



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

MARIA LUÍSA BEZERRA DE MACEDO

**DETECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* E MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS EM COLEÇÕES DE ÁGUA AMBIENTAIS EM MUNICÍPIOS
DO CEARÁ**

FORTALEZA

2013

MARIA LUÍSA BEZERRA DE MACEDO

DETECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* E MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS EM COLEÇÕES DE ÁGUA AMBIENTAIS EM MUNICÍPIOS DO
CEARÁ

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

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota

FORTALEZA

2013

MARIA LUÍSA BEZERRA DE MACEDO

DETECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* E MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS EM COLEÇÕES DE ÁGUA AMBIENTAIS EM MUNICÍPIOS DO CEARÁ

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Cristiane Cunha Frota (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Profª. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará – UFC

Ao meu amor,

Augusto Flávio Albuquerque Arraes.

Eu consegui e essa vitória também é sua!

Obrigada!

A minha família!
Por me apoiar sempre.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Nossa Senhora, pois sinto Suas presenças divinas em todos os meus passos, a cada sonho realizado, a cada objetivo alcançado; sei que são sob Suas bênçãos.

À meus pais, Manoel Soares de Macedo e Maria José Bezerra de Macedo pelo amor, incentivo e confiança, por compreenderem meus momentos de ausência e por me apoiarem sempre em minhas decisões.

À meus padrinhos Joaquim Augusto e Geraldina Bezerra da Silva, por tudo, em especial minha querida e amada madrinha por ser a principal responsável por eu ter chegado até aqui da forma que cheguei, por todo o amor, dedicação, incentivo, carinho, confiança, enfim, palavras não traduzem meus sentimentos de agradecimentos, amor e gratidão.

Ao meu noivo e amor maior, Augusto Flávio Albuquerque Arraes Freire, pela compreensão, quando o assunto era o mestrado, o resto era sempre em segundo plano. Seu apoio e incentivo desde a seleção até a conclusão deste Mestrado foram essenciais.

À meu querido irmão, Antonio Alceu Bezerra de Macedo pelo o amor e amizade e minhas sobrinhas Maria Cecília e Clarissa, pelos sorrisos inocentes e carinho sincero com que sempre me acolheram, e, por me considerarem, o orgulho da nossa família.

Amo-os incondicionalmente!

À minha querida e especial orientadora, Dra. CRISTIANE CUNHA FROTA, pela atenção, paciência e confiança a mim proporcionada. Por ser mais que uma professora, “uma mãe”, como carinhosamente a chamamos. Pelos ensinamentos repassados, e principalmente, por me aceitar fazer a seleção do Mestrado para ser sua orientanda e hoje estar realizando mais esse importante passo em minha vida. Professora muito obrigada por tudo, sei que palavras não traduzem meu carinho, admiração, gratidão e agradecimento. Muito obrigada por tudo!

Às minhas queridas *AquaGirls*, Máisa Viana de Holanda e Thaís Eveline Oliveira dos Santos, que mesmo nos momentos mais difíceis dos experimentos desta pesquisa, como na extração de RNA em plena madrugada de uma sexta-feira, sob a fragrância desagradabilíssima de betamecaptoetanol, sempre mantiveram o bom humor e o compromisso. Obrigada pelo companheirismo e amizade nesses mais de dois anos de convivência.

Aos geólogos Dr. José Sabadia Beltrão e Dra. Cynthia Romariz Duarte pela tamanha colaboração nesta pesquisa. Creio que a parte mais trabalhosa foi realmente sair de Fortaleza até os municípios estudados para realizar a coleta das amostras sob o sol quente da nossa região. O meu muito obrigada!

Aos queridíssimos técnicos do Laboratório de Micobactérias, Margarida Cavalcante (Margaridinha) e José Olavo Morais, pelo carinho e boa vontade com que contribuíram em várias etapas desta pesquisa. E também, pelo carinho e amizade com que me acolheram. Obrigada! E as meninas Lívia Érica Carlos Marques, Lívia Coêlho de Assis e Luana Nepomuceno, e aos meninos, João Carlos e José Aquiles, pela alegre convivência.

Vou sentir muita saudade de vocês.

Ao amigo Dr. Marcos por me descobrir a professora Cristiane e incentivar a minha seleção no Mestrado.

Ao meu professor e orientador da graduação, Dr. Gláucio Saldanha, pelo incentivo e força que sempre me proporcionou, para que viesse a fazer Mestrado e futuramente um Doutorado.

À minha família, tios(a), primos(a) e parentes pelas palavras de incentivo, carinho e o apoio que sempre me dedicaram e, pela torcida pelo meu sucesso.

A todas as minhas amigas lindas, onde estiverem, não vou citar nomes, mais cada uma delas sabe da tamanha importância em minha vida.

E, em especial aos pacientes portadores da doença hanseníase, com a esperança que essa pesquisa possa, de alguma maneira, contribuir para a melhoria nas suas vidas.

Ao corpo docente do Curso de Mestrado em Patologia, pelos ensinamentos repassados e aos colegas da turma 2011.1 pela convivência, por dividirmos momentos de angústia e alegrias.

As secretárias da coordenação do Curso, Paula Palácio e Mila Aragão pelo carinho e atenção.

À Capes e ao CNPq pelo financiamento da minha bolsa e o financiamento da pesquisa.

Aos professores: Dr. Jeová Keny Baima Colares, Dra. Vânia Maria Maciel Melo e Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho, por aceitarem o convite e participarem da minha Defesa de Mestrado, pela valiosa colaboração.

Enfim, a todos aqueles que me ajudaram ao longo deste estudo, não importa a forma, seja ela, material, intelectual, emocional ou espiritual.

Muito obrigada!

**ORAÇÃO DO
PAI NOSSO**

Pai nosso que estais no Céu, santificado seja o Vosso Nome, venha a nós o Vosso reino, seja feita a Vossa vontade, assim na terra como no Céu. O pão nosso de cada dia nos dai hoje; perdoai as nossas ofensas, assim como nós perdoamos a quem nos tem ofendido, e não nos deixeis cair em tentação, mas livrai-nos do mal. Amém.

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor”.

Paulo Coelho

RESUMO

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 e taxa de exposição ao *M. leprae* ou outras micobactérias. Acredita-se que o contato com fatores ambientais sejam possíveis fontes de infecção, como a água, o solo e alguns animais. O papel exato do ambiente na dinâmica de transmissão ainda é especulativo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar por técnicas de biologia molecular a presença de ácidos nucleicos de *M. leprae* em amostras de águas ambientais coletadas em áreas endêmicas de municípios de Estado do Ceará, assim como cultivar micobactérias ambientais nestas mesmas amostras. Foram coletadas amostras de água de 24 reservatórios, sendo coletadas réplicas de cada sítio selecionado, totalizando 119 amostras. As amostras coletadas foram provenientes de açudes, riachos, rios e balneários recreativos. O DNA e RNA total foram extraídos através de kits específicos para amostras ambientais de acordo com as recomendações do fabricante, seguido de amplificação dos ácidos nucleicos por PCR e RT-PCR respectivamente, gerando produto de 187pb relativo ao gene *gyrA* de *M. leprae*. Em relação ao cultivo, as amostras de água foram descontaminadas e cultivadas em meio Lowestein-Jensen, seguido de identificação da espécie de micobactéria por método de PRA. O DNA e o RNAm do *M. leprae* foram detectados em todos os municípios estudados. Do total de 119 amostras de água analisadas, 76 apresentaram positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae* (64%). Dentre estas, 23 foram positivas apenas para DNA (30,3%), 24 apenas para RNAm (31,5%) e 29 positivas para ambos os ácidos nucleicos (38,2%). O produto de PCR de duas amostras da região *gyrA* foi confirmado por sequenciamento e BLAST. Houve uma significância estatística de maior frequência de positividade de DNA e RNAm nos reservatórios de água com temperatura média de 28,4°C. O cultivo mostrou que além do bacilo *M. leprae*, as amostras de água continham espécies de micobactérias não tuberculosas. Este estudo indica presença de DNA e RNAm de *M. leprae* nas amostras de águas ambientais. Demonstrando, portanto, não somente a existência do bacilo da hanseníase, mas indica fundamentalmente a presença de bacilos viáveis, os quais são geneticamente iguais à referência de *M. leprae* em relação ao fragmento analisado. Desta forma, os resultados obtidos contribuem para ampliar o conhecimento da dinâmica de transmissão da hanseníase.

Palavras-chave: águas ambientais, *M. leprae*, DNA, RNAm.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*. In Ceará, it has an increasing in the number of new leprosy cases. The infection of susceptible individuals occurs mainly by inhalation of bacilli eliminated through the upper airways of multibacillary patients. The transmission is influenced by host genetic factors, nutritional status and rate of exposure to the bacilli and to other mycobacteria. It is believed that the contact with environmental factors are possible sources of infection, such as water, soil and some animals. It is not clear the exact role of how the environment affects the dynamics transmission. This study aimed to evaluate by molecular biology techniques the presence of nucleic acids from *M. leprae* in environmental water samples collected in endemic areas of the municipalities of the state of Ceará, and cultivate environmental mycobacteria in these same samples. Water samples were collected from 24 reservoirs being collected replicas of each site selected, totaling 119 samples. Samples were collected from ponds, streams, rivers and recreational places. The DNA and total RNA were extracted by specific kits for environmental samples according to the manufacturer's recommendations, followed by nucleic acid amplification by PCR and RT-PCR respectively, of 187bp generating product on the *gyrA* gene of *M. leprae*. Water samples were also decontaminated followed by cultivation in Lowenstein-Jensen medium and identification of the *Mycobacterium* species of by PRA method. DNA and mRNA of *M. leprae* were detected in all the municipalities studied. Of the total of 119 water samples analyzed, 76 were positive for nucleic acids of *M. leprae* (64%). Among these, 23 were positive only to DNA (30.3%), 24 only to mRNA (31.5%) and 29 positive for both nucleic acids (38.2%). The PCR product *gyrA* region was confirmed in two samples by sequencing and BLAST. There was a statistical significant higher frequency of DNA and mRNA positivity in the water samples with temperature around 28,4°C. The cultivation showed that the water samples also contained species of nontuberculous mycobacteria. This study indicates presence of DNA and mRNA *M. leprae* in the environmental water samples. Demonstrating hence not only the existence of the leprosy bacillus, but essentially indicates the presence of viable bacilli, which are genetically identical to the reference *M. leprae* in relation to fragment analyzed. Thus, the results contribute to the understanding of the dynamics of transmission of leprosy.

