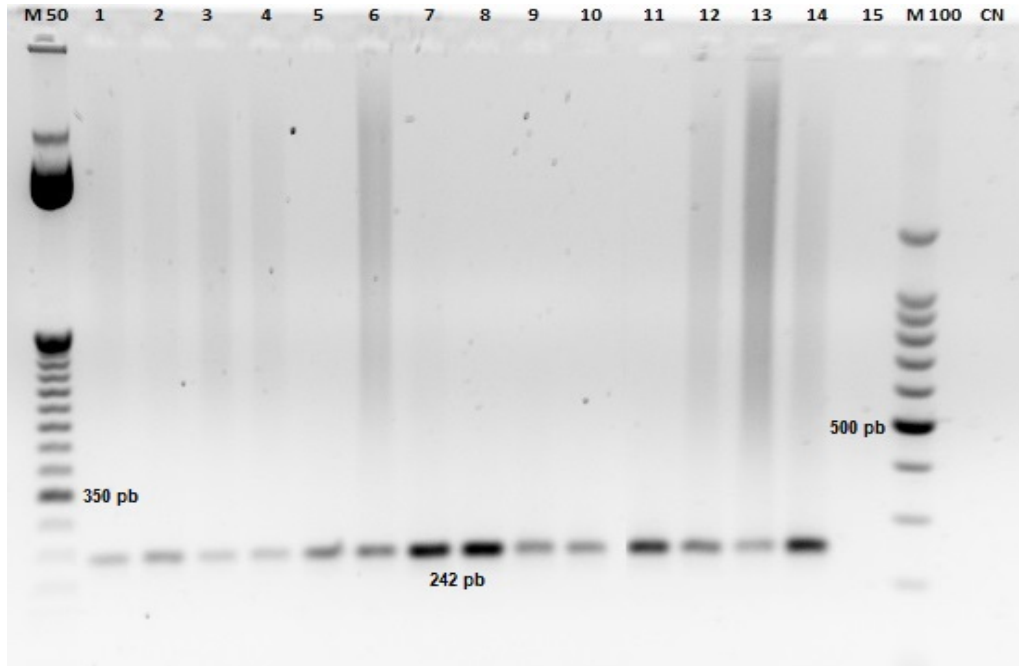
Do total de 25 amostras de biópsias de pacientes analisadas, 6 amostras (24%) foram caracterizadas como SNP 1 ou 2, três amostras (12%) tinham genótipo de SNP 3 e 16 amostras (64%) foram classificadas como SNP 4 (Figura 19). Com relação a subtipagem das amostras definidas como SNP 4, todas as amostras apresentaram perfil de SNP 4-N (Figura 20).

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose 3% da PCR-RFLP envolvendo o produto de amplificação da região 14676 e a digestão enzimática com 10U/ μ L da enzima de restrição *SmlI*.



Fonte: Elaborado pela autora. Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos de amplificação da PCR-RFLP da região 14676 do genoma de *M. leprae*. O poço “M 50” contém 6,0 μ L do marcador de peso molecular de 50 pb, onde a banda mais forte tem peso de 350 pb. O poço “M 100” contém 6,0 μ L do marcador de peso molecular de 100 pb, onde a banda mais forte tem peso de 500 pb. Os poços 1 ND, 2 ND, 3 ND, 4 ND e 5 ND apresentam o produto de PCR Não Digerido (194 pb) enquanto que os poços 1 D, 2D, 3 D, 4D e 5D representam o produto de PCR Digerido pela enzima *SmlI* (149 pb). Os poços CN ND e CN D indicam os Controles Negativos da reação.

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 2% com o produto de amplificação da região de deleção 1476519 referente a subtipagem do SNP 4.



Fonte: Elaborado pela autora. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação da PCR da região Del 1476519 do genoma de *M. leprae*. O poço “M 50” contém 6,0 μ L do marcador de peso molecular de 50 pb, onde a banda mais forte tem peso de 350 pb. O poço “M 100” contém 6,0 μ L do marcador de peso molecular de 100 pb, onde a banda mais forte tem peso de 500 pb. Os poços 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 apresentam o produto de PCR (242 pb). O poço 15 estava vazio. O poço CN indica o Controle Negativo da reação.

As amostras positivas para o gene *16S rRNA* de *M. leprae* do município de Juazeiro do Norte foram 100% determinadas como SNP 4. Dentre elas, a maioria (14/87,5%) foram caracterizadas como SNP 4-N e duas amostras (12,5%) como SNP 4-O (Tabela 3). A análise estatística dos resultados dos genótipos obtidos entre as amostras estudadas com o teste de two-way ANOVA demonstrou significância somente para os genótipos, sem revelar diferença significativa entre os dois tipos de amostras estudadas.

Tabela 4 – Caracterização molecular de *M. leprae* proveniente das amostras clínicas de pacientes atendidos no CDERM e das amostras ambientais DNA positivas do município de Juazeiro do Norte.

Genótipo	Amostras Clínicas **	Amostras ambientais – JN **	
SNP 1 ou 2	6 *	-	
SNP 3	3 *	-	
SNP 4-N	16 *	14 *	** $p=0,2552$
SNP 4-O	-	2 *	
SNP 4-P	-	-	
	* $p=0,0093$		

Fonte: Elaborado no programa GraphPad Prism versão 6.0 utilizando o teste de two-way ANOVA.

6 DISCUSSÃO

Uma das grandes vantagens da qPCR sobre a PCR convencional consiste no aumento da faixa de detecção de moléculas com uma grande acurácia e alta sensibilidade (MARTINEZ *et al.*, 2006). Nesse estudo, apesar de não ter sido obtido diferença significativa ($p > 0,05$) entre as análises de PCR convencional e qPCR realizadas, a qPCR foi capaz de detectar 13 amostras positivas a mais do que a PCR convencional, demonstrando, portanto, a maior sensibilidade dos resultados de detecção de DNA de *M. leprae* obtidos pela reação em tempo real.

É importante comentar que a baixa qualidade do DNA extraído das amostras ambientais, como pode ser observado pela razão de absorbância 260nm/280nm apresentada no ANEXO G (média 3,01; desvio padrão 2,203), pode ter influenciado nos resultados das ampliações. Apesar de ambos iniciadores utilizados (*gyrA* e *16s rRNA*) serem específicos para *M. leprae*, a utilização de iniciadores visando diferentes regiões do DNA de *M. leprae* nos testes de amplificação *in vitro* também pode ter exercido influência na sensibilidade do presente estudo.

Também é necessário esclarecer que a análise isolada da detecção de DNA bacilar de *M. leprae* não indica viabilidade microbiana de *M. leprae* nas amostras de águas ambientais analisadas. Portanto, o DNA de *M. leprae* detectado nas ampliações pode ser originado tanto de células vivas quanto de células mortas, ou ainda como DNA extracelular (MISKIN; FARRIMONDL; HEAD, 1999). Trabalhos anteriores já demonstraram a detecção de DNA bacteriano após as células terem sido lisadas por aquecimento e exposição à luz ultravioleta (SHERIDAN *et al.*, 1998; BIRCH *et al.*, 2001).

Existem muitos trabalhos que utilizam a qPCR como uma ferramenta de detecção com diversas variações em relação a origem da amostra, aos alvos genômicos analisados, ao tamanho dos iniciadores nucleotídicos e aos kits de amplificação utilizados. A qPCR também pode ser empregada para diversos fins, citam-se diagnóstico, monitoramento de tratamento e estudo de transmissão. Dessa forma, há uma grande variação de sensibilidade, especificidade e viabilidade de execução frente ao custo de produtos e equipamentos (MARTINEZ *et al.*, 2014).

Diversos autores têm analisado o uso de diferentes regiões genômicas do bacilo *M. leprae* (*Ag85B*, *RLEP*, *hsp18* e *16s rRNA*) empregando a sonda TaqMan ou o corante SYBR Green como técnica de detecção em amostras de biópsias, obtendo variação de 73,3 a 100% de especificidade para a região *RLEP* (TRUMAN *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2011) e 100% de especificidade para a região *16s rRNA* (RUDEEANEKSIN *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2011). As sensibilidades analíticas relatadas nestes estudos foram de 1 cópia (região *hsp18* com

SYBR Green; LINI; SHANKERNARAYAN; DHARMALIN, 2009) a 100fg (*16s rRNA* com sonda TaqMan (MARTINEZ *et al.*, 2009).