Keywords: environmental waters, *M. leprae*, DNA, mRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Taxas de prevalência da hanseníase no mundo. OMS, 2011.	32
Figura 2 -	Coefficiente de detecção geral de casos de hanseníase e em menores de 15 anos.	34
Figura 3 -	Mapa do Estado do Ceará.	45
Figura 4 -	Condicionamento e transporte das amostras.	49
Figura 5 -	Avaliação das condições ambientais dos municípios estudados.	49
Figura 6 -	<i>Kits</i> de extração de ácidos nucleicos de amostras de água.	50
Figura 7 -	Esquema de filtração à vácuo.	51
Figura 8 -	Localização do iniciador <i>gyrA-Forward</i> e sequência complementar do iniciador <i>gyrA-Reverse</i> (mostrado sob marcação) no gene ML0006 (<i>gyrA</i>) 3750 pb do <i>Mycobacterium leprae</i> .	52
Figura 9	Alinhamento do produto de 187pb referente ao gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> em relação a todas as sequências nucleotídicas de micróbios empregando a ferramenta BLAST.	53
Figura 10 -	Etapas do processo de descontaminação.	58
Figura 11 -	Algumas etapas da descontaminação. A, adição da centramida 2%; B, centrifuga refrigerada; C, cultivo em meio Lowenstein-Jensen; D, incubação a 37°C.	59
Figura 12 -	Localização do iniciador Tb11 e sequência complementar do iniciador Tb12 no gene <i>Rv0440</i> ou <i>hsp65</i> do <i>M. tuberculosis</i> .	61
Figura 13 -	Algoritmo de identificação dos padrões de PRA (Amplification-Restriction Analysis).	64
Figura 14 -	Frequência de positividade de amplificação de ácidos nucleicos de <i>M. leprae</i> , região <i>gyrA</i> , nas amostras de água dos municípios estudados.	66
Figura 15 -	Frequência de positividade de amplificação de DNA e RNAm de <i>M. leprae</i> , região <i>gyrA</i> , nas amostras de água dos municípios estudados.	67
Figura 16 -	Frequência da amplificação da região <i>gyrA</i> do DNA de <i>M. leprae</i> em águas ambientais coletadas nos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem em relação aos sítios de coleta.	68
Figura 17 -	Frequência da amplificação da região <i>gyrA</i> referente ao RNAm de <i>M. leprae</i> , em águas ambientais coletadas nos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem em relação aos sítios de coleta.	68
Figura 18 -	Frequência de DNA e RNAm de <i>M. leprae</i> nos cinco sítios de coleta do município de Juazeiro do Norte, Ceará, em novembro de 2010.	69

Figura 19 -	Frequência de DNA e RNAm de <i>M. leprae</i> nos quatro sítios de coleta do município de Crato, Ceará, em novembro de 2010..	70
Figura 20 -	Frequência de DNA e RNAm de <i>M. leprae</i> nos oito sítios de coleta do município de Sobral, Ceará, em outubro de 2011.	70
Figura 21 -	Frequência de DNA e RNAm de <i>M. leprae</i> nos sete sítios de coleta do município de Boa Viagem, Ceará, em setembro de 2012.	71
Figura 22 -	Amplificação da região <i>gyrA</i> referente ao DNA e RNAm de <i>M. leprae</i> em relação as cinco réplicas por sítios nos municípios Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem.	71
Figura 23 -	Eletroforese em gel de agarose 1% para identificação do DNA de <i>M. leprae</i> com os pares de <i>primers gyrA-Forward</i> e <i>gyrA-Reverse</i> (Invitrogen) no ponto de coleta 6 do município de Sobral.	72
Figura 24 -	Eletroforese em gel de agarose 1% para identificação do RNAm de <i>M. leprae</i> com os pares de <i>primers gyrA-Forward</i> e <i>gyrA-Reverse</i> (Invitrogen) no ponto de coleta 6 do município de Sobral.	73
Figura 25 -	Eletroferograma de sequenciamento do fragmento de 187 pb do gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> das amostras de águas J1a e S1a.	74
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	74
Figura 27 -	Positividade de DNA quanto a profundidade da coleta das réplicas em todos os sítios analisados.	78
Figura 28 -	Positividade de RNAm quanto a profundidade da coleta das réplicas em todos os sítios analisados.	78
Figura 29 -	Distribuição dos pontos de coleta dos municípios pelas atividades nos quais são empregados pela população.	79
Figura 30 -	Demonstração do uso da água.	79
Figura 31 -	Frequência d forma clínica e do sexo entre os novos casos de hanseníase diagnosticados no município de Sobral no ano de 2011.	82
Figura 32 -	Georeferenciamento da cidade de Sobral com os locais de coleta e a localização dos pacientes diagnosticados no ano de 2011.	84
Figura 33 -	Amostras de sedimento de água ambientais coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, evidenciando a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).	85
Figura 34 -	Amostras de sedimento de água ambientais evidenciando a diversidade de microorganismos observados através da técnica de Gram.	86

Figura 35 -	Percentual de positividade de cultivo de MNT nos 24 sítios de coletas referentes aos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa de Boa Viagem.	86
Figura 36 -	Cultivo apresentando crescimento de micobactérias em ágar <i>Lowenstein-Jensen</i> .	87
Figura 37 -	Amostras de colônias cultivadas em ágar <i>Lowenstein-Jensen</i> de águas ambientais coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, evidenciando a presença de somente bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).	89
Figura 38 -	Amplificação por PCR da região <i>hsp65</i> visualizada em gel de agarose (Invitrogen) à 1,5%.	90
Figura 39 -	Padrão de digestão com enzimas de endorrestricção <i>BstEII</i> e <i>HaeIII</i> em gel de agarose (Invitrogen) à 4% da PCR RFLP de micobactérias cultivadas em L-J.	91
Figura 40 -	Eletroforese em gel de agarose 1% para identificação de <i>M. leprae</i> com os pares de <i>primers gyrA-Forward</i> e <i>gyrA-Reverse</i> (Invitrogen) a partir do DNA das culturas que apresentaram crescimento de MNT.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características epidemiológicas, geológicas e climáticas dos municípios incluídos neste estudo.	44
Tabela 2 -	Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Juazeiro do Norte, Ceará.	46
Tabela 3 -	Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Crato, Ceará.	46
Tabela 4 -	Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Sobral, Ceará.	47
Tabela 5 -	Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Boa Viagem, Ceará.	47
Tabela 6 -	Distribuição das cinco amostras coletadas na espessura do reservatório dos sítios de coleta.	48
Tabela 7 -	Iniciadores para amplificação do fragmento de 187pb do gene da <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> .	52
Tabela 8 -	Iniciadores da PCR para amplificação do gene <i>hsp65</i> de <i>Mycobacterium sp.</i>	62
Tabela 9 -	Sítios de restrição das enzimas empregadas no PRA (PCR- Amplification-Restriction Analysis).	63
Tabela 10 -	Relação entre positividade para DNA e RNAm e profundidade de coleta das amostras de água nos diferentes municípios em estudo.	77
Tabela 11 -	Características físico-químicas dos sítios de coleta no momento em que foi realizada a coleta das amostras por município.	80
Tabela 12 -	Relação entre positividade para DNA e mRNA e condições ambientais em todos os sítios em estudo.	81
Tabela 13 -	Relação entre as condições ambientais dos sítios fortemente positivos para DNA e mRNA (J4 e B1) e as dos sítios fortemente negativos (C4, S2 e B7).	82
Tabela 14 -	Relação entre as formas clínicas (MB e PB) e o sexo na população estudada em Sobral para os pacientes que residem próximo aos locais de coletas.	83
Tabela 15 -	Descrição das características das colônias cultivadas em ágar Lowenstein-Jensen à 37°C e 30°C.	88
Tabela 16 -	Descrição dos padrões de digestão enzimática obtidos com as enzimas de endorrestrição <i>BstEII</i> e <i>HaeIII</i> do produto de amplificação de 441 pb do <i>hsp65</i> de <i>Mycobacterium sp.</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes
BD – Boderline-dimorfo
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
BL - Boderline-lepromatoso
BT – Boderline-tuberculóide
CD4+ – Linfócitos T auxiliares
CD8+ – Linfócitos T citotóxico
CMA - Complexo *M. avium*
CMTB - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
DATASUS – Tecnologia da Informação a Serviço do SUS
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTPs – Desoxinucleotídeos
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Ensaio imunoenzimático
FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
FRLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
G+C – Guanosina mais citosina
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HLA – Antígeno leucocitário humano
IB - Índice baciloscópico
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IFN- α – Interferon alpha
IFN- γ - Interferon gama

IPECE - Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará
L-J – Lowestein-Jensen
LL – Lepromatoso-lepromatoso
MB – Multibacilar
MCL - Micobacterias de Crescimento Lento
MCR – Micobacterias de Crescimento Rápido
MNT – Micobacterias Não Tuberculosas
MOTT - Micobactérias Outras que não o Bacilo da Tuberculose
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NK - *Natural Killer*
MS – Ministério da Saúde
OMS – Organização mundial de Saúde
PRA - PCR- *Amplification Restriction Analysis*
pb – Pares de base
PB - Paucibacilar
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PE – Ácido glutâmico-prolina
PGL1 – Antígeno glicolípido fenólico 1
PQT - Poliquimioterapia
PPE – Ácido glutâmico-prolina-prolina
RFLP – Restriction fragment length polymorphism
RLEP – Elemento específico repetitivo do *Mycobacterium leprae*
RNA – Ácido ribonucléico
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro
ROI - Intermediários reativos do oxigênio
RT-PCR – Reação de Polimerase em Cadeia com Transcrição Reversa
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
TA - Temperatura ambiente
TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA
TET - Tampão Tris/EDTA/Triton
TT – Tuberculóide- tuberculóide
Th1 – Linfócitos T secretores de citocinas ativadoras de macrófagos
Th2 – Linfócitos T secretores de citocinas ativadoras de células B

TLR - *toll-like* receptor

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alpha

VDR – Gene receptor da vitamina D

WHO - World Health Organization

UV - Ultravioleta

ZN - Ziehl-Nielsen

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 O gênero <i>Mycobacterium</i>	21
1.2 <i>Mycobacterium leprae</i>	23
1.3 Classificação clínica da hanseníase	25
1.4 Resposta do hospedeiro ao <i>M. leprae</i>	26
1.5 Diagnóstico da hanseníase e identificação molecular do bacilo de Hansen	27
1.6 Epidemiologia da hanseníase	31
1.7 Transmissão	35
1.8 Hanseníase e sua relação com o meio ambiente	36
1.9 Micobactérias não tuberculosas (MNT)	38
2. OBJETIVOS	42
2.1 Geral	42
2.2 Específicos	42
3. METODOLOGIA	43
3.1 Tipo de estudo	43
3.2 Caracterização da área de estudo	43
3.3 Coleta das amostras	46
3.4 Avaliação das condições ambientais	49
3.5 Identificação do <i>M. leprae</i> nas amostras de água	50
3.5.1 Extração de ácidos nucleicos total de <i>M. leprae</i> das amostras de água	50
3.5.2 Amplificação dos ácidos nucleicos	51
3.5.2.1 Amplificação do DNA de <i>M. leprae</i>	53
3.5.2.2 Amplificação com Transcriptase Reversa do RNAm de <i>M. leprae</i>	54
3.5.2.3 Visualização dos resultados	55
3.5.3 Sequenciamento do produto amplificado	56
3.6 Características dos pacientes com hanseníase do peridomicílio dos locais de coleta no município de Sobral	56
3.7 Identificação de micobactérias não tuberculosas	56
3.7.1 Pesquisa de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) e Gram	57

3.7.2	Descontaminação e cultivo das amostras	57
3.7.3	Coloração das colônias cultivadas em ágar <i>Lowestein-Jensen</i>	60
3.7.4	Extração do DNA a partir das colônias cultivadas em <i>Lowestein-Jensen</i>	60
3.7.5	Amplificação da região <i>hsp65</i> do DNA de <i>Mycobacterium sp.</i>	61
3.7.6	Digestão enzimática do produto de 141 pb do gene <i>hsp65</i> de <i>mycobacterium sp.</i>	63
3.8	Análise dos dados	65
4.	RESULTADOS	66
4.1	Presença de ácidos nucleicos de <i>M. leprae</i> nas amostras analisadas	66
4.2	Confirmação dos ácidos nucleicos de <i>M. leprae</i> por sequenciamento	73
4.3	Condições ambientais dos locais de coletas com a positividade dos ácidos nucleicos	78
4.4	Características dos pacientes com hanseníase no município de Sobral e sua relação com a detecção de <i>M. leprae</i> nas amostras de água	80
4.5	Identificação de micobactérias não tuberculosas	83
4.5.1	Análise das lâminas de sedimento	83
5.	DISCUSSÃO	93
6.	CONCLUSÃO	113
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICES	
	ANEXOS	

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica infectocontagiosa, granulomatosa, de evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae* (LAVANIA *et al.*, 2008) (bacilo de Hansen), descoberto e descrito por Gerhard H. A. Hansen, em 1873, em Bergen, na Noruega (MACIEL *et al.*, 2003). A bactéria compromete principalmente a pele, os nervos periféricos e, ocasionalmente, outros órgãos e sistemas (LAVANIA *et al.*, 2008). Tem o homem como principal fonte de infecção e mais importante reservatório. Além deste, estudos sugerem que alguns animais e a água possam ser reservatórios ambientais (KERR-PONTES, 2004; MATSUOKA, 1999, MEYERS, 1991). A hanseníase é considerada doença endêmica no Brasil, onde registra uma prevalência acima do esperado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012).

O *M. leprae*, que pertence ao gênero *Mycobacterium*, consiste em um bacilo reto ou levemente curvo, podendo ser encontrado isolado ou em aglomerado, unido por uma substância denominada gleia. É um parasita intracelular obrigatório imóvel, que sobrevive em macrófagos e células de Schwann, tendo por predileção a epiderme e o sistema nervoso periférico. O *M. leprae* representa a única espécie do gênero que não pode ser cultivado *in vitro* sendo-o em modelos animais, como o tatu e em patas de camundongos (TRUMAN *et al.* 1986; KRAHENBUHL *et al.* 2000; ARAUJO, 2003). É um bacilo resistente à descoloração álcool-ácido (BAAR positivo), pois retém a fucsina básica na parede celular, corando-se em vermelho pela técnica de Ziehl- Neelsen (GOULART, 2002; SOUZA *et al.*, 2007).

A hanseníase parece ser uma das mais antigas doenças que acometem o homem. As referências mais remotas datam de 600 a.C. e procedem da Ásia, que, juntamente com a África, podem ser consideradas berços da doença. A melhoria das condições de vida e o avanço do conhecimento científico modificaram significativamente o quadro da hanseníase, que atualmente tem tratamento e cura. No Brasil, cerca de 47.000 casos novos são detectados a cada ano, sendo 8% deles em menores de 15 anos (BRASIL, 2010).

De acordo com a OMS, o controle da hanseníase tem melhorado significativamente na maioria dos países endêmicos, porém, o diagnóstico de casos novos continua a ocorrer (WHO, 2010; 2012).

A hanseníase no Brasil registra uma prevalência acima do esperado pela OMS, sendo considerada um problema de saúde pública, principalmente nas regiões, Norte, Centro-Oeste e Nordeste. No Ceará, a doença é considerada endêmica, apesar dos esforços há

décadas desenvolvidos pela área operacional e epidemiológica da Secretaria Estadual da Saúde e secretarias municipais do Estado. Em 2011 foram diagnosticados 2.003 casos novos, alcançando um coeficiente de detecção geral de 23,7/100.000 habitantes (WHO, 2012; BRASIL, 2012; CEARÁ, 2012).

A transmissão da hanseníase ocorre principalmente entre humanos, especialmente com origem em um caso multibacilar (MB). Observações epidemiológicas e microbiológicas indicam que fontes ambientais também podem representar importante papel na infecção do *M. leprae* e na transmissão da doença (MATSUOKA *et al.*, 1999). Estudos mostram que, mesmo em áreas endêmicas, em grande parte dos casos, não se reconhece nenhuma história de contato com pacientes, o que poderia sugerir a participação de outros fatores (FINE *et al.*, 1997).

Com efeito, este estudo pretende contribuir para o conhecimento pioneiro da “transmissão da hanseníase” em fontes ambientais, detectando a presença e a viabilidade do bacilo encontrado em águas de municípios do Estado do Ceará, águas estas empregadas para consumo humano, desde o uso para banhos até a lavagem de alimentos, bem como para beber. Desta forma, pretende-se contribuir com o controle da hanseníase que ainda representa importante problema de saúde pública no Ceará e em várias outras regiões do Brasil e do Mundo. Adicionalmente, este estudo pretende mediante o cultivo em meio Lowestein-Jensen (L-J), identificar micobactérias não tuberculosas (MNT) ambientais presentes nas amostras de água analisadas.

1.1 O gênero *Mycobacterium*

A família Mycobacteriaceae compreende um grupo de organismos heterogêneos em relação ao metabolismo, crescimento, nicho ambiental, epidemiologia, patogenicidade, distribuição geográfica e associação com doenças (CHIMARA *et al.*, 2008). O gênero *Mycobacterium*, único representante dessa família, foi denominado em 1896 por Lehmann e Neumann para agrupar os agentes etiológicos da hanseníase e tuberculose, descritos anteriormente por Gerhard H. Armauer Hansen e Robert Koch (SOUZA, 1993).

A classificação das bactérias no gênero *Mycobacterium*, baseia-se na capacidade de resistir à descoloração, quando tratado com solução álcool-ácida; na produção de ácidos micólicos com cadeias carbônicas longas contendo 60 a 90 carbonos, clivados por pirólise, e

no alto teor de citosina e guanina (G+C) no seu genoma, variando entre 61 e 71 mol% (com exceção de *M. leprae*, que tem de 54-57 mol%) (LEVY-FRÉBAUT & PORTAELS, 1992; RODRIGUES, 2012). Atualmente, sabe-se da existência de 157 espécies e 13 subespécies de micobactérias (EUZÉBY, 2012).

As micobacterias são descritas por bacilos aeróbios, não formadores de esporos, imóveis, que medem 0,2 a 0,6 µm x 1 a 10 µm. Possuem parede celular rica em lipídios, composta por uma membrana citoplasmática interna revestida por uma espessa camada de peptidoglicano, sem membrana externa. O esqueleto peptidoglicano está covalentemente ligado a polissacarídeos (arabinogalactano), cujas extremidades são esterificadas a ácidos micólicos de alto peso molecular. Essa camada é revestida por polipeptídios e por uma camada hidrofóbica de ácidos micólicos altamente antigênica, constituída por lipídios, glicolipídios e glicolipopeptídios livres (VISSA *et al.*, 2001). Esses lipídios constituem 60% do peso seco da parede celular. As cadeias peptídicas na membrana externa constituem antígenos biologicamente importantes, estimulando a resposta imunológica celular do hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2004; ZUBER, 2008).

Em razão dessa complexa parede celular, a maioria cresce lentamente, dividindo-se a cada 12 - 24 horas, sendo responsável também por muitas outras propriedades dessas bactérias como resistência aos antibióticos antibacterianos comuns, antigenicidade e agregação (COLE *et al.*, 2001; WALKER *et al.*, 2006; MURRAY *et al.*, 2004). Uma vez corados com fucsina os bacilos não podem ser descorados com soluções ácidas; daí a denominação bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) (MURRAY *et al.*, 2004).

Apesar do grande número de espécies de micobactérias, poucas espécies ou grupos costumam causar infecções nos seres humanos: *M. tuberculosis*, *M. leprae*, complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* (MURRAY *et al.*, 2004). Mesmo com a variação de aspectos clínicos de cepas virulentas de micobactérias, todas são patógenos intracelulares transmitidos principalmente pelas vias respiratórias e exprimem a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos (VISSA *et al.*, 2001). O número de anticorpos ativos contra essas espécies de bactérias é o mesmo, indicando similaridades na composição proteica e na arquitetura básica da parede celular (VISSA *et al.*, 2001; BELISLE *et al.*, 2000).

O *M. leprae* é a única espécie do gênero que não pode ser cultivado *in vitro* e, portanto, como já se adiantou, é cultivado em modelos animais, como o tatu e em patas de camundongos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Quanto ao tempo requerido para crescimento com aparecimento de colônias em meio de cultura sólido, as espécies de micobactérias podem ser consideradas Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR), quando sob condições ótimas de temperatura e nutrientes produzem colônias visíveis em um período de até sete dias, ou Micobactérias de Crescimento Lento (MCL), quando necessitam de um período superior a sete dias para fazer o mesmo (GOODFELLOW & MAGEE, 1998; PRIMM *et al.*, 2004).

1.2 Mycobacterium leprae

O *M. leprae*, agente causador da hanseníase, é um patógeno intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos e células de Schwann (MS, 2010). É um bastonete imóvel, não formador de esporos, microaerófilo reto ou levemente curvo (SCOLLARD *et al.*, 2006), composto por uma parede celular altamente rica em lipídios, constituída por ligações covalentes entre peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, semelhante na composição à parede celular de todas as micobactérias (BARCKER, 2006). Cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool-ácido, sendo, portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (MS, 2010).

O glicopeptídeo fenólico 1 (PGL 1) é o componente lipídico antigênico presente em maior concentração na parede celular, sendo responsável pelo mecanismo de escape do bacilo ante os reativos intermediários de oxigênio produzidos pelos macrófagos e pela capacidade de interação do bacilo com as células de Schwann conferindo ao *M. leprae* especificidade imunológica (SANTOS *et al.*, 2005, SCOLLARD *et al.*, 2006).

Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos são vistos isolados, em agrupamentos variados ou em arranjos especiais denominados globias, peculiares do *M. leprae*, que resultam da união de bacilos por intermédio de uma substância chamada gleia (GOULART *et al.*, 2002). Esta micobactéria exprime um tempo de geração bastante longo com baixas frequências de mutações que limitam a diversidade genética da espécie (SASAKI, *et al.*, 2001; BRITTON & LOCKWOOD 2004).

A temperatura ideal para a reprodução do *M. leprae* está entre 27° e 33°C, o que explica sua predileção por áreas mais frias do corpo, como a pele, os nervos periféricos e a mucosa das vias aéreas superiores. Na pele, o bacilo encontra-se preferencialmente nos macrófagos, enquanto no tecido neural localiza-se nas células de Schwann, onde pode

permanecer por longo tempo sem manifestar uma resposta imunológica (CONCHA *et al.*, 2008).

O genoma do *M. leprae* foi completamente sequenciado em 2001, quando foi analisado comparativamente ao genoma completo do *M. leprae* obtido de tatu com o genoma de *M. tuberculosis* H37Rv de 4.411.529 pb, o qual potencialmente pode codificar 3.924 proteínas (COLE *et al.*, 1998; SCOLLARD *et al.*, 2006). Observou-se que houve uma perda maciça de genes durante a evolução por parte de *M. leprae*, que possui um genoma com 3.268.203 pb e um conteúdo de citosina + guanosina de 57,8%; notou-se que somente 49,5% (1.604 genes) do genoma contêm genes que codificam proteínas, sendo o restante constituído de pseudogenes ou genes degenerados. 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 as vias de síntese, principalmente dos componentes da parede celular, permanecem praticamente intactos (COLE *et al.*, 2001; VISSA & BRENNAN, 2001; SCOLLARD *et al.*, 2006).

A combinação da grande quantidade de pseudogenes (1.116) e da redução do genoma pode 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; ARAÓZ *et al.*, 2006; VISSA & BRENNAN, 2001; SCOLLARD *et al.*, 2006).

O homem é considerado como o único reservatório natural do bacilo, apesar de haver relato de animais selvagens naturalmente infectados, como tatus e macacos (ARAÚJO, 2003; HASTINGS, 1988). As vias aéreas superiores representam a principal entrada e via de eliminação do bacilo. Soluções de continuidade na pele também podem ser portas de entrada da infecção. As secreções orgânicas, como leite, esperma, suor e secreção vaginal podem eliminar o bacilo, mas não possuem importância na disseminação da infecção (VAN BEERS *et al.*, 1996). O antígeno glicolípido fenólico-1 (PGL1) é específico do *M. leprae* e leva à formação de anticorpos das classes IgG e IgM. Existem estudos que procuram estabelecer uma relação entre a positividade ao antígeno PGL-1 e o risco de desenvolver a doença (BARROS *et al.*, 2000; VAN BEERS *et al.*, 1996; BÜHRER-SÉKULA, 2001; MOURA, 2008; FROTA, 2010; BAZAN-FURINI, 2011; STEFANI, 2012).

1.3 Classificação clínica da hanseníase

A hanseníase é uma doença que pode evoluir de maneiras diversas, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Expressa uma variação na apresentação clínica, classificada de acordo com os parâmetros imunopatológicos e de carga bacilar (BRASIL, 2010) que podem ser categorizadas segundo: a) Classificação de Madri (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953 *apud* SOUZA, 1997), b) Classificação de Ridley & Jopling (RIDLEY E 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, tuberculoide 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: clínico, bacteriológico, imunológico e histológico (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953 *apud* SOUZA, 1997).

Em 1966, Ridley e Jopling introduziram um sistema de classificação da doença baseado em achados histopatológicos e na resposta imune, estabelecendo cinco grupos - dois polares e três intermediários, classificando-os em polo tuberculoide- tuberculoide (TT), podendo permanecer limitado ou evoluir para formas disseminadas ou intermediárias da doença, que constituem o grupo *boderline*, e em pólo lepromatoso-lepromatoso (LL). O grupo *boderline* se subdivide em *boderline*-tuberculoide (BT), *boderline*-dimorfo (BD) ou *boderline*-lepromatoso (BL), de acordo com a evolução da doença (RIDLEY & JOPLING, 1966).