É preciso ressaltar que as diferenças encontradas com relação a sensibilidade analítica e a especificidade dos trabalhos anteriores e desse estudo se devem a utilização de alvos distintos, substância de emissão de fluorescência diferentes e espécime da amostra testada. A escolha dos iniciadores e do alvo da reação de polimerase interfere nos resultados de especificidade e de sensibilidade. Por exemplo, Goulart e colaboradores observaram diferença de sensibilidade e acurácia da reação no uso de iniciadores para a mesma região (*RLEP*), porém com produto de PCR de tamanhos diferentes (GOULART *et al.*, 2007).

Além disso, sabe-se que o fluoróforo TaqMan é bem mais específico que o SYBR Green, pois, além dos iniciadores, o kit de TaqMan também é composto por uma sonda que se hibridiza com sequência específica do DNA alvo, enquanto que o SYBR Green se liga de forma não específica a qualquer DNA dupla fita presente na reação de amplificação (KUBISTA *et al.*, 2006). Durante a fase de anelamento, os iniciadores utilizados no ensaio assim como a sonda de TaqMan presente na reação são capazes de se ligar a região específica da sequência alvo. Dessa forma, na fase de extensão, devido à atividade 5' - exonuclease da polimerase, a sonda hibridizada é clivada, permitindo a liberação de fluorescência por parte do *reporter* que será detectada pelo termociclador. De maneira diferente, o corante SYBR Green possui pouca liberação de fluorescência quando está livre em solução, mas durante a fase de extensão, sua emissão de fluorescência aumenta bastante quando se liga inespecificamente ao DNA dupla fita formado. Portanto, é esperado que as reações de qPCR com uso do kit de TaqMan sejam superiores na especificidade do que as que utilizam o kit de SYBR Green (HEID *et al.*, 1996).

Valores encontrados em vários trabalhos foram feitos utilizando amostra clínicas a fresco de biópsias de pacientes hansênicos como espécime biológico analisado enquanto que esse estudo empregou amostras ambientais. Sabe-se que as amostras provenientes de biópsias contêm grande número de DNA bacilar juntamente com algum material genético restante de células humanas. Diferentemente, as amostras de águas ambientais possuem um número reduzido de DNA alvo no meio de uma grande diversidade de DNA total de várias espécies de seres vivos, como amebas de vida livre e micobactérias ambientais. Além disso, as amostras ambientais são conhecidas por possuírem interferentes e inibidores de PCR, como ácidos húmicos, fúlvicos e tânicos, os quais se ligam a polimerase e captam a fluorescência do corante, reduzindo a especificidade e a sensibilidade analítica das reações de amplificação (HEDMAN; RADSTROM, 2013).

A possibilidade da existência de reservatórios não-humanos para o bacilo da hanseníase, os quais poderiam oferecer uma forma de contaminação indireta e perpetuação da transmissão da doença tem conduzido os trabalhos para análise de água, solo ambientais e tatus.

Um dos estudos pioneiros nesse campo foi o de Matsuoka e colaboradores, que por meio da PCR convencional com iniciadores para a região codificadora da proteína de 65-KDa (proteína do choque térmico), obtiveram 47,7% amostras de DNA positivas provenientes de 44 amostras de águas coletadas em seis vilas altamente endêmicas na Indonésia (MATSUOKA *et al.*, 1999).

Outro trabalho envolvendo amostras de água foi realizado em 2010, no qual foram coletadas amostras de água oriunda tanto de poços utilizados por pacientes hanseníacos (48 amostras) quanto de poços que nunca foram usados por pessoas diagnosticadas com hanseníase (42 amostras) em outra região endêmica da Indonésia. Foram encontradas 24% de amostras DNA positivas para o gene *RLEP* de *M. leprae* por meio de PCR convencional, e curiosamente, não ocorrendo diferença estatística entre a positividade obtidas nos distintos poços coletados (WAHYUNI *et al.*, 2010).

O nosso trabalho apresentou uma positividade um pouco maior (54,4%) do que os estudos da Indonésia, podendo ser atribuído ao maior número de amostras (149 amostras), ao uso da técnica de qPCR, a qual é conhecidamente mais sensível que a PCR convencional e ao emprego de iniciadores com diferentes alvos genéticos.

O estudo preliminar realizado em 2006 pelo nosso grupo de pesquisa envolvendo o mesmo grupo de cidades analisadas, demonstrou 48,4% de amostras positivas para pesquisa de DNA de *M. leprae* por PCR convencional e PCR nested com alvo para o gene *RLEP* (DADOS NÃO PUBLICADOS). Vale ressaltar que o número de amostras coletadas foi bastante inferior (31 amostras), mas também houve amplificação em todas as cidades analisadas. Em 2006, as cidades com maiores valores de detecção foram Juazeiro do Norte (60%) e Boa Viagem (71,4%) enquanto que nesse trabalho foram os municípios de Juazeiro do Norte e Mulungu. Além disso, a cidade de Mulungu havia apresentado o menor valor de positividade (28,6%), o que contrasta com o obtido agora por qPCR (73,3%).

Corroborando nossos achados, outro trabalho realizado no Ceará também por nosso grupo, objetivando analisar fontes alternativas que poderiam atuar na transmissão da hanseníase, identificando DNA de *M. leprae* por PCR convencional visando a região *RLEP* em tatus capturados de regiões endêmicas, encontrou positividade em seis animais pesquisados (21%), entre biópsias de orelha, nariz, fígado e baço (FROTA *et al.*, 2012).

Com relação aos estudos realizados para pesquisa de *M. leprae* no solo, a Índia, primeiro lugar mundial em número de casos novos de hanseníase, apresentou detecção em 33,3% das amostras analisadas por PCR convencional e iniciadores para a região *RLEP* em 2006 (LAVANIA *et al.*, 2006). O mesmo grupo de pesquisa, em 2008, analisou a detecção de DNA por PCR convencional e RNA por RT-qPCR para a região *16s rRNA* das amostras de solo, apresentando 37,5% de amostras DNA positivas e 35% de amostras RNA positivas. Os resultados de positividade dos trabalhos de Lavania e colaboradores foram inferiores ao encontrado nesse estudo, porém, o trabalho de 2008 apresentou 55% de amostras com amplificação simultânea dos dois ácidos nucleicos e uma diferença significativa de positividade entre as áreas de pacientes e áreas não-pacientes (LAVANIA *et al.*, 2008).

Turankar e colaboradores em 2012 analisaram 207 amostras de solo e detectaram a presença de DNA em 34,29% das amostras de solo. Entre as amostras DNA positivas, 39,4% foram também positivas para a análise do RNA bacilar, sendo 44% dessas regiões próximas a áreas de banho e lavagem (TURANKAR *et al.*, 2012). Apesar de o número de amostras ter sido maior do que o desse estudo, a positividade de DNA obtida foi 20,07% menor.

O estudo caso-controle realizado por Keer-Pontes e colaboradores em 2006 no Ceará pesquisou a possível influência de variáveis ambientais no aumento do risco de desenvolver a hanseníase e foi detectada significância entre ter tomado banho em águas ambientais 10 anos antes do surgimento da doença. Além disso, outro trabalho observou uma taxa de prevalência maior da hanseníase entre os consumidores das águas bacilo-positivas para lavagem e banho com 11,7% (MATSUOKA *et al.*, 1999). Dos sítios de coletas aqui analisados, a maioria está associada às atividades de lazer e banho da população peridomiciliar.

Matsuoka *et al.* (1999) também reportou que a significância entre o consumo de água bacilo-positivas para cozinhar e beber e a prevalência de hanseníase entre os consumidores não pode ser aplicada. Porém, vale ressaltar que é comum a população ferver ou filtrar a água antes de seu consumo, diminuindo as chances do contato com o bacilo vivo. Assim, apesar das águas ambientais coletadas no presente estudo realizado no Ceará serem em grande parte utilizadas para o consumo direto humano, a chance maior de haver contato com os bacilos detectados nas amostras de água deve ocorrer através do uso das águas para banho, lazer ou lavagem de roupas e não pelo consumo direto das mesmas.

Alguns estudos anteriores avaliaram a influência que fatores como baixo índice de escolaridade, grau de desigualdade social, ausência de hábitos de higiene pessoal e experiência de carência alimentar sobre a incidência da hanseníase, sendo ligados de maneira significativa a doença (KEER-PONTES *et al.*, 2004; KEER-PONTES *et al.*, 2006). Além disso, observou-

se que a distribuição espacial da hanseníase no Ceará é bastante heterogênea, ou seja, as regiões noroeste, central e sudeste do estado são os grupos com alta incidência da doença e, interessantemente, são as regiões mais urbanizadas e desenvolvidas, mas com alto nível de desigualdade social (MONTENEGRO *et al.*, 2004).

Baseado no número de detecção de casos de hanseníase em 2012 nos municípios estudados, seria esperado encontrar uma relação entre a positividade para pesquisa de DNA de *M. leprae* e a endemicidade da cidade analisada. Portanto, as positivities de 64%, 30% e 45% encontradas respectivamente para os municípios de Juazeiro do Norte, Crato e Sobral poderiam ser associadas ao alto número de casos novos detectados anualmente nessas cidades, as quais são consideradas regiões altamente endêmicas para a hanseníase. O grande número de hansênicos seriam responsáveis pela eliminação de bacilos no ambiente em que costumam frequentar para lavar roupas, tomar banho, exercer atividades de lazer e buscar água para seu consumo direto. Essa contaminação da água poderia ser responsável pela transmissão continuada da doença e explicaria a grande positividade dos pontos de coleta desses municípios.

Porém, como as cidades de Boa Viagem e Mulungu, as quais detectam poucos casos ou não possuem registro da doença, seria esperado possuírem uma baixa positividade nesse estudo. Entretanto, com 55,9% e 73,3% de amostras positivas, esses municípios estão entre os três com maior positividade, o que indicaria uma possível precariedade dos sistemas de saúde ou uma subnotificação dos casos de hanseníase nesses municípios.

Em 2010, no estudo realizado por Frota e colaboradores no Ceará, não foi identificado diferença na soroprevalência de anticorpos anti- PGL 1 no soro de contatos de pacientes em Sobral, não contatos de pacientes em Sobral e não contatos de pacientes em Mulungu. A similaridade entre os resultados dos analisados em Sobral pode ser explicada pela grande endemicidade dessa cidade, o que levaria os não contatos a serem expostos ao bacilo em decorrência do grande número de doentes na cidade. Porém, de forma contrastante, a soroprevalência dos não contatos de casos em Mulungu terem semelhança com a dos não contatos em Sobral pode indicar que os níveis de anticorpos detectados nos participantes da pesquisa em Mulungu foram em resposta a algum contato prévio com o bacilo ou mesmo com outras micobactérias ambientais. Assim, com base nos resultados de positividade alcançados nesse município, esse contato indireto com *M. leprae* que levaria a produção de anti- PGL 1 pode ser devido a interação do indivíduo com casos não diagnosticados ou com as fontes de águas ambientais DNA positivas, como as detectadas nesse estudo.

Lavania *et al.* (2008) buscou quantificar o RNA detectado das amostras de solo positivas, encontrando um valor médio de número de cópias $1,8 \times 10^3$ em áreas de não-pacientes

e $4,3 \times 10^4$ em área de pacientes. Rudeeaneksin et al. (2008) utilizaram SYBR Green e os iniciadores para região *16S rRNA* na quantificação de DNA em biópsia de pele, obtendo valores de $1,07 \times 10^2$ a $1,65 \times 10^8$ número de cópias de *M.leprae*. Como se pode perceber, os valores encontrados foram bastantes superiores ao obtido nesse estudo, no qual o maior número de cópias detectado foi $1,44 \times 10^2$.

Vale lembrar que as amostras de águas ambientais foram coletadas nos anos de 2010 a 2012, anteriormente a realização da qPCR e, além disso, as amostras foram utilizadas em outros ensaios. Por isso, acredita-se que, apesar de todo o cuidado tomado para evitar o congelamento e descongelamento excessivo das amostras como dividir o DNA extraído em três microtubos cônicos de 1,5 mL e a não utilização do tubo de amostra por mais de 3 descongelamentos, acredita-se que pode ter ocorrido uma degradação do material genérico extraído, resultando em uma quantificação de número de cópias de *M.leprae* reduzida.

Embora o número de cópias encontrado tenha sido inferior do que o reportado nos demais estudos aplicando qPCR na quantificação absoluta *M. leprae*, a cidade de Boa Viagem, a qual apresentou um coeficiente de detecção de 17 casos em 2012 obteve o maior valor de número de cópias de *M. leprae* ($1,44 \times 10^2$). Enquanto que o município de Mulungu, sem casos detectados em 2012, apresentou o menor valor de número de cópias de *M. leprae* – $1,41 \times 10^1$.

Além disso, a média dos C_{Ts} e o desvio padrão foram menores no município de Juazeiro do Norte, a cidade com maior detecção de casos novos de hanseníase com exceção da capital e da região metropolitana do estado. Em contraste, o município de Mulungu apresentou a maior média dos C_{Ts} e o segundo desvio padrão maior entre as cidades estudadas. Também, deve ser observado que a baixa qualidade do DNA total extraído pode ter interferido na qPCR, gerando C_{Ts} maiores que 25.

Segundo pesquisas de rotas de transmissão e da origem dos genótipos de diversos autores (MONOT *et al.*, 2005; FONTES *et al.*, 2009; LAVANIA *et al.*, 2013), compreende-se o padrão de distribuição dos genótipos de *M. leprae* obtido nesse estudo. A grande presença do genótipo 4 nas amostras clínicas (64%) e nas amostras ambientais (100%) analisadas nesse estudo é explicada pela presença da mão-de-obra escrava do oeste africano responsável pela a plantação canavieira, a principal atividade do período colonial. A miscigenação de raças europeias pelas tentativas de invasões francesa e holandesa ou imigração europeia posterior estaria de acordo com o achado de genótipo 3 em 12% das amostras clínicas. A imigração de habitantes da região Norte – Amazonas e Pará – ou mesmo imigrantes de outros países da Ásia, por exemplo Índia, se relacionaria com 24% de amostras clínicas de genótipo 1 ou 2.

Em 2009, Fontes e colaboradores analisaram amostras de biópsias de pele de pacientes brasileiros, sendo a maioria do material clínico oriunda dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Foi observado que 79% das amostras tinham genótipo 3, principalmente os materiais clínicos do Rio de Janeiro e São Paulo, 16% eram genótipo 1 das amostras do Rio de Janeiro e Amazonas e 14% apresentaram genótipo 4 (FONTES *et al.*, 2009). Como não foram obtidas amostras da região do Nordeste brasileiro, explica-se porque o resultado da genotipagem das amostras do Ceará desse estudo, no qual o genótipo 4 foi mais prevalente, divergiu do trabalho de 2009.

Esse mesmo grupo de pesquisa resolveu posteriormente genotipar tanto amostras de biópsias como esfregaços de pele para baciloscopia, dessa vez com 23 amostras procedentes do Ceará. 78,3% do material foi caracterizado como genótipo 4, o que corrobora com o achado de 64% das biópsias de pele sendo genótipo 4 desse estudo, apontando a grande predominância do genótipo 4 no Nordeste brasileiro. Porém, os demais resultados diferem, já que o segundo genótipo mais encontrado em 2012 foi o 3 em 17,4% das amostras e, por fim, o genótipo 1 com 4,3% (FONTES *et al.*, 2012).

Com relação as amostras ambientais, os estudos com amostras clínicas e amostras de solo do peridomicílio dos pacientes realizados na Índia por Turankar e colaboradores demonstraram que todos os esfregaços de pele analisados possuíam o mesmo genótipo 1 presente nas amostras de solo coletadas (TURANKAR *et al.*, 2012; TURANKAR *et al.*, 2014). De maneira similar, houve concordância entre os resultados da genotipagem e subtipagem das amostras de biópsia de pele e amostras de água nesse estudo analisadas, pois a grande maioria do material clínico foi genótipo 4, sendo todos do subtipo 4-N e, entre as amostras ambientais, 87,5% das águas possuíam *M.leprae* com genótipo 4-N e 12,5% com genótipo 4-O.

Truman et al. (2011) puderam associar um grande número de casos de hanseníase não relacionados com pacientes aos tatus da região sudeste dos EUA, por possuírem sequência genômica essencialmente idêntica e o genótipo de *M.leprae* encontrado em ambas amostras não havia relatos científicos anteriores. Baseado nisso e na concordância dos genótipos caracterizados nas amostras ambientais e nas amostras clínicas, pode-se também pressupor que através do contato de pacientes com os rios, lagoas, açudes e balneários para ações de pesca, lavagem de roupas, banho e coleta de água para consumo humano, ocorra a eliminação de bacilos por meio de perdigotos, os quais viriam a contaminar o ambiente.