A aplicação da taxonomia de Ridley e Jopling na prática da clínica mostrou-se difícil e demorada, retardando o início da terapêutica, fazendo com que, em 1988, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerisse apenas duas formas clínicas - paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) - em concordância com o índice baciloscópico e pelo número de lesões (BRASIL, 2002). De acordo com esta, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil classificou a hanseníase para fins operacionais de tratamento quimioterápico imediato em: paucibacilar (PB), aqueles com até cinco lesões e/ou apenas um tronco nervoso acometido e multibacilar (MB), os com mais de cinco lesões e/ou mais de um tronco nervoso acometido. A baciloscopia positiva classifica o paciente como multibacilar, independentemente do número de lesões (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2002).

1.4 Resposta do hospedeiro ao *M. leprae*

A hanseníase é uma doença que pode evoluir de várias maneiras, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro (RODRIGUES E LOCKWOOD, 2011). A resposta imune pode ser dividida esquematicamente em inata e adquirida. Uma resposta imune inata efetiva, em combinação com a baixa virulência do *M. leprae*, está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase (SCOLLARD *et al.*, 2006).

As células da primeira linha de defesa da resposta imune, os monócitos e macrófagos, reconhecem as lipoproteínas de membrana de *M. leprae* por meio do heterodímero de receptores *toll-like* (TLR) 2/1. Após o reconhecimento dos antígenos de superfície da micobactéria, os monócitos se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas, que são estimulados a transcrever vários genes relacionados à produção de citocinas, como TNF- α e IL-12, os quais exercem importante papel na definição da resposta imune secundária (WALKER & LOCKWOOD, 2006; MODLIN, 2010).

Assim sendo, os diferentes polos da doença são resultados de diferentes desempenhos dos linfócitos T *helper* em função do ambiente de citocinas gerado. Após a mostra de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos aos linfócitos CD4⁺ *naives*, a resposta imunológica secundária pode seguir por caminhos distintos: resposta humoral, resposta celular ou uma combinação delas (SCOLLARD *et al.*, 2006).

O polo tuberculoide resulta da diferenciação das células T *helper* no tipo Th1. Os linfócitos Th1 irão estimular a resposta celular mediante a produção de INF- γ , o qual promove a ativação dos macrófagos e aumenta a produção de ROI (intermediários reativos do oxigênio) e de reativos de nitrogênio, levando a uma capacidade maior de eliminar as micobactérias do organismo. Os macrófagos, por sua vez, liberam IL-12, estimulando a atividade citotóxica dos linfócitos *Natural Killer* (NK). Além disso, a produção de IL-2 conduz a uma expansão clonal do linfócito Th1. Como resultado desse processo, os pacientes desse extremo exibem poucas lesões cutâneas e exame histológico revelando granulomas com raros BAAR. Ocorre predomínio do fenótipo HLA-DR2 e DR3 nesse tipo de manifestação clínica (GOULART *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005).

Os granulomas são estruturas formadas ao redor dos bacilos como forma de isolá-los e controlar o avanço da doença, estando presentes durante toda a extensão da derme, podendo atingir até a camada basal da epiderme. No interior do granuloma, há bactérias vivas e restos celulares cercados por macrófagos ativados com citoplasma aumentado, chamados de

células epiteloideas; além de linfócitos CD4⁺ e células multinucleadas gigantes (GOULART *et al.*, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008).

Nos pacientes com a forma lepromatosa, há predomínio do fenótipo HLA-DQ1 e o linfócito T *helper* se diferencia em Th2, responsável pela estimulação da resposta humoral. As citocinas produzidas são: IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10. A IL-4 estimula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos anti- PGL1, o que explica os altos níveis de anticorpos nesses pacientes. Essa citocina também leva a um efeito imunorregulatório negativo sobre a imunidade celular, impedindo as ações antibacterianas. IL-10 também está relacionada com a incapacidade dos hospedeiros de eliminarem os bacilos do organismo. Dessa forma, ocorrem supressão macrofágica, aumento dos títulos de anticorpos e ausência de granulomas (FOSS, 1997; SANTOS *et al.*, 2005). Os macrófagos contendo bacilos contêm citoplasma espumoso e vacuolar, com degeneração lipídica, denominados células de Virchow (BEIGUELMAN, 2002; DE MATTOS *et al.*, 2012).

1.5 Diagnóstico da hanseníase e identificação molecular do bacilo de Hansen

A identificação definitiva do *M. leprae* é na maioria das vezes difícil, uma vez que o organismo não é cultivável (SCOLLARD *et al.* 2006). O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, realizado por meio da análise da história e das condições de vida do paciente, sendo confirmada pela baciloscopia. Dessa maneira, um paciente pode ser diagnosticado com hanseníase quando apresentar uma ou mais de uma das seguintes características: lesão de pele com alteração de sensibilidade, acometimento de nervo com espessamento neural e baciloscopia positiva (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2010).

O diagnóstico precoce da hanseníase é um fator fundamental para o combate eficaz da doença, pois diagnóstico tardio conduz à continuidade da transmissão e ao crescimento do risco de provocar incapacidades físicas e deformidades. Essas deformidades podem incapacitar em atividades laborais, limitar a vida social e ensejar problemas psicológicos, sendo altamente responsáveis, também, pelo estigma e preconceito contra a doença (VISSCHEDIJK *et al.*, 2000; RODRIGUES E LOCKWOOD, 2011).

Durante a anamnese do paciente, procura-se qualquer indicio de sinais e sintomas da doença, além de possíveis vínculos epidemiológicos. Normalmente, os pacientes com hanseníase se queixam acerca 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, orelha, braços, pernas, costas e 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 e 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. Os raspados de tecido dérmico dos lóbulos auriculares, cotovelos e de lesão suspeita são corados por Ziehl-Neelsen a 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 D. S. Ridley que vai de 0 a 6+. Os pacientes com baciloscopia negativa se encontram no extremo tuberculóide, enquanto que a forma lepromatosa e algumas variações de *boderline* apresentam baciloscopia fortemente positiva. O exame histopatológico pode ser necessário em casos de dúvida diagnóstica ou para esclarecer classificação da forma clínica (BAPTISTA *et al.*, 2006; ARAÚJO, 2003; SANTOS *et al.*, 2005).

A baciloscopia mostra-se, porém, 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; MARTINEZET *et al.*, 2009).

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 mitsudina, uma suspensão esterilizada de bacilos de Hansen mortos pelo calor. A leitura do teste é realizada em 28 dias, na qual se observa a formação de um nódulo no local da aplicação intradérmica. Esse teste tem o propósito de avaliar a imunidade celular tardia, na qual uma infiltração franca, pápula ou nódulo de mais de três milímetros de diâmetro, é denominada reação positiva, presente em indivíduos com hanseníase tuberculóide (BEIGUELMAN, 2002; SCOLLARD *et al.*, 2006).

O antígeno PGL 1 está presente na parede celular de *M. leprae*. Esse antígeno é específico para o bacilo de Hansen, levando à formação de anticorpos das classes IgG e IgM. Nos estudos sorológicos, no entanto, se pesquisam os títulos de IgM por estarem correlacionados com a forma clínica e a atividade da doença. 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; BAZAN-FURINI, 2011). Por outro lado, na hanseníase tuberculoide não há resposta expressiva desses anticorpos (BARROS *et al.*, 2000; BAZAN-FURINI, 2011).

Diagnóstico molecular da hanseníase

Estudo do DNA utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizado para o diagnóstico molecular do *M. leprae*, pois esta permite detectar a presença do bacilo, mesmo que este esteja em baixo número (MATSUOKA *et al.*, 1999). Estes ensaios baseiam-se na amplificação de sequências específicas do genoma do *M. leprae*. Essas técnicas, entretanto, apesar de serem altamente específicas e sensíveis, não são utilizadas rotineiramente (SCOLLARD *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da PCR representou oportunidade para uma detecção sensível, específica e rápida do *M. leprae* (YOON *et al.*, 1993). Na literatura existem várias sequências-alvo para PCR e sondas específicas de DNA para *M. leprae* como os genes codificadores do antígeno 36-kDa (YOON *et al.*, 1993; WIT *et al.*, 1991), antígeno 18-kDa (YOON *et al.*, 1993; WILLIAMS *et al.*, 1990), antígeno 65-kDa (YOON *et al.*, 1993; PLIKAYTIS *et al.*, 1990), 16S rRNA (KURABACHEW, 1998) e sequências repetitivas do *M. leprae* - RLEP (DONOGUE, 2001; YOON *et al.*, 1993; WOODS *et al.*, 1990). A PCR fornece 100% de especificidade na detecção de organismos em amostras clínicas (YOON *et al.*, 1993; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Vários autores utilizam diferentes regiões do genoma do *M. leprae* no desenvolvimento de testes de PCR para a detecção do bacilo causador da hanseníase e isso resulta em ampliações relativamente grandes (320-530 pb) quando comparadas com aquelas usadas rotineiramente para a detecção de *M. tuberculosis* (123 pb) (EISENACH *et al.*, 1990; SCOLLARD *et al.*, 2006).

O gene *gyrA* codifica para a produção da cadeia A da topoisomerase, a qual se encarrega da ruptura da cadeia dupla do DNA e sua posterior junção com finalidade de evitar as supertorções geradas no DNA circular da bactéria durante as atividades de replicação, transcrição e tradução (SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS). Esse gene é altamente utilizado na avaliação de resistência bacteriana às drogas, por exemplo, resistência a quinolonas em algumas espécies bacterianas e resistência do *M. leprae* à ofloxacina (FSIHI *et al.*, 1996; MAEDA *et al.*, 2001; WILLIAMS E GILLIS, 2004).

O DNA micobacteriano é mais preservado do que o de outros organismos em razão de sua parede celular rica em lipídios hidrofóbicos, sendo ainda a parede celular do *M. leprae* mais espessa do que a do *M. tuberculosis*, dando maior proteção ao DNA microbiano. Isso torna possível a detecção do DNA do *M. leprae* em pacientes submetidos a terapias antibacterianas ou em materiais coletados há muitos dias ou até mesmo anos (DONOGHUE *et al.*, 2001).

A PCR mostra-se uma técnica sensível e específica para a identificação de *M. leprae*, assumindo grande importância no diagnóstico da hanseníase, principalmente na forma PB e nos contactantes (GOULART, 2007; YOUNG, 2004). Sequências-alvo para a amplificação do DNA de *M. leprae*, como os genes que codificam as proteínas de 65, 36 e 18kDa, e sequências repetitivas são as mais utilizadas para o diagnóstico etiológico da hanseníase e, muitas vezes, têm se mostrado mais sensíveis e específicas do que o exame baciloscópico rotineiramente utilizado (GOULART, 2007; CRUZ, 2011). A detecção de *M. leprae* por PCR utilizando iniciadores para a sequência de RLEP é mais sensível e específica do que a PCR com os iniciadores do gene da proteína 18-kDa, especialmente quando baixos níveis de DNA estão presentes (KANG, 2003). Inúmeras são os tipos de amostras que podem ser utilizados para detecção de *M. leprae* por PCR, incluindo linfa, sangue, pele e biópsia de nervo, bulbos capilares, secreção nasal (SANTOS *et al.*, 1999) e amostras ambientais (MATSUOKA *et al.*, 1999, LAVANIA, 2008).

Quanto à pesquisa da viabilidade do *M. leprae*, a avaliação da presença de RNA por PCR com transcrição reversa (RT-PCR) é mais vantajosa do que a pesquisa de DNA (SCOLLARD *et al.*, 2006). O DNA detectado nas amplificações pode ser proveniente tanto de bacilos vivos quanto mortos, ou ainda como DNA extracelular (MISKIN *et al.*, 1999). Portanto, o uso isolado da pesquisa de DNA não seria adequado para distinguir entre bactérias vivas e mortas. Trabalhos anteriores já demonstraram a detecção de DNA bacteriano após as células terem sido mortas por aquecimento e exposição à luz ultravioleta (SHERIDAN *et al.*, 1998; BIRCH *et al.*, 2001).

Enquanto isso, o RNA é altamente instável e facilmente degradado após a morte celular. Em estudo realizado por Darnell e colaboradores ficou comprovado que a meia-vida do RNAm é de apenas alguns minutos em decorrência da atividade metabólica das células vivas ou da destruição pós-morte celular (DARNELL, 1986 *apud* MISKIN *et al.*, 1999). Assim, percebe-se a maior representatividade da detecção da presença do RNAm nas análises da viabilidade celular (BIRCH *et al.*, 2001).