A possibilidade de *M.leprae* permanecer viável fora do corpo humano e em condições ambientais desfavoráveis permite questionar a possibilidade da contaminação indireta de indivíduos por essa água contaminada previamente, exercendo um papel importante na

transmissão da hanseníase, o que ajudaria a esclarecer a grande quantidade de casos detectados anualmente e o diagnóstico em indivíduos que não tiveram contato prévio com outros pacientes.

Deve-se ressaltar que o pequeno número de amostras clínicas e ambientais analisadas na genotipagem e subtipagem, resultado de uma grande dificuldade para amplificar o DNA das amostras de água para a posterior realização da digestão enzimática podem ter interferido na obtenção de resultados mais esclarecedores e conclusivos.

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível detectar DNA de *M. leprae* por PCR convencional e por qPCR, sendo a positividade da reação em tempo real maior do que a da reação convencional. Porém, a comparação dos resultados alcançados nas diferentes técnicas de amplificação não possuiu diferença significativa estatística.

As cidades pesquisadas apresentaram em ordem decrescente de frequência de positividade para DNA na pesquisa por qPCR: Mulungu, Juazeiro do Norte, Boa Viagem, Sobral e Crato. A quantificação absoluta de *M. leprae* nessas amostras positivas teve um maior número de cópias do bacilo em Boa Viagem e um menor número de cópias do bacilo em Mulungu.

Os isolados do bacilo encontrados nas amostras DNA positivas do município de Juazeiro do Norte possuíram genótipo 4, sendo a maioria do subtipo 4-N, mas também havendo presença do subtipo 4-O. Os resultados de variabilidade genética obtidos das amostras clínicas de pacientes atendidos em Fortaleza foi em sua grande maioria do genótipo 4-N, seguido do genótipo 1 ou 2 e do genótipo 3.

Os resultados do presente estudo, portanto, fornecem informações sobre a presença de *M. leprae* em amostras de água dos municípios estudados com genótipo similar ao encontrado em pacientes, revelando a necessidade de uma investigação com maior profundidade sobre a dinâmica de transmissão da hanseníase e a possível importância do papel da água na propagação da doença.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**, v. 30, n.3, p. 373-382, 2003.
- AKAMA, T. *et al.* Whole-Genome expression. Analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application. **Jpn. J Infect. Dis.** v. 63, p. 387-392, 2010.
- BAPTISTA, I. M. F. D.; SARTORI, B. C. S.; TRINO, L. M. Guia de conduta para realização do exame baciloscópico. **Hansen int**, v.31, n° 2, p.39-41, 2006.
- BARKER, J.; BROWN, M. R. W. Trojan Horses of the microbial world : protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. **Microbiology**, v. 140, p.1253-1259, 1994.
- BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 11, p. 117-128, 2002.
- BIRCH, L. *et al.* A comparison of nucleic acid amplication techniques for the assessment of bacterial viability. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 296-301, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Ignotti, E.; Paula, R. C.; Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010. In: Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde, 2010a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 3125, de 7 de outubro de 2010. 2010b
Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125_07_10_2010.html>
- BRITTON, W. J. e LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, p.1209-1218, 2004.
- CARDONA-CASTRO, N. *et al.* Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. **Leprosy Review**, v. 80, p. 316–321, 2009.
- CARDONA-CASTRO, N. *et al.* *Mycobacterium leprae* in Colombia described by SNP7614 in *gyrA*, two minisatellites and geography. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 14, p. 375–382, 2013.
- CEARÁ. Secretaria da Saúde do Estado. Informe Epidemiológico Hanseníase. Fortaleza: Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, 2013.
- COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007- 1011, 2001.

DEPS, P. D. *et al.* Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: A case control study. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 74, p. 338-342, 2008.

DONOGUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **J. Med. Microbiol**, v. 50, p. 177-182, 2001.

DRANCOURT, M. Looking amoebae as a source of mycobacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 119-124, 2014.

EICHELMANN, K. *et al.* Leprosy. An update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermosifiliogr**, v. 107, n. 7, p. 554-563, 2013.

ELLIS, R. C.; ZABROWARNY, L. A. Safer staining method for acid fast bacilli. **Journal Clinical Pathology**, v.46, p. 559-560, 1993.

FONTES, A. N. B. *et al.* Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. **Leprosy Review**, v. 80, p. 302–315, 2009.

FONTES, A. N. B. *et al.* Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 143-149, 2012.

FOSS, N. T. *et al.* Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 536-540, 2011.

FROTA, C. C. *et al.* Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and non-endemic area in northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 490-495, 2010.

FROTA, C. C. *et al.* *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasybus novemcinctus*) in Northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 107(Suppl. I), p. 209-213, 2012.

GIRDHAR B. K. Skin to skin transmission of leprosy. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.71, n.4, p. 223-225, 2005.

GOULART, I. M. B. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Arch Dermatol Res**, v. 299, p.267–271, 2007.

GOULART, I. M. B; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Arch Dermatol Res**, v. 300, p. 269-290, 2008.

GOULART, I. M. B. *et al.* Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 55-59, 2012.

HAN, X. Y. *et al.* A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Society for Clinical Pathology**, v. 130, p. 856-864, 2008.

HAN, X. Y.; SILVA, F. J. On the Age of Leprosy. **PLoS One**, v. 8, n. 2, e2544, 2014.
doi:10.1371/journal.pntd.0002544

HARTSKEERL, A. R.; DE WIT, M. Y. L.; KLATSER, P. R. Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2357-2364, 1989.

HEDMAN, J.; RADSTROM, P. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR. In: WILKS, M. **PCR Detection of Microbial Pathogens**. Springer, p. 17-48, 2013.

HEID, C.A. *et al.* Real Time Quantitative PCR. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIRAWATI, K. K. *et al.* Detection of *M. leprae* by reverse transcription- PCR in biopsy specimens from leprosy cases: A preliminary study. **J Commun Dis**. v. 38, n° 3, p. 280-287, 2006.

JOB. C. K. *et al.* Transmission of Leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 3, p.518-521, 2008.

JOYCE, M. P. Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 17-21, 2012.

KAI, M. *et al.* Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. **Infection, Genetics and Evolution**, v.19, p. 200–204, 2013.

KERR-PONTES, L. R. S. *et al.* Inequality and leprosy in Northeast Brazilian ecological study. **Int J Epidemiol.**,v. 33, p. 262–269, 2004.

KERR-PONTES, L. R. S. *et al.* Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case–control study. **Int J Epidemiol.**, v. 35, p. 994–1000, 2006.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p.95-125, 2006.

KURABACHEW, M.; WONDIMU, A.; RYON, J. J. Reverse transcription- PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. **J. Clin. Microbiol**, v. 36, p. 1352–1356, 1998.

LAHIRI, R.; KRAHENBUHL, J. L. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. **Leprosy Review**, v. 79, p. 401-409, 2008.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspect – Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n.2, p. 205-218, 2014a.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of laboratory and therapeutic aspects – Part 2. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n.3, p. 389-403, 2014b.

LAVANIA, M. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences. **J Commun Dis.**, v. 38, n° 3, p. 269-273, 2006.

LAVANIA, M. *et al.* Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 627–631, 2008.

LAVANIA, M. *et al.* Single nucleotide polymorphisms typing of *Mycobacterium leprae* reveals focal transmission of leprosy in high endemic regions of India. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, p.1058–1062, 2013.

LINI, N.; SHANKERNARAYAN, N. P.; DHARMALINGAM, K. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 753–759, 2009.

MACIEL, L. R; OLIVEIRA, M. L. W.; GALLO, M. E. N. Memória e história da hanseníase no Brasil através de depoentes (1960-2000). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, supl. 1, p. 308-336, 2003.

MADELEINE Y. L. W. *et al.* Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium leprae* in Nasal Swab Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n° 3, p. 502-506, 1993.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of Real-Time and Conventional PCR Targeting Complex 85 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3154–3159, 2006.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2124–2130 v. 47, n° 7, 2009.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, e1354, 2011.

MARTINEZ, A. N. *et al.* PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, e2655, 2014.
doi:10.1371/journal.pntd.0002655

MATSUOKA, M. *et al.* *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. **Indian J Lepr.**, v. 71, n. 1, p.61-67, 1999.

MATSUOKA, M. *et al.* Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution. **Leprosy Review**, v. 80, p. 322–326, 2009.

MATTOS, K. A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, p. 371-384, 2010.

MATTOS, K. A. *et al.* *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cellular Microbiology**, 2014. doi:10.1111/cmi.12279

MISKIN, I. P.; FARRIMONDL, P.; HEAD I. M. Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. **Microbiology**, v. 145, p. 1977-1 987, 1999.