1.6 Epidemiologia da hanseníase

De acordo com relatórios oficiais recebidos de 105 países e territórios, a prevalência global registrada da hanseníase no início de 2012 situou-se em 181 941 casos. O número de casos detectados durante 2011 foi de 219.075, em comparação com 228 .474 em 2010 (WHO, 2012).

De acordo com a OMS, no início de 2012, 105 países submeteram relatórios à OMS. Destes, 28 foram da região africana, 28 da região da Américas, 11 da região sul do leste da Ásia, 22 da região leste do Mediterrâneo e 16 da região do Pacífico Ocidental. Esses dados serviram de base para os cálculos utilizados pelo Departamento das Nações Unidas de Assuntos Econômicos e Sociais – Divisão Populacional, até o início de 2011 (WHO, 2012).

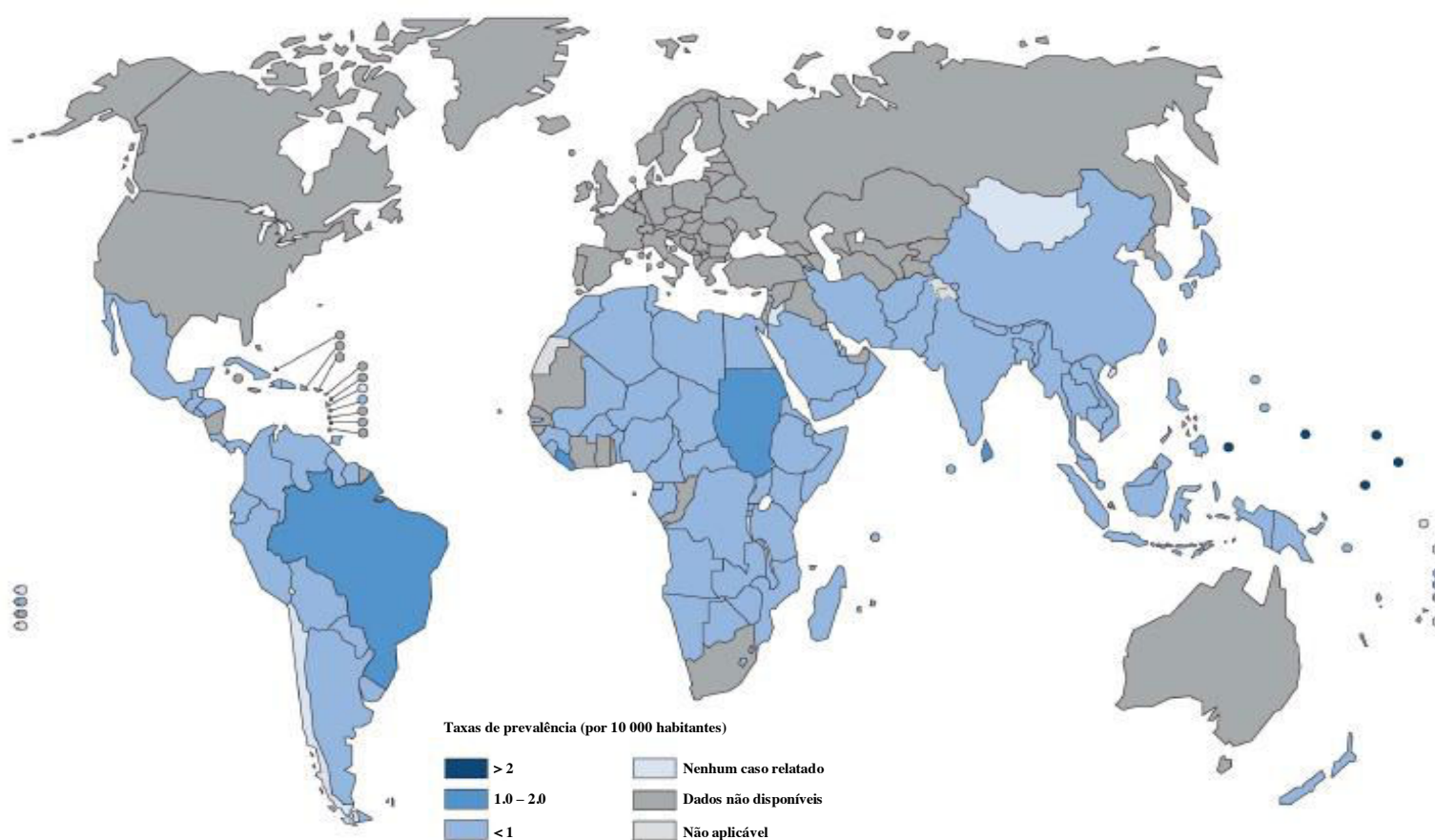
Assim, os números oficiais mostram que quase 182.000 pessoas, principalmente na Ásia e África, foram afetadas no início de 2012, com cerca de 219.000 casos novos reportados em 2011 (WHO, 2012).

A maioria dos países que anteriormente eram altamente endêmicos para a hanseníase, tem conseguido eliminação, no plano nacional, e estão intensificando seus esforços nos contextos regional e distrital. Durante 2007 até o final de 2010, as Repúblicas Democrática do Congo e de Moçambique atingiram eliminação no âmbito nacional e se juntaram ao Timor-Leste. A alta endemicidade, no entanto, ainda permanece com focos em alguns países: Angola, Brasil, República do Centro Africana, Índia, Madagáscar, Nepal e República Unida da Tanzânia e em países anteriormente altamente endêmicos (>2/10 000 habitantes), como as Repúblicas Democrática do Congo e de Moçambique (WHO, 2012).

A hanseníase no Brasil registra uma prevalência acima do esperado pela OMS, sendo considerado um país endêmico, com taxas de prevalência 1.0 – 2.0/10.000 habitantes (FIGURA 1) (WHO, 2012). O Brasil é, portanto, responsável por 90% dos casos no

Continente Americano e o segundo país em número absoluto e em incidência, registrando em torno de 47.000 casos novos por ano, sendo superado apenas pela Índia (WHO, 2012; MACHADO, 2008; BRASIL, 2010). As regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste, concentram aproximadamente 55% dos casos de hanseníase detectados no Brasil em apenas 17,5% da população (BRASIL, 2010), índices estes distribuídos, principalmente, em áreas consideradas hiperendêmicas, como Mato Grosso, Tocantins, Rondônia, Maranhão e Roraima (BRASIL, 2008; 2010).

Figura 1 - Taxas de prevalência da hanseníase no mundo.



Fonte: WHO- Leprosy: global situation (prevalence of leprosy at start of 2011)

Apesar dos esforços governamentais, a hanseníase ainda representa um importante problema de saúde pública no Brasil. Segundo a OMS, a hanseníase deixa de constituir um problema de saúde pública, quando o País alcança um índice de prevalência (P) menor do que 1/10.000 habitantes. Considerando as definições de registro ativo adotado pelo Ministério da

Saúde desde 2004, o Brasil teve pouco a comemorar em relação ao coeficiente de P alcançado em 2011 de 1,54/10.000, um percentual de redução de 9,94 em relação a 2004 e de 11,1 em relação à média do período 2004-2011 (IGNNOTI, 2011; BRASIL, 2012; SBH, 2012; DATASUS, 2012).

Por outro lado, outros dados são alarmantes como coeficientes de detecção na população geral e em menores que 15 anos, considerado ainda de alta endemia em 2011, atingindo 17,65 e 5,22/100.000 habitantes, respectivamente. Mesmo considerando uma redução de 37,5% e 32% para esses respectivos coeficientes em 2011 em relação a 2004, ambos foram alvos de redução mais modesto quando relacionados à média do período, atingindo apenas 19,7% e 15,1%, respectivamente, alcançando valores de 22 e 6,2/100.000 habitantes e consequente classificação de muito alta endemia com número absoluto de casos de 41.161, em média, para o período. Dentre esses, 3130 casos novos foram documentados em pacientes menores de 15 anos, correspondendo a 7,6% dos casos de hanseníase diagnosticados (BRASIL, 2012; SBH, 2012).

Considerando que em 2004 o número de casos novos em menores que 15 anos correspondia a 8,1% dos casos novos na população geral, pouco se progrediu em 2011, com 7,6%, redução de 6,2%, entretanto mantendo o total inalterado em relação à média do período (7,6%). Todos esses fatores se consolidam como alarmantes, quando se consideram as características próprias da doença, como período de incubação longo, transmissibilidade por via respiratória e, principalmente, entre comunicantes intradomiciliares (BRASIL, 2012; SBH, 2012).

Trata-se de uma situação crítica, que necessita de análise cuidadosa para uma intervenção eficaz. A distribuição da hanseníase no Brasil é heterogênea e reproduz as desigualdades socioeconômicas entre as diferentes regiões do País. Em outras palavras, a distribuição da doença confirma que os fatores econômicos, sociais e culturais auxiliam na sua propagação, principalmente quando associados as más condições sanitárias e ao baixo grau de escolaridade da população (KERR-PONTES, 2004; CORRÊA *et al.*, 2012; LANA *et al.*, 2007). Além da heterogeneidade inter-regional, existem ainda as diferenças intermunicipais na detecção da hanseníase, também consideradas elevadas no Brasil. Características específicas como a potencialidade do diagnóstico, a situação territorial associada a fatores de risco, acesso aos serviços de saúde e migrações populares, principalmente em municípios com população menor do que 10.000 habitantes, seriam responsáveis pela elevada heterogeneidade (CORRÊA *et al.*, 2012).

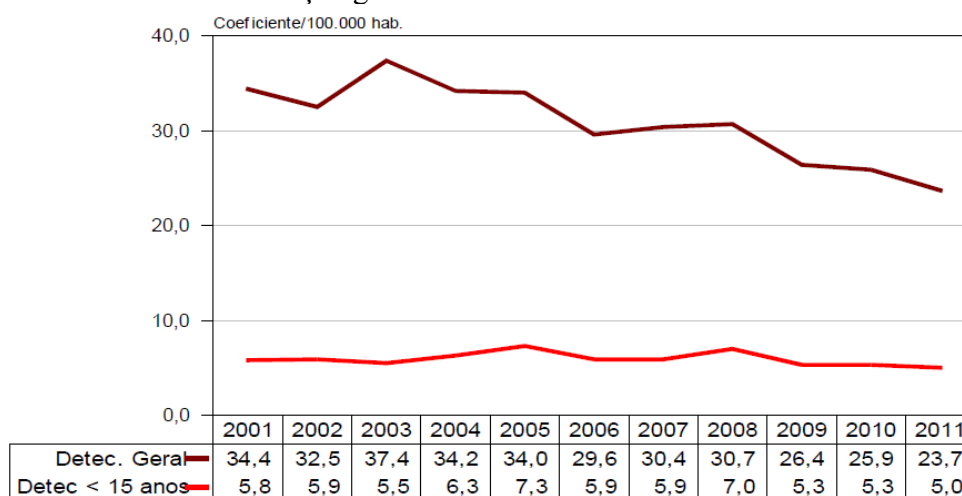
Em 2011, o Ministério da Saúde evidenciou que as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste obtiveram um coeficiente de incidência muito alto e um coeficiente de prevalência médio, enquanto que nas regiões Sul e Sudeste, esses índices foram considerados médio e baixo, respectivamente. Alguns autores descrevem uma “endemia oculta”, destacando aspectos precários do controle da doença, como busca ativa pouco efetiva em áreas de grande concentração da doença, diagnósticos tardios, deficiência nos programas público-assistenciais, precariedade dos serviços de saúde, abandono do tratamento e baixo nível de esclarecimento da população (MIRANZI *et al.*, 2010).

Assim, para o controle efetivo da doença, especialmente em áreas endêmicas, é necessário que periodicamente a base de dados oficiais seja analisada, com apontamentos dos aspectos epidemiológicos e críticas sobre a qualidade da coleta dos dados, como campos em branco, duplicidade de registros e incoerência nas informações (BRASIL, 2007).

O Ceará apresentou, no ano de 2011, 2.003 casos novos diagnosticados, alcançando um coeficiente de detecção geral de 23,7/100.000 habitantes, que, segundo o Ministério da Saúde, ainda é considerado “muito alto”, classificando-o em 13º lugar na posição nacional e em 4º lugar no Nordeste, constituindo, assim, um sério problema de saúde pública (CEARÁ, 2012).

Este Estado expressa uma significativa queda no coeficiente de detecção geral no período de 2001 a 2011, porém registrou ocorrência da doença em menores de 15 anos, demonstrando a existência de focos de transmissão ativos de hanseníase (Figura 2) (CEARÁ, 2012).

Figura 2 - Coeficiente de detecção geral de casos de hanseníase e em menores de 15 anos.



Fonte: Informe Epidemiológico de Hanseníase, Secretária de Saúde do Estado do Ceará. Ceará, 2001 a 2011.

Os municípios de Juazeiro do Norte e de Sobral apresentaram altos índices de hanseníase com 95 e 85 casos novos detectados, respectivamente, em 2011. Dessa forma, essas cidades representam o segundo e o terceiro municípios em número de casos novos no Estado do Ceará, sendo superados apenas pela capital, Fortaleza (CEARÁ, 2012). Além disso, três dos quatro municípios participantes do estudo, figuram entre os seis municípios cearenses que iriam receber incentivo financeiro adicional de R\$ 780 mil no ano de 2012 do Ministério da Saúde para ampliar as ações contra a hanseníase (BRASIL, 2012; SAÚDE, 2012).

Assim, numa análise crítica sobre a hanseníase no Brasil, observou-se que, embora a descentralização da assistência ao paciente com hanseníase tenha significado uma grande conquista quanto à facilidade de acesso aos serviços de saúde, os dados nos alertam quanto à necessidade de maior preparo técnico dos profissionais, melhorando assim, a acuidade diagnóstica para doença tão complexa, principalmente para suas formas mais precoces (BRASIL, 2012; SBH, 2012).

1.7 Transmissão

O modo exato de transmissão da hanseníase não é completamente conhecido. Acredita-se que a transmissão ocorra em decorrência da descarga de gotículas com bacilos a partir das vias aéreas superiores e em menor “quantidade” pelo contato direto com uma pessoa infectada com a forma MB sem tratamento (LAVANIA *et al.*, 2008). Os doentes PB, não são considerados importantes como fonte de transmissão da doença, em razão da baixa carga bacilar. Assim, os pacientes MB não tratados provavelmente constituem o grupo contagiante, implicando na transmissão da doença. (BRASIL, 2010).

O *M. leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, infecta um grande número de indivíduos, no entanto poucos adoecem. Essas propriedades não existem em virtude apenas de suas características intrínsecas, mas que dependem, sobretudo, de sua relação com o hospedeiro e o grau de endemicidade do meio, entre outros aspectos (BACKER *et al.*, 2004).

O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão da doença, em decorrência do fato de que os contatos intra-domiciliares de um paciente MB têm um risco estimado de 5 a 17 vezes maior de desenvolver hanseníase do que a população em geral

(FINE *et al.*, 1997; VAN BEERS *et al* 1996; BACKER *et al*, 2004), embora ainda existam lacunas de conhecimento quanto aos prováveis fatores de risco implicados, especialmente aqueles relacionados ao ambiente social (BRASIL, 2010).

Estudos também sugerem fatores ambientais como possíveis fontes de infecção. Há relatos de isolamento de *M. leprae* do meio ambiente, que tem sido conhecido por sobreviver durante um longo período nas condições do solo (DESIKAN *et al*, 1977; 1995). Presença de DNA de *M. leprae* foi relatada em amostras de água na Indonésia, em áreas de alta prevalência da doença e também no solo do peridomicílio de pacientes hansenianos na Índia (MATSUOKA *et al.*, 1999; LAVANIA *et al*, 2008).

Como em outras doenças infecciosas, a conversão de infecção em doença depende de interações dos fatores individuais do hospedeiro, ambientais e do próprio *M. leprae*. Em razão do longo período de incubação, a hanseníase é menos frequente em menores de 15 anos, contudo, em áreas de maior endemicidade, a exposição precoce, em focos domiciliares, aumenta a incidência de casos nessa faixa etária (BRASIL, 2010). Van Beers e colaboradores (1996), porém, notificaram a ocorrência de casos novos da doença sem o prévio contato com hansenianos.

1.8 Hanseníase e sua relação com o ambiente

As vias e mecanismos de transmissão da hanseníase, como já citado, são mal compreendidos. Algumas das partes do enigma da transmissão da doença, no entanto, foram parcialmente definidas e apoiam hipóteses razoáveis. Por exemplo, a elevada quantidade de bacilos expelidos para o meio ambiente nas descargas nasais de pacientes (DAVEY & REES, 1974) MB são uma fonte de infecção, os quais Desikan demonstrou viabilidade detectável de *M. leprae* nestas secreções nasais (DESIKAN, 1977).

Apesar disso, até então, se acredita que somente pacientes infectados são fontes de infecção, especialmente aqueles com a forma MB da doença (MATSUOKA *et al.*, 1999). Alguns estudos, no entanto, notificaram a ocorrência de casos novos da doença sem o contato com pacientes leproso, enquanto outros observaram que não existe significativa diferença na soropositividade para o antígeno PGL-1 de *M. leprae* entre indivíduos contactantes e do local de não contactantes de casos (VAN BEERS *et al.*, 1996; FROTA *et al.*, 2010).

Existe considerável número de observações epidemiológicas e microbiológicas, as quais indicam que fontes ambientais podem representar um importante papel na infecção de *M. leprae* e na transmissão da doença (MATSUOKA *et al.*, 1999; KERR-PONTES *et al.*, 2006). Assim, o ambiente funcionaria como uma espécie de reservatório, permitindo que o bacilo permaneça infeccioso após longos períodos fora do corpo humano e, dessa forma, existam a transmissão e a contaminação continuada da enfermidade (TRUMAN & FINE, 2010).

Independentemente da via de transmissão hipotética, permanece um enigma, o fato de o *M. leprae*, um patógeno intracelular obrigatório, que é tão exigente, que não pode ser cultivado em meios artificiais, e permanecer viável e infeccioso em um ambiente inóspito (LAHIRI & KRAHENBUHL, 2008).

Outro fator presente na hipótese da contribuição do ambiente na transmissão da hanseníase encontra-se 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; 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 (LAHIRI & KRAHENBUHL, 2008).

Em 1975, Jadin descobriu que *M. leprae* era capaz de crescer dentro da *Acanthamoeba culbertsoni*. 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 de 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 formar cistos em situações de estresse ambiental, isso forneceria também proteção e resistência às bactérias fagocitadas sob temperaturas extremas e biocidas, permitindo a sobrevivência, replicação e distribuição das bactérias no ambiente (BARKER E BROWN, 1994). A interação de bactérias e amebas de vida livre permite o desenvolvimento de uma relação endossimbionte que se assemelha à patogênese das infecções crônicas bacterianas dentro de células mamíferas (YU *et al.*, 2007).

Embora os seres humanos sejam reconhecidos como os principais reservatórios da hanseníase e também principal fonte de infecção, existe longa história de estudos, provas e argumentos que indicam possíveis fontes não humanas do agente causador da doença (TRUMAN, 2010). A disseminação direta é certamente muito importante no processo de transmissão, mas também pode haver disseminação indireta (CREE *et al.*, 1998). O *M. leprae*

é capaz de sobreviver fora do corpo humano por vários meses, sob condições desfavoráveis (DESIKAN *et al.*, 1995). Várias fontes ambientais são estudadas, a fim de comprovar a contaminação indireta, e incluem solo, vegetação, água, artrópodes, tatus, macacos e amebas (TRUMAN, 2010).

Com suporte nestas observações, assume a ideia que a água usada diariamente em áreas endêmicas desempenha alguma função na transmissão do bacilo, ou, até mesmo, constitui uma fonte de infecção. Estudos mostram que as taxas de prevalência da doença entre usuários de água bacilo-positivo e bacilo-negativo para lavagem e banho foram 11,7% e 3,9%, respectivamente (MATSUOKA *et al.*, 1999). Em oposição, as taxas entre usuários de água bacilo-positivo e bacilo-negativo usada para beber e cozinhar foram 5,0% e 4,8%, respectivamente. É importante notar que essas pessoas sempre bebem a água fervida para evitar infecções gastrointestinais e, conseqüentemente, supõe-se que lavagens e banhos com a água contaminada fornecem maiores chances de infecção com o bacilo (MATSUOKA *et al.*, 1999).

Estudos mostram, todavia que, mesmo em áreas endêmicas, em grande parte dos casos, não se reconhece nenhuma história de contato com pacientes, o que poderia sugerir a participação de outros fatores (FINE *et al.*, 1997).

Aprofundar, portanto, o estudo da transmissão do *M. leprae* para propor novas abordagens e estratégias a fim de eliminar esta patologia como problema de saúde pública nas áreas em que ela se comporta de forma endêmica se faz cada vez mais necessário. O Estado do Ceará contribui de forma importante como local de realização de estudos, em relação aos aspectos anteriormente discutidos. Com efeito, este estudo exprime grande relevância, pois pesquisa a presença do DNA e RNAm do bacilo *M. leprae* em águas de regiões endêmicas do Estado do Ceará utilizadas para diferentes fins pela população local.

1.9 Micobacterias Não Tuberculosas (MNT)

Embora desde 1900 houvesse descrições de espécies novas com base em casos de infecção humana e animal (LEÃO *et al.*, 2004), até a década de 1950 as micobactérias diferentes do *M. leprae* ou *M. tuberculosis* eram vistas apenas como seres saprófitos no ambiente. A comprovação da importância médica das micobactérias naquela época serviu, no entanto, como incentivo para um número crescente de pesquisas, inclusive a proposição, por

Ernest Runyon, em 1959, da primeira organização e classificação de micobactérias, baseada na velocidade de crescimento das colônias e condições de luminosidade para produção de pigmentos (SOUZA, 1993).

Os estudos sobre micobactérias ambientais refletem nas diversas denominações a elas conferidas na literatura. Desde 1935, autores atribuíram termos como “Micobactérias Atípicas”, “Micobactérias não Causadoras de Tuberculose”, “Micobactérias Outras que Não o Bacilo da Tuberculose” (MOTT) e “Micobactérias Ambientais Oportunistas” (FALKINHAM, 1996; NEUMANN et al., 1997; DAILLOUX et al., 1998; FALKINHAM, 2002).

Com exceção do *M. leprae*, que não é cultivável *in vitro*, a divisão atual das micobactérias compreende dois grupos, a saber, o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e as Micobactérias não Causadoras de Tuberculose (UEKI et al, 2005; WILDNER, 2011). O CMTB engloba as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* – BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (BROSCH et al, 2002; EUZÉBY, 2012). As MNT compreendem as demais espécies de micobactérias, dentre as quais se mencionam o Complexo *M. avium* (CMA), que inclui *M. avium*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. marseillense*, *M. vulneris*, *M. timonense*, *M. intracellulare* e *M. colombiense* (CAYROU et al, 2010), o Complexo *M. terrae*, que agrupa *M. terrae*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. triviale*, *M. algericum*, *M. arupense*, *M. kumamotonense* e *M. sensuense* (MUN et al, 2008; SAHRAOUI et al, 2011) e o Grupo *M. chelonae*, composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. immunogenum* (BROWN-ELLIOT & WALLACE, 2002; PITOMBO et al, 2009).

A Sociedade Torácica Americana publicou em 2007 dados da incidência de infecções pulmonares causadas por MNT nos Estados Unidos. No início dos anos 1980, estima-se que a prevalência de infecções era de um a dois casos a cada 100.000 habitantes. De 1993 a 1996, foi relatada uma taxa anual de casos de sete a oito a cada 100.000 habitantes. Um estudo em Ontário, Canadá, documentou aumento na frequência de infecções por micobactérias ambientais de 9,1 a cada 100.000 habitantes em 1997 para 14,1 a cada 100.000 habitantes em 2003, crescimento anual de 8,4 % (MARRAS et al. 2007). Por conta da baixa probabilidade da transmissão de micobacterioses pessoa a pessoa, no Brasil, não existe obrigatoriedade de notificação de casos novos às secretarias de saúde pública, e por isso o indicador de incidência de infecções causadas por micobactérias no país é desconhecido (BRASIL, 2008).