MONOT, M. HONORÉ, N. *et al.* On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 305, p.1040-1042, 2005.

MONOT, M. *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282-1292, 2009.

MONTENEGRO, A. C. *et al.* Spatial analysis of the distribution of leprosy in the State of Ceara, Northeast Brazil. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 99, 683-686, 2004.

MOURA, R. S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.11-18, 2008.

Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase.
Disponível em: <http://www.morhan.org.br/institucional>

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 604p.

PHETSUKSIRI, B. *et al.* A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 48, p. 319–328, 2006.

REIS, E. M. *et al.* *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clinical Microbiology and Infection**, 2013.doi: 10.1111/1469-0691.12349.

RIDLEY D. S.; JOPLING W. H. Classification of leprosy according to immunity. **Int J Lepr**, v. 34, p.255–273, 1966.

ROBBINS, G. *et al.* Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B. C.). **PLoS One**, v. 4, n. 5, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005669.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect Dis**, v.11, p.464-470, 2011.

ROY, S. *et al.* Association of Vitamin D Receptor Genotype with Leprosy Type. **J Infect Dis.**, v. 179, p.187-191, 1999.

RUDEEANEKSIN, J. *et al.* LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 263–270, 2008.

SAKAMURI, R. M. *et al.* Population-Based Molecular Epidemiology of Leprosy in Cebu, Philippines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2844–2854, 2009.

SANTOS, A. P. T. *et al.* Imunopatologia da Hanseníase: Aspectos Clínicos e Laboratoriais. **NewsLab**, v. 73, p.142-156, 2005.

SANTOS, F. S. D.; SOUZA, L. P. A.; SIANI, A. C. O óleo de chaulmoogra como conhecimento científico: a construção de uma terapêutica antileprótica. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.29-47, 2008.

SAPKOTA, B. R. *et al.* Association of TNF, MBL, and VDR Polymorphisms with Leprosy Phenotypes. **Hum Immunol.**, v.71, n.10, p.992-998, 2010.

SAÚDE amplia ações contra hanseníase no Ceará. **OPOVO**, 2012. Disponível em: <<http://blog.opovo.com.br/blogdoeliomar/saude-amplia-acoes-contrahanseniase-no-ceara/>>

SCHMIDT, M. The 100th Anniversary of Armauer Hansen's (1841-1912) Death. **Leprosy Review**, v.83, p. 408-409, 2012.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n. 2, p.338-381, 2006.

SHERIDAN, G. E. C. *et al.* Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n° 4, p. 1313–1318, 1998.

Scitable by nature education. SNP. Nature Education, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/definition/single-nucleotide-polymorphism-snp-295>>

SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: gene, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57-71, 2011.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.30, p. 325-334, 1997.

TRUMAN, R. Leprosy in wild armadillos. **Leprosy Review**, v. 76, p. 198-208, 2005.

TRUMAN, R. W. *et al.* Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n. 11, e328, 2008.

TRUMAN, R.; FINE, P. E. M. 'Environmental' sources of *Mycobacterium leprae*: Issues and evidence. **Leprosy Review**, v. 81, p. 89-95, 2010.

TRUMAN, R. W. *et al.* Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **N Engl J Med**, v. 364, p. 1626-1633, 2011.

TURANKAR, R. P. *et al.* Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: Deciphering the role of environment as a potential reservoir. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 121–126, 2012.

TURANKAR, R. P. *et al.* Single nucleotide polymorphism-based molecular typing of *M. leprae* from multicas e families of leprosy patients and their surroundings to understand the transmission of leprosy. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 3, p. 142-149, 2014.

van BEERS, S. M.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. **Int J Lepr Other Mycobac Dis.**, v. 67, n° 2, p. 119-128, 1999.

VICENT, N. *et al.* Role of cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, p. 511-524, 2000.

VISSA, V. D; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**, v. 2, n. 8, 2001.

VISSCHEDIJK, J *et al.* *Mycobacterium leprae* – millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n° 6, p. 388–399, 2000.

WAHYUNI, R. *et al.* *Mycobacterium leprae* in daily water resources of inhabitants who live in leprosy endemic area of East Java. **Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease**, v. 1, n°2, 2010.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 165–172, 2007.

WENG, X. *et al.* Identification and Distribution of *Mycobacterium leprae* Genotypes in a Region of High Leprosy Prevalence in China: a 3-Year Molecular Epidemiological Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.6, p. 2844–2854, 2007.

WENG, X *et al.* Molecular, ethno-spatial epidemiology of leprosy in China: Novel insights for tracing leprosy in endemic and non endemic provinces. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 14, p. 361–368, 2013.

WILLIAMS, D. L. *et al.* The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J. Infect. Dis**, v. 162, p.193–200, 1990.

World Health Organization. **Weekly epidemiological record**. n. 88, p. 365-380, 2013.

YU, H. S. *et al.* Natural occurrence of *Mycobacterium* as an endosymbiont of *Acanthamoeba* isolated from a contact lens storage case. **Korean Journal of Parasitology**, v. 45, n°. 1, p. 11-18, 2007.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CDERM

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CENTRO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM DERMATOLOGIA SANITÁRIA DONA LIBÂNIA - CDERM

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto CEP/CDERM – 011/07

Título: Portadores de Hanseníase: Estudo Clínico - epidemiológico da Hanseníase em Área Endêmica do Nordeste do Brasil

Pesquisador responsável: Lígia Regina Franco Sansigolo Kerr

Proposição do (a) relator (a):

- aprovação
 aprovação com pendências
 não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP/CDERM – 12/09/2007

Data do parecer final do projeto pelo CEP/CDERM: 12/09/2007

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia CDERM, em sua reunião realizada em 12/09/2007, decidiu APROVAR, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observações:

1. Declaramos que a Dra. Maria Araci Pontes, membro deste CEP, não participou da avaliação do projeto em questão, abstendo-se de votar, para evitar conflito de interesses.
2. O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatório final da pesquisa ao CEP/CDERM.

Fortaleza, 13 de setembro de 2007.

Lucy Landim
 Dra. Lucy Maria Landim Tavares
 Vice-Coordenadora do CEP/CDERM

ANEXO B – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS A PARTIR DE COLÔNIAS EM ÁGAR

1. Coletar com alça bacteriológica colônias cultivadas tendo o cuidado para não arrancar o meio de cultura;
2. Lavar as células com 1 mL de tampão TE;
3. Adicionar 500 µL de tampão TE-Triton e selar a tampa dos tubos com parafilm;
4. Aquecer os tubos em banho-maria à 100^oC por 30 minutos;
5. Esperar esfriar até temperatura ambiente e centrifugar à 13000 rpm/3 min. Coletar o sobrenadante em outro tubo eppendorf 1,5 mL previamente esterilizado. O sedimento é desprezado;
6. Adicionar 1/50 do volume de NaCl 5M e 2 volumes de álcool etílico absoluto (previamente resfriado à 4^oC). Homogeneizar por lenta inversão, até formação de “nuvem” de DNA. Manter os tubos por 10 min à temperatura de -20^oC para precipitação do DNA;
7. Centrifugar à 10000rpm/ 10 min. Desprezar o sobrenadante (não tocar no sedimento - DNA);
8. Adicionar 1mL de álcool etílico 70% (4^oC) e centrifugar à 10000rpm/ 10 min. Desprezar o sobrenadante, tendo cuidado para não tocar no sedimento;
9. Deixar o frasco com a tampa aberta à temperatura ambiente para evaporação natural e completa do álcool (~30 minutos);
10. Suspender o DNA em 200 µL de tampão TE. Não agitar em vortex ou com ponteira, pois o DNA é frágil e pode fragmentar-se.
11. Colocar os tubos em banho seco à 37^oC para solubilização overnight. Na manhã seguinte, fazer spin e armazenar o DNA à 4^oC.

*** Fazer espectrofotometria 260/280 ou visualizar integridade do DNA em gel de agarose 1%.

ANEXO C – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE BIÓPSIA COM UTILIZAÇÃO DO KIT *DNEASY BLOOD & TISSUE* (QIAGEN®)

1. Cortar a biópsia em pedaços de aproximadamente 25mg, colocar em tubo de 1,5mL e adicionar 180µL de ATL.
2. Adicionar 20µL de proteinase K e 4µL de RNase A, colocar no vortex e depois incubar na temperatura ambiente por 2 minutos.
3. Levar os tubos para banho seco a 56°C.
4. Adicionar 200µL do tampão AL e colocar no vortex. Posteriormente, adicionar 200µL de etanol 100% (etanol absoluto) e colocar novamente no vortex.
5. Pipetar toda a solução, incluindo o precipitado, para a coluna DNeasy Mini spin com o tubo coletor de 2mL. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado e o tubo coletor e ficar apenas com a coluna.
6. Colocar a coluna DNeasy Mini spin em um novo tubo coletor e adicionar 500µL de AW1 na coluna. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado e o tubo novamente. Ficar apenas com a coluna.
7. Colocar a coluna DNeasy Mini spin em um novo tubo coletor e adicionar 500µL de AW2. Centrifugar a 14000rpm por 3 minutos. Descartar o filtrado e o tubo novamente. Ficar apenas com a coluna.
8. Colocar a coluna DNeasy Mini spin em tubo eppendorf novo de 1,5mL. Adicionar 100µL de AE e incubar na temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto.
9. Na coluna DNeasy Mini spin (com o mesmo tubo) adicionar 50µL de AE. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto.
10. Descartar a coluna. Guardar o DNA extraído a -20°C.

ANEXO D – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PROVENIENTE DE ÁGUA AMBIENTAL COM O KIT POWERWATER DNA ISOLATION (MO BIO®)

1. Filtrar as amostras de água utilizando um filtro conectado a uma fonte de vácuo. O volume de água filtrada depende da carga microbiana e da turbidez da água.
2. Remover a parte superior do aparelho e, utilizando pinças estéreis, coletar a membrana filtrante branca.
3. Inserir a membrana no PowerWater Bead Tube 5 mL.
4. Adicionar 1mL de Solution PW1 no PowerWater Bead Tube.
5. Colocar o PowerWater Bead Tube horizontalmente em um adaptador MO BIO Vortex na velocidade máxima por 5min.
6. Centrifugar os tubos a 4000rpm por 1min a temperatura ambiente.
7. Transferir todo o sobrenadante para um limpo Collection Tube 2mL. Retirar o sobrenadante usando uma pipeta de 1 mL, colocando a ponteira abaixo dos beads.
Obs: Pipetar mais de uma vez para garantir a remoção de todo o sobrenadante. Expectativa de recuperar entre 600-650 µL do sobrenadante, dependendo do tipo de membrana filtrante utilizado.
8. Centrifugar os tubos a 13000rpm por 1min.
9. Evitando o pellet, transferir o sobrenadante para um novo Collection Tube 2mL.
10. Adicionar 200µL de Solution PW2 e vortex brevemente para misturar.
11. Centrifugar os tubos a 13000rpm por 1min.
12. Evitando o pellet, transferir o sobrenadante para um novo Collection Tube 2mL.
13. Adicionar 600µL de Solution PW3 e vortex brevemente para misturar.
14. Transferir 650µL do sobrenadante para um Spin Filter e centrifugar os tubos por 1 min a 13000rpm. Descartar o material que passar pelo filtro e repetir a operação até todo o sobrenadante tiver passado pelo Spin Filter.
Obs.: Um total de 2 transferências são necessários.
15. Colocar a coluna Spin Filter dentro de um Collection Tube 2mL.
16. Agite para misturar Solution PW4 antes de usar. Adicionar 650µL de Solution PW4 e centrifugar os tubos a 13000rpm por 1min.
17. Descartar o filtrado e adicionar 650µL de Solution PW5. centrifugar os tubos a 13000rpm por 1min.

18. Descartar o filtrado e centrifugar os tubos novamente por 2min a 1300rpm para remover o resíduo de lavagem.
19. Colocar a coluna Spin Filter dentro de um Colletion Tube 2mL. Adicionar 100 μ L de Solution PW6 no centro da membrana branca filtrante.
20. Centrifugar os tubos novamente a 13000rpm por 1min.
21. Descartar a coluna Spin Filter e armazenar o DNA a -20°C.

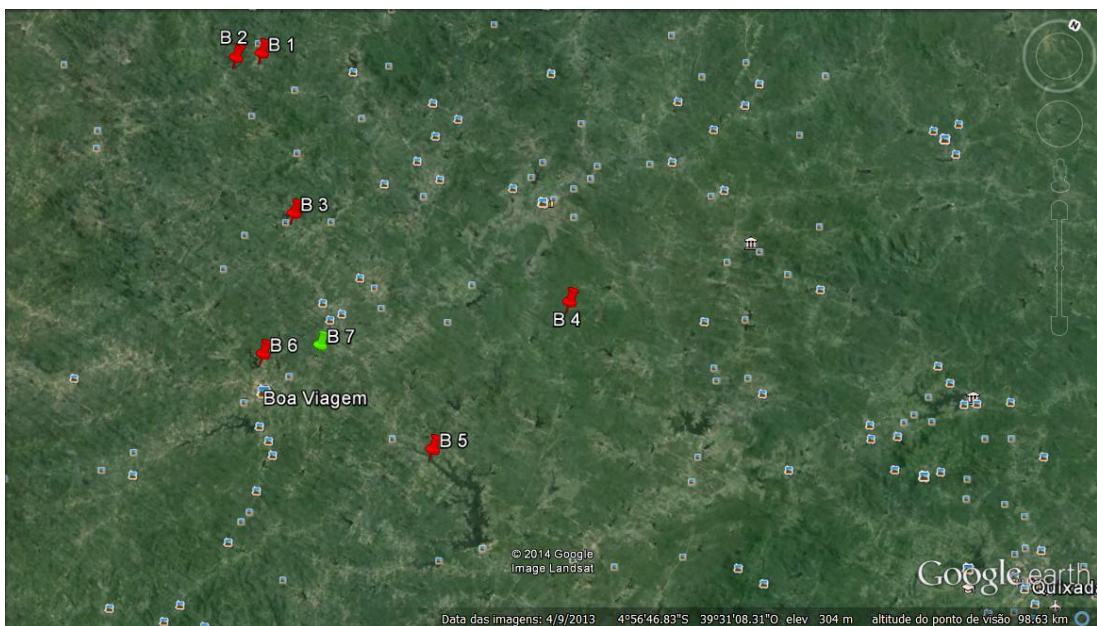
ANEXO E – VISÃO ESPACIAL DAS CIDADES ESTUDADAS COM OS RESPECTIVOS PONTOS DE COLETA.

Figura 21 – Os municípios de Juazeiro do Norte e Crato e os nove (09) pontos de coleta (J1 – J5/ C1 – C4).



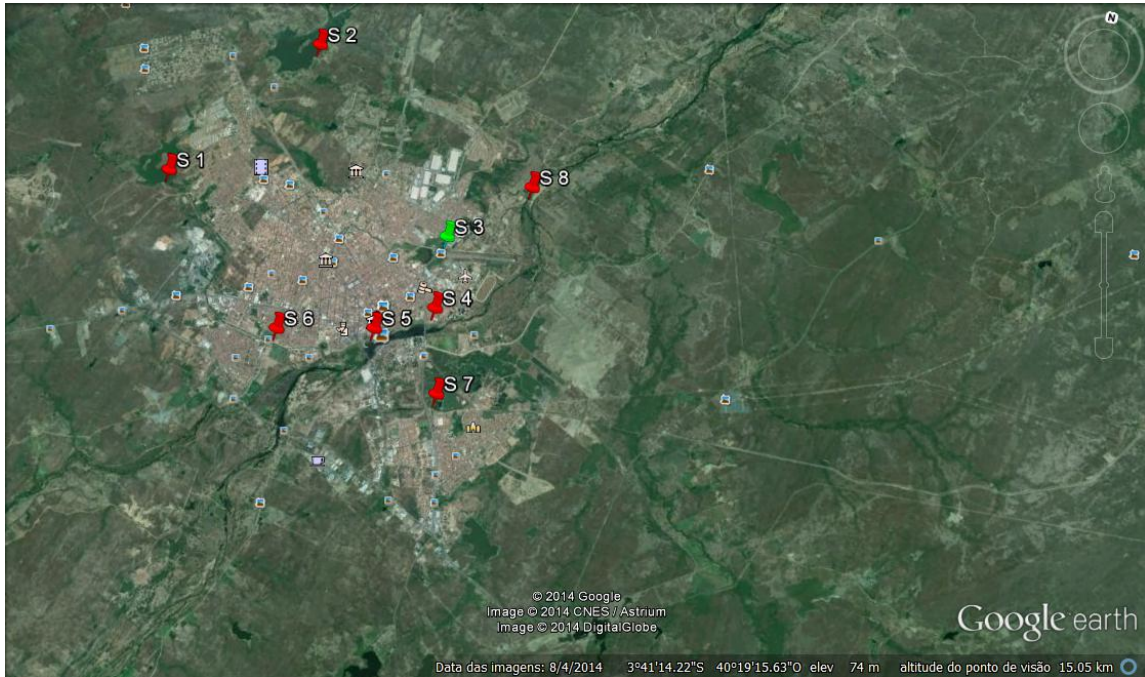
Fonte: Google Earth. Foto tirada em 17/12/2014. Os pontos destacados em vermelho revelam os locais positivos para a pesquisa de DNA de *M. leprae* enquanto que os pontos verdes destacam os locais negativos para o DNA de *M. leprae*.