Em virtude da ausência de evidências da transmissão de micobacterioses pessoa a pessoa, passaram a ser investigadas as fontes ambientais das infecções por MNT

(FALKINHAN, 1996; COVERT *et al.*, 1999; IIVANAINEN *et al.*, 1999; FALKINHAN, 2002). Hoje, sabe-se que infecções por MNT podem ser transmitidas por ingestão, inalação ou inoculação de micobactérias a partir de fontes ambientais (FALKINHAN, 1996; COVERT *et al.*, 1999; LE DANTEC *et al.*, 2002). A água é considerada o principal veículo de transmissão de infecções por MNT (RADONSKI, 2010), especialmente em caso de sua ingestão ou inalação por crianças, idosos e pessoas em situação de imunocomprometimento (PRIMM *et al.*, 2004).

As micobactérias são resistentes aos principais métodos de tratamento de água à base de cloro usados pelas empresas de tratamento. Falkinhan e colaboradores (2001) observaram que o número de micobactérias encontradas em amostras de água coletadas dos sistemas de distribuição foi maior do que nas amostras coletadas imediatamente após o tratamento, indicando que micobactérias podem crescer no sistema de distribuição de água. Em estudo realizado na França, Dailloux e colaboradores (1998) demonstraram que o cloro usado para tratamento de água não possui efeito micobactericida na concentração de 0,2 mg/L. A Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde recomenda que a exata concentração de 0,2 mg/L de cloro residual esteja presente na água entregue ao consumidor pelas empresas de tratamento de água, a fim de mantê-la minimamente livre de contaminação.

A resistência das micobactérias a condições adversas e a cloração pode ser atribuída não somente à sua parede celular rica em lipídios, mas também à sua capacidade de formar biofilmes (IIVANAINEN *et al.*, 1995; SCHULZE-RÖBBECKE *et al.*, 1992; FALKINHAN *et al.*, 2001; GRANUCCI, 2001). Há evidências de que esses biofilmes possam ser locais de replicação de MNT como *M. kansasii* (SCHULZE-RÖBBECKE *et al.*, 1992), uma vez que os biofilmes fornecem condições favoráveis ao crescimento, como acúmulo de matéria orgânica, amenização da temperatura e diminuição da atividade dos resíduos de cloro (DAILLOUX *et al.*, 1998).

Para a identificação das amostras bacterianas são aplicados métodos de biologia molecular na identificação de micobacterias, citando-se a análise dos produtos da digestão enzimática após amplificação do material genético por reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica consiste em amplificar o material a ser analisado mediante a técnica molecular PRA (PCR – *Amplification Restriction Analysis*), seguida de amplificação do gene *hsp65* e análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição após digestão enzimática com endoenzimas específicas. Assim, facilmente faz-se distinção entre as espécies de MNT (CHIMARA *et al.*, 2008).

A amplificação por PCR pode ter como alvo várias regiões gênicas, tais como o gene *hsp65* e a região cromossômica *IS6110*, sendo os iniciadores utilizados específicos para cada região (STEINGRUBE et al., 1995).

Na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase e Análise de Restrição por Endonucleases desenvolvida em 1992 por Plikaytis e colaboradores (VINCENT *et al.* 2003) e aprimorada por Telenti e colaboradores (1993) é feita PCR da sequência do gene *hsp65*, que codifica a proteína de choque térmico de 65-kDa. Esse gene é altamente conservado nas micobactérias, mas também exibe regiões hipervariáveis usadas para a identificação das diferentes espécies (TORTOLI, 2003). O fragmento amplificado de 441 pb é submetido à digestão com as enzimas de endorrestricção *BstEII* e *HaeIII* (TELENTI et al., 1993). Os produtos da digestão são separados por eletroforese em gel de agarose, onde aparecem como bandas cujos padrões são, normalmente, espécie-específicos. Existem, entretanto, diferentes espécies com padrões similares enquanto outras com múltiplos padrões de digestão (TORTOLI, 2003). Para a interpretação dos resultados do PRA, foi desenvolvido um banco de dados na Internet, o PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), onde podem ser encontrados os padrões de PRA atualmente descritos (LEÃO et al., 2004).

A ecologia das micobactérias em água ainda é pouco conhecida, bem como a associação entre as condições físico-químicas do ambiente aquático e ocorrência de espécies (KANAI, 2006). Bland e colaboradores (2005) asseveram que condições ácidas favorecem a recuperação e contagem de micobactérias em amostras ambientais. Iivanainen e colaboradores (1993) obtiveram uma correlação negativa entre a contagem de micobactérias e o pH e correlação positiva entre a quantidade de matéria orgânica decomposta na água.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Verificar a presença de *Mycobacterium leprae* viável em amostras de coleções de água ambientais em municípios do estado do Ceará.

2.2 Específicos:

- Identificar por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos a presença de DNA e RNAm de *M. leprae* e MNT em amostras de água ambientais, com foco em Micobactérias, *M. leprae* e MNT;
- Confirmar por sequenciamento os produtos de *gyrA* de *M. leprae* obtidos;
- Relacionar a presença de *M. leprae* com a profundidade da coleta e as características físico-químicas da água (pH, condutividade elétrica e temperatura);
- Relacionar a detecção de *M. leprae* nas águas com o peridomicílio de pacientes com hanseníase no município de Sobral;
- Cultivar e identificar micobactérias não tuberculosas (MNT) ambientais presentes nas amostras de água;
- Avaliar a relação entre o número de espécies de micobactérias isoladas e as condições físico-químicas da água.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

O presente estudo é do tipo não observacional e transversal, e ocorreu durante o período de outubro de 2010 e setembro de 2012.

3.2 Caracterização da área de estudo

Neste trabalho foram estudadas amostras de água dos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem, os quais se situam no estado do Ceará, região Nordeste.

Os municípios foram selecionados de acordo as características epidemiológicas (alta, média e baixa endemicidade) da hanseníase, assim como as condições geológicas e climáticas (Tabela 1) No Anexo B pode ser observado os tipos de clima predominantes nas regiões Ceará onde foi realizado o estudo (IPECE, 2012; FUNCEME, 2012).

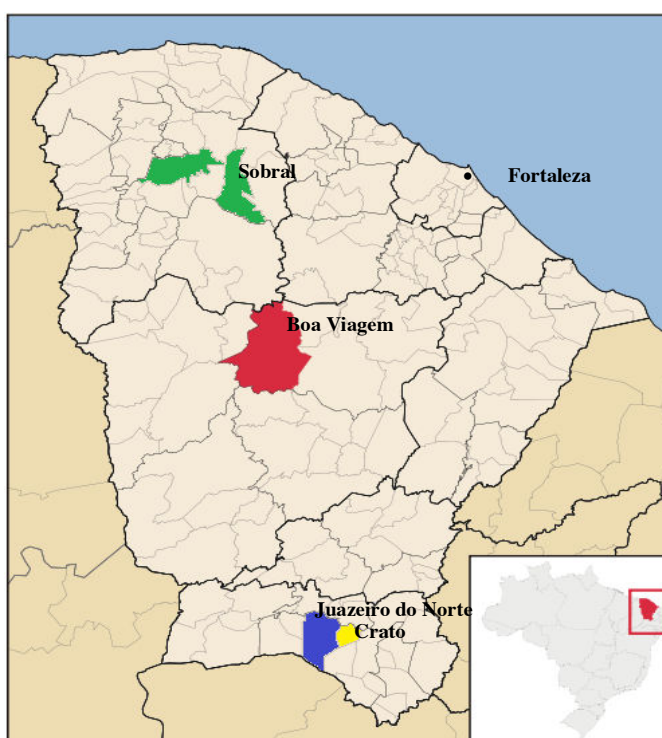
Tabela 1 – Características epidemiológicas, geológicas e climáticas dos municípios incluídos neste estudo.

Município	Data da coleta	Localização	Distância em linha reta da capital	Área	Altitude	Latitude e Longitude	População	Clima	Temperatura média (°C)	Coef. de Detecção	Sit. Epid. da Hanseníase
BOA VIAGEM	14.09.12	Região Centro-Oeste	206,0 km	2.836,7 7 km	275,6 metros	5° 07' 39" e 39° 43' 56"	52.498* habitan- tes	Tropical quente semiárido	26° a 28°	7,6*	Bom
CRATO	09.11.10	Região Sul	400,0 km	1.009,2 0 km	426,9 metros	7° 14' 03" e 39° 24' 34"	121.428* habitan- tes	Tropical Quente Semiárido Brando/Tropical Quente Sub-úmido	24° a 26°	32,1*	Precária
JUAZEIRO DO NORTE	09.11.10	Região Sul	396,0 km	248,55 km	377,3 metros	7° 12' 47" e 39° 18' 55"	249.939* habitan- tes	Tropical Quente Semiárido e Tropical Quente Semiárido Brando	24° a 26°	38*	Precária
SOBRAL	18.10.11	Região Noroeste	206 km	2.122,9 8 km	69,49 metros	3° 41' 10" e 40° 20' 59"	188.233* habitan- tes	Quente Semiárido e Tropical Quente Semiárido Brando	26° a 28°	45,2*	Bom

Fonte: Elaborado pela autora. Características dos municípios estudados de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE) e Informe Epidemiológico da Hanseníase no Ceará de 2012, divulgado pela Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. *População e Coeficiente de detecção do ano de 2011.

A figura 3 apresenta o mapa do Ceará com a localização dos municípios estudados. Os pontos de coletas em cada município são os mesmos definidos em estudo preliminar realizado pelo nosso grupo de pesquisa. Os pontos foram designados pelos agentes de saúde locais, os quais informaram o emprego de água para fins de lazer e/ou uso doméstico. Portanto, foram coletadas águas de rios, açudes e outras coleções naturais de água. Nos Apêndices A, B, C e D estão os pontos de coleta dos municípios estudados utilizando latitude e longitude com o auxílio do *software Google Earth*.

Figura 3 – Mapa do Estado do Ceará.



Fonte: Elaborado pela autora. Adaptado do site <http://www.cariri.ufc.br>. Em destaque a localização dos municípios estudados.

No município de Sobral, especificamente, foram coletados dados referentes aos pacientes portadores de hanseníase utilizando informações do Boletim de Acompanhamento Mensal do SINAN nas Unidades Básicas de Saúde de acordo com a Secretaria de Saúde.

3.3 Coleta das amostras

As amostras de águas ambientais foram coletadas durante o dia, onde de cada local de coleta (sítio) foram coletadas cinco réplicas de água com a utilização de recipientes estéreis e transferidas para frascos âmbar estéreis com capacidade para 1000 mL nos municípios já citados como descrito abaixo:

No dia 09 de novembro de 2010 foram coletadas amostras de água de cinco (05) localidades no município de Juazeiro do Norte, e quatro (04) de Crato (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Juazeiro do Norte, Ceará.

Identificação do local	Ponto de coleta
Juazeiro 1	Açude do Sabiá
Juazeiro 2	Açude do Sítio Amaro Coelho
Juazeiro 3	Rio Carás
Juazeiro 4	Açude dos Carneiros
Juazeiro 5	Riacho Alagoano (afluente do Rio Carás)

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 – Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Crato, Ceará.

Identificação do local	Ponto de coleta
Crato 1	Serrano Atlético Cratense
Crato 2	Sítio Preguiça
Crato 3	Açude Tomás Osterne de Alencar
Crato 4	Açude da Ponta da Serra

Fonte: Elaborado pela autora.

No dia 18 de outubro de 2011 foram coletadas amostras de água de oito (08) localidades no município de Sobral (Tabela 4).

Tabela 4 – Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Sobral, Ceará.

Identificação do local	Ponto de coleta
Sobral 1	Açude Mucambinho
Sobral 2	Açude do Cachoeiro
Sobral 3	Lagoa da Fazenda
Sobral 4	Rio Acaraú abaixo da Ponte Othon de Alencar
Sobral 5	Rio Acaraú na frente da Igreja das Dores
Sobral 6	Riacho Mucambinho
Sobral 7	Rio Oiticica
Sobral 8	Rio Tetê

Fonte: Elaborado pela autora.