Figura 22 – O município de Boa Viagem e os sete (07) pontos de coleta (B1 – B7).



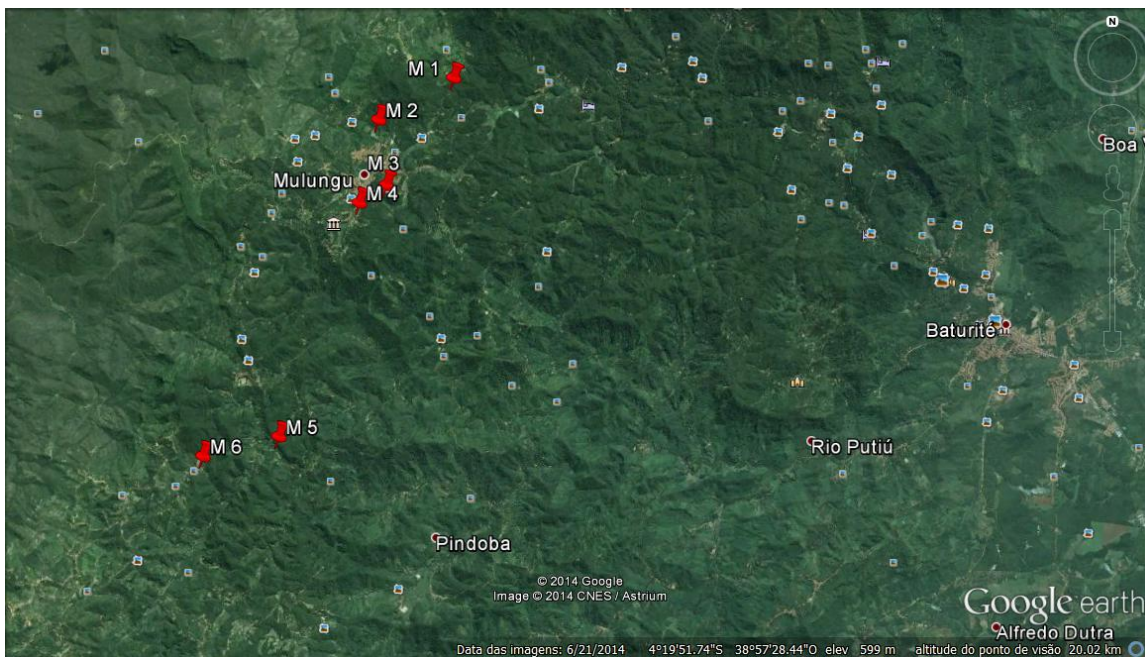
Fonte: Google Earth. Foto tirada em 17/12/2014. Os pontos destacados em vermelho revelam os locais positivos para a pesquisa de DNA de *M. leprae* enquanto que os pontos verdes destacam os locais negativos para o DNA de *M. leprae*.

Figura 23 – O município de Sobral e os oito (08) pontos de coleta (S1 – S8).



Fonte: Google Earth. Foto tirada em 17/12/2014. Os pontos destacados em vermelho revelam os locais positivos para a pesquisa de DNA de *M. leprae* enquanto que os pontos verdes destacam os locais negativos para o DNA de *M. leprae*.

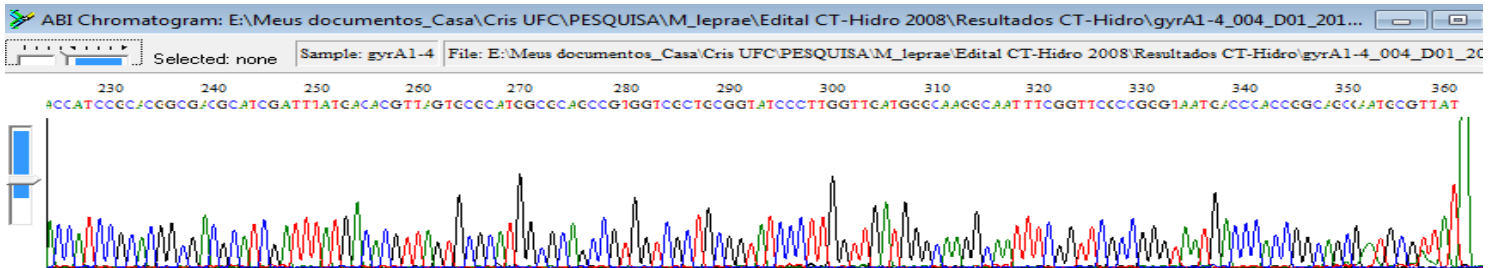
Figura 24 – O município de Mulungu e os seis (06) pontos de coleta (M1 – M6)



Fonte: Google Earth. Foto tirada em 17/12/2014. Os pontos destacados em vermelho revelam os locais positivos para a pesquisa de DNA de *M. leprae*.

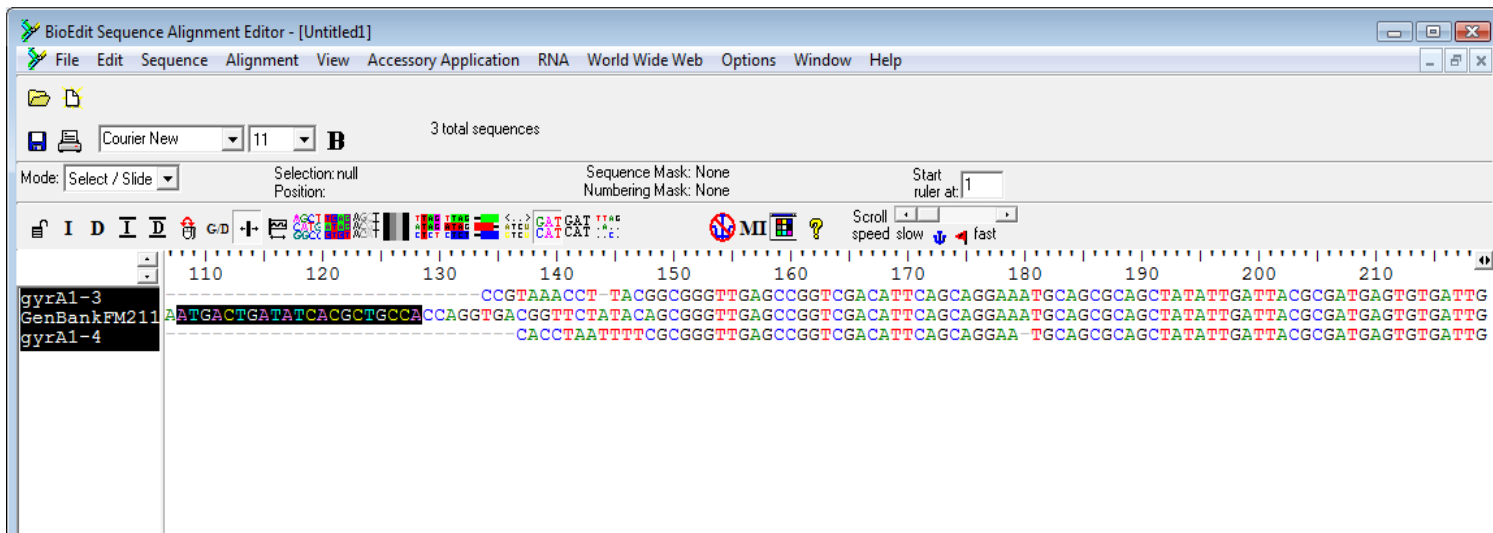
ANEXO F - CONFIRMAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DE *M. LEPRAE* POR SEQUENCIAMENTO

Figura 25 - Eletroferograma de sequenciamento do gene *gyrA* de *M. leprae* da amostra de água ambiental J1a.



Fonte: Instituto Evandro Chagas, Belém-PA.

Figura 26 - Alinhamento do sequenciamento do gene *gyrA* de *M. leprae* das amostras de água J1a e S1a com a referência de *M. leprae* (Br4923 GenBank: FM211192.1) no NCBI.



Fonte: Instituto Evandro Chagas, Belém-PA. A sequência nucleotídica superior refere-se ao gene *gyrA* subunidade A da amostra do município de Juazeiro do Norte enquanto que a sequência inferior refere-se a amostra do município de Sobral para a mesma região. A sequência do meio é referente a sequência da região do gene *gyrA* subunidade A do Br4923 GenBank: FM211192.1 obtido no site da NCBI.

**ANEXO G – RELAÇÃO A₂₆₀ /₂₈₀ E CONCENTRAÇÃO DO DNA TOTAL EXTRAÍDO
DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Ponto de coleta	A260/280	Concentração (ng/μL)	Ponto de coleta	A260/280	Concentração (ng/μL)
J1a	5,81	7,3	S1a	2,71	4,5
J1b	8,77	9,1	S1b	2,36	9,3
J1c	3,51	6,7	S1c	2,21	9,5
J1d	13,65	9,5	S1d	2,17	9,9
J1e	9,34	5,4	S1e	1,93	7,9
J2a	4,06	15,4	S2a	2,00	37,5
J2b	3,17	16,8	S2b	2,19	6,2
J2c	3,03	20,5	S2c	2,07	9,2
J2d	2,98	20,2	S2d	2,19	8,6
J2e	2,26	12,0	S2e	2,22	7,9
J3a	6,17	17,0	S3a	3,14	8,1
J3b	3,56	11,4	S3b	2,21	9,3
J3c	4,06	8,3	S3c	1,89	5,8
J3d	6,05	7,5	S3d	2,29	7,7
J3e	2,86	10,1	S3e	2,03	9,0
J4a	2,96	7,8	S4a	2,05	8,9
J4b	6,76	13,1	S4b	1,74	12,1
J4c	8,80	8,4	S4c	1,63	3,9
J4d	9,83	7,7	S4d	2,73	11,2
J4e	5,68	9,3	S4e	1,81	13,6
J5a	8,26	7,8	S5a	2,35	9,5
J5b	9,98	7,2	S5b	2,28	12,7
J5c	9,87	7,5	S5c	2,58	6,5
J5d	3,32	2,7	S5d	2,18	8,4
J5e	8,67	4,7	S5e	2,10	12,5
C1a	4,97	8,4	S6a	2,79	4,1
C1b	4,65	7,5	S6b	1,99	8,2
C1c	3,01	8,7	S6c	2,05	6,4
C1d	3,14	7,6	S6d	1,89	5,9
C1e	3,60	11,1	S6e	1,86	30,9
C2a	1,78	7,8	S7a	2,11	13,5
C2b	2,38	24,9	S7b	2,97	1,9
C2c	4,14	3,4	S7c	2,87	2,4
C2d	2,04	9,3	S7d	1,86	3,6
C2e	2,78	5,0	S7e	1,99	2,0
C3a	2,42	2,2	S8a	2,31	23,4
C3b	2,09	1,8	S8b	2,87	7,4
C3c	3,00	1,6	S8c	2,27	25,7
C3d	1,81	3,5	S8d	2,12	18,6
C3e	1,86	1,0	S8e	2,19	22,1
C4a	1,93	32,8			
C4b	2,11	19,6			
C4c	2,27	15,2			
C4d	1,97	15,3			
C4e	1,96	24,3			

ANEXO H – APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS E ENCONTROS UNIVERSITÁRIOS

Trabalho apresentado no 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia – XV Simpósio Brasileiro de Micobactérias, realizado em Natal – RN.

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM COLEÇÕES DE ÁGUAS AMBIENTAIS DE ÁREAS ENDÊMICAS E NÃO ENDÊMICAS DE CINCO MUNICÍPIOS DO CEARÁ.

Maísa Viana de Holanda, Maria Luisa Bezerra de Macedo, Thais Eveline Oliveira dos Santos, José Antonio Beltrão Sabadia, Cristiane Cunha Frota.

INTRODUÇÃO. A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. No Ceará é observado o aumento do número de casos novos de hanseníase. A infecção de indivíduos suscetíveis acontece principalmente pela inalação de bacilos eliminados pelas vias aéreas superiores de pacientes multibacilares. A transmissão é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro, estado nutricional, vacinação com BCG e taxa de exposição ao *M. leprae* ou outras micobactérias. Acredita-se que o contato com fatores ambientais também atue como fonte de infecção, citam-se água, solo e alguns animais. O papel exato do ambiente na dinâmica de transmissão ainda é especulativo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a presença do *M. leprae* em amostras de água coletadas em áreas endêmicas e não endêmicas dos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral, Boa Viagem e Mulungu. **MATERIAIS E MÉTODOS.** Foram coletadas cinco amostras de água de 30 reservatórios distribuídos nos cinco municípios estudados, totalizando 150 amostras. Durante o transporte uma amostra foi danificada, totalizando assim, 149 amostras. As amostras coletadas foram provenientes de açudes, riachos, rios, balneários recreativos e outros. O DNA do *M. leprae* foi extraído com o kit PowerWater DNA Isolation (Mo Bio) e a PCR para a amplificação dos ácidos nucleicos realizada através do kit Master Mix (Qiagen) para obtenção do produto de 187pb relativo ao gene *gyrA*, visualizado em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídio. **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.** O DNA do *M. leprae* foi detectado em todos os municípios estudados. Juazeiro apresentou 17 amostras positivas (17/25), correspondendo a uma positividade de 68%, Crato apresentou cinco amostras positivas (5/20) obtendo uma positividade de 25%, Sobral apresentou 14 amostras positivas (14/40) com 35% de positividade. Já os municípios de Boa Viagem e Mulungu apresentaram ambos 16 amostras positivas (16/34 e 16/30), apresentando 47% e 53% de positividade cada um, representando ao todo 45,6% de positividade nas amostras coletadas. Os produtos de PCR obtidos foram confirmados por sequenciamento. **CONCLUSÃO.** Este estudo indica a presença de DNA de *M. leprae* nas amostras de águas ambientais. Diante disso, as coleções de água dos municípios estudados representam possíveis reservatórios do bacilo e fonte de transmissão da doença para a comunidade.

Trabalho apresentado no VII Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação**QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA POR PCR EM TEMPO REAL DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM COLEÇÕES DE ÁGUAS AMBIENTAIS DE MUNICÍPIOS CEARENSES.****Maísa Viana de Holanda, Maria Luisa Bezerra de Macedo, Cristiane Cunha Frota.**

INTRODUÇÃO A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. No Ceará é observado o aumento do número de casos novos de hanseníase. A infecção de indivíduos suscetíveis acontece principalmente pela inalação de bacilos eliminados pelas vias aéreas superiores de pacientes multibacilares. Acredita-se que o contato com fatores ambientais sejam possíveis fontes de infecção, como a água, o solo e tatus.

OBJETIVO Assim, este estudo teve como objetivo detectar e quantificar por técnica de PCR em tempo real a presença do DNA de *M. leprae* em amostras de águas ambientais coletadas em áreas endêmicas e não endêmicas de municípios de Estado do Ceará.

METODOLOGIA Foram coletadas amostras de água de 30 reservatórios, sendo coletadas cinco réplicas de cada sítio selecionado, totalizando 149 amostras. As amostras coletadas foram provenientes de açudes, riachos, rios e balneários recreativos. O DNA total foi extraído através de kit específico para amostras ambientais de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi realizado a amplificação do gene *16S rRNA* de *M. leprae* através de qPCR com o uso do kit SYBR Green PCR Master Mix. Utilizou-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de plasmídeo pIDTBlue 16SrRNAMlep para quantificar o DNA presente nas amostras ambientais.

RESULTADOS O DNA de *M. leprae* foi detectado em todos os municípios estudados. Do total de 149 amostras de água analisadas, 129 foram positivas para a pesquisa de DNA (86,58%). O ciclo limiar das amostras variou de 24,59 a 44,79 ciclos e o número de cópias de *M. leprae* se manteve no intervalo de $1,03 \times 10^{-3}$ a $1,44 \times 10^{+2}$.

CONCLUSÃO Este estudo indica presença de DNA de *M. leprae* nas amostras de águas ambientais, indicando fundamentalmente a presença de bacilos. Dessa forma, são necessários mais estudos a fim de ampliar o conhecimento da influência da água na transmissão da hanseníase.