E, no dia 14 de setembro de 2012 foram coletadas amostras de água sete (07) localidades no município de Boa Viagem (Tabela 5), totalizando 24 locais de coleta e 120 amostras.

Tabela 5 – Descrição dos pontos de coleta das amostras de águas ambientais da cidade de Boa Viagem, Ceará.

Identificação do local	Ponto de Coleta
BoaViagem 1	Açude Câmara dos Timoteos
BoaViagem 2	Açude Pigoita
BoaViagem 3	Açude da Arara
BoaViagem 4	Açude Vierão
BoaViagem 5	Açude Fugareiro
BoaViagem 6	Açude Capitão Mor
BoaViagem 7	Açude Anafuê

Fonte: Elaborado pela autora

As cinco réplicas de cada local de coleta foram realizadas em profundidades diferentes a fazer referência à altura da coluna de água de 1 metro nas quais foram coletadas e, portanto, ganharam nomenclaturas distintas (letras “a” a “e”) (Tabela 6). Alguns locais de coleta não apresentaram profundidade que possibilitasse a diferenciação entre réplicas. Dessa maneira, todas as amostras destes pontos foram coletadas na mesma profundidade, no sistema de canalização. Foram esses pontos de coleta: o Serrano Atlético Cratense (C1) e o Sítio Preguiça (C2).

Tabela 6 – Distribuição das cinco amostras coletadas na espessura do reservatório dos sítios de coleta.

Amostra	Profundidade
Amostra a	Superfície
Amostra b	Intermediária superior, com profundidade de 25 cm
Amostra c	Meio, profundidade de 50 cm
Amostra d	Intermediária inferior, com profundidade de 75 cm
Amostra e	Profundidade de 1 metro

Fonte: Elaborado pela autora. Profundidade da coluna d'água amostrada: 1 metro.

Além da profundidade, foram coletados informações quanto ao uso dessas coleções de água, que podem ser usadas desde o consumo humano e banho até a lavagem de animais e irrigação da sede.

Os sítios foram designados pela inicial do município (Juazeiro do Norte – J, Crato - C, Sobral - S, e Boa Viagem – B) seguidos de ordem numérica (J1 a J5; C1 a C4; S1 a S8 e B1 a B7) e por últimos das réplicas em ordem alfabética (J1a, J1b, J1c, J1d, J1e, J2a ... B7d). Os pontos de coletas foram marcados com o uso de um GPS portátil. As amostras de água foram conduzidas ao laboratório em caixas resfriadas para manter a condição em torno de 4°C (Figura 4) durante o transporte (dentro do período de 12 horas) até o Laboratório de Micobactérias no bloco de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará. Posteriormente, as garrafas foram armazenadas em 4°C até o processamento. A extração do RNAm, assim como o cultivo aconteceram logo após as amostras chegarem ao laboratório seguido da extração do DNA, tudo em um prazo máximo de 48 horas após a coleta de cada amostra.

Figura 4 – Condicionamento e transporte das amostras.

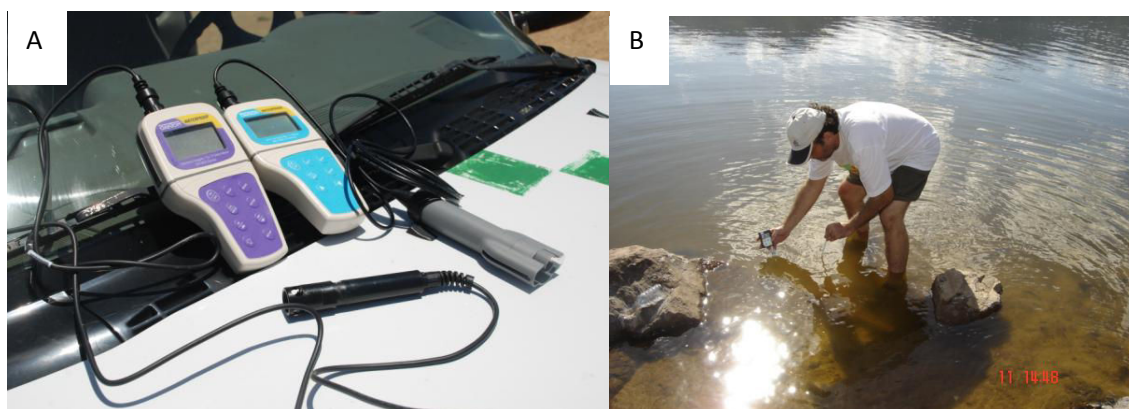


Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 Avaliação das condições ambientais

No momento de coleta das amostras, foi utilizado um medidor pH/CON 10 à prova d'água (OAKTON®) para obter os dados de pH, condutividade elétrica e temperatura das águas nos sítios de coleta (Figura 5) medidas diretamente em campo.

Figura 5 – Avaliação das condições ambientais dos municípios estudados.



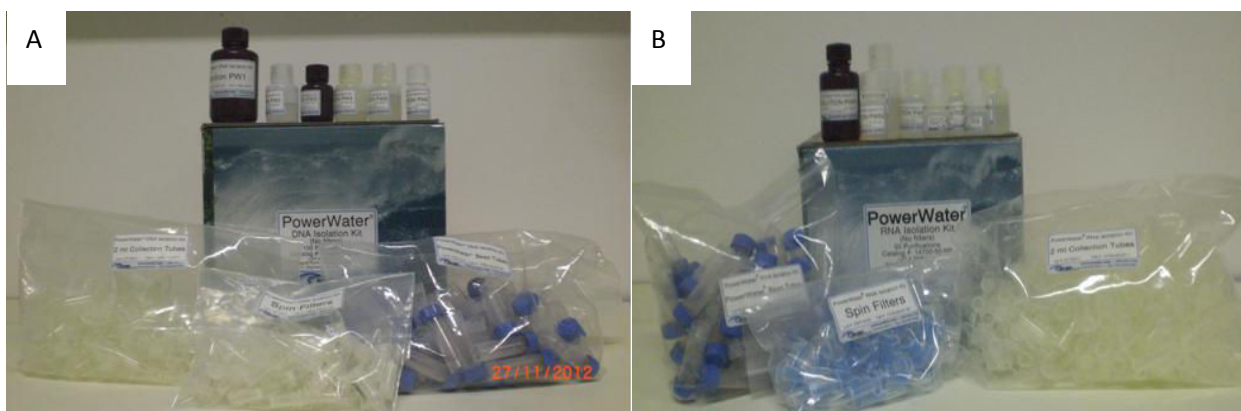
Fonte: Elaborado pela autora. A: Aparelho pH/CON 10 à prova d'água (OAKTON®) usado para avaliar as condições ambientais dos sítios de coleta dos municípios estudados; B: Momento da avaliação.

3.5 Identificação do *M. leprae* nas amostras de água

3.5.1 Extração de ácidos nucleicos total de *M. leprae* das amostras de água

O processo de extração dos ácidos nucleicos de *M. leprae* das águas foi feito com o *Power Water DNA Isolation Kit* (Mo Bio®) para o DNA, enquanto o RNA total foi extraído com o *RNA Power Water Isolation Kit* (Mo Bio®) (Figura 6), seguindo o protocolo do fabricante.

Figura 6 - Kits de extração de ácidos nucleicos de *M. leprae* das amostras de água.



Fonte: Elaborado pela autora. A: *Power Water DNA Isolation Kit*; B: *RNA Power Water Isolation Kit* (Mo Bio®)

Para a obtenção das bactérias, foram utilizados filtros Water Filter com membrana de poro de 0.22 μm de diâmetro (Mo Bio®), auxiliada por bomba de vácuo (Figura 7). Os filtros possuem na sua estrutura um copo com capacidade máxima de 100 mL, no qual foi adicionada a amostra após uma rápida homogeneização do frasco âmbar. O sistema de vácuo era ligado, permitindo a passagem do filtrado e o sedimento ficava retido na membrana filtrante. O copo do filtro era desconectado e a membrana filtrante ficava exposta, sendo removida cautelosamente com o auxílio de pinças estéreis, sem exercer pressão excessiva ou remover sedimentos da área de filtração e adicionada a microtubos fornecidos pelo *kit* contendo *beads* em solução e homogeneizados. A lise celular ocorreu por mecanismos físicos

e químicos de acordo com as especificações do fabricante. Nas etapas seguintes, o DNA e o RNA total de cada amostra foram capturados por uma membrana sílica contidos em coluna do tipo *spin* de acordo com as instruções do fabricante. A descrição completa da extração dos ácidos nucleicos encontra-se nos apêndices E e F.

As suspensões de DNA foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que as alíquotas do RNA foram à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 7 - Esquema de filtração à vácuo.



Fonte: Elaborado pela autora. No detalhe, a membrana filtrante de $0,22\text{ }\mu\text{m}$.

3.5.2 Amplificação dos ácidos nucleicos

Todos os procedimentos de amplificação foram realizados em capela de fluxo laminar, onde esta antes de iniciar o procedimento laboratorial foi devidamente limpa com solução de hipoclorito de sódio a 5%, água destilada para remoção dos resíduos e álcool, seguido de 20 minutos à luz ultravioleta (UV).

As técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e de Transcrição Reversa (RT-PCR) utilizaram os iniciadores para amplificar o fragmento genômico referente à topoisomerase II subunidade A específica do *M. leprae*.

Os nucleotídeos iniciadores para a PCR foram desenhados pelo programa Primer3Plus a partir da região genômica ML0006 (*gyrA*) de 3750 pb do *M. leprae*, depositadas no *GenBank* (Figura 8).

Figura 8 - Localização do iniciador *gyrA-Forward* e sequência complementar do iniciador *gyrA-Reverse* (mostrado sob marcação) no gene ML0006 (*gyrA*) 3750 pb do *Mycobacterium leprae*.

```

DNA gyrase subunit A [Mycobacterium leprae TN] M. leprae |ML0006|gyrA:
3750 bp - Probable DNA gyrase (subunit A) GyrA (DNA topoisomerase (ATP-hydrolysing))
(DNA topoisomerase II) (Type II DNA topoisomerase)

atgactgatatacagctgccaccaggtgacggttctatacagcgggttgagccggtcgac
attcagcaggaatgcagcgcagctataattgattacgcgatgagtgattgtgggccgg
gcggtgcctgaagtccgcgatggctcctcaaacccggtacatcgtcgggtcctgtacgcgatg
ttagactccggtttccgCCCGGACCGTAGCCACGCTAAGTCagcacggtcagtc
gctgagacgatgggcaattaccatccgcacgcgcacgcacatcgtatgatgacacggttagtg
gcgcagccgctggctgcctgcggtatcccttggttgatgggcaaggcaatttcggttcgccg
ggTAATGACCCACCGGCAGCGATGcgttattgtgtgtcaggaatttccttggtga
ctattgggaaatcaatacgaatcgggtgatcgttactggagctcagttcaattcggac
aatccgatcgacttgaaggttcttgatcggcatggtaaatccggttgtagccgattatatta
ttccattcagagagcaccacaaacctatacagtgcgaccactgaaggctatgagatcacc
gggacgtcgaaccatcccttggtgtgtttagtgaaatgctcggcggtataccaccttggtg
tggaagctgattggagaaattcgatcaggagactacgttggttttacagcggatcccacca
gtggaatttggtccggcggactggtattctacgatggaagcattgttattcggagccttt
attagtggggcttcggttttcaggaccatgctggatttaacagccttgaccgtgactat
ttcaccatggttgttaatgcttatgatacgggttggtgggctgcggttgcatatcttct
cgaatcaccgtatcggggtcgacgctactcgaacttgatggtttataacctcatcgagttt
aagaagacaagacttagcgggttatgcgggcaacggtctgcggacaagttggtacctgac
tggttggtgacctcaccttcaccgctcaaacgagcattccttcaggcattggttgaaggt
gaaggatcttctcgatattgtcggcaaatataattgagatttcctactcgacacttagt

```

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Com o auxílio do site <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/> foram desenhados os iniciadores (*gyrAF* e *gyrAR*) das reações de amplificação apresentados no tabela abaixo. Os iniciadores foram fabricados pela empresa Invitrogen®, EUA.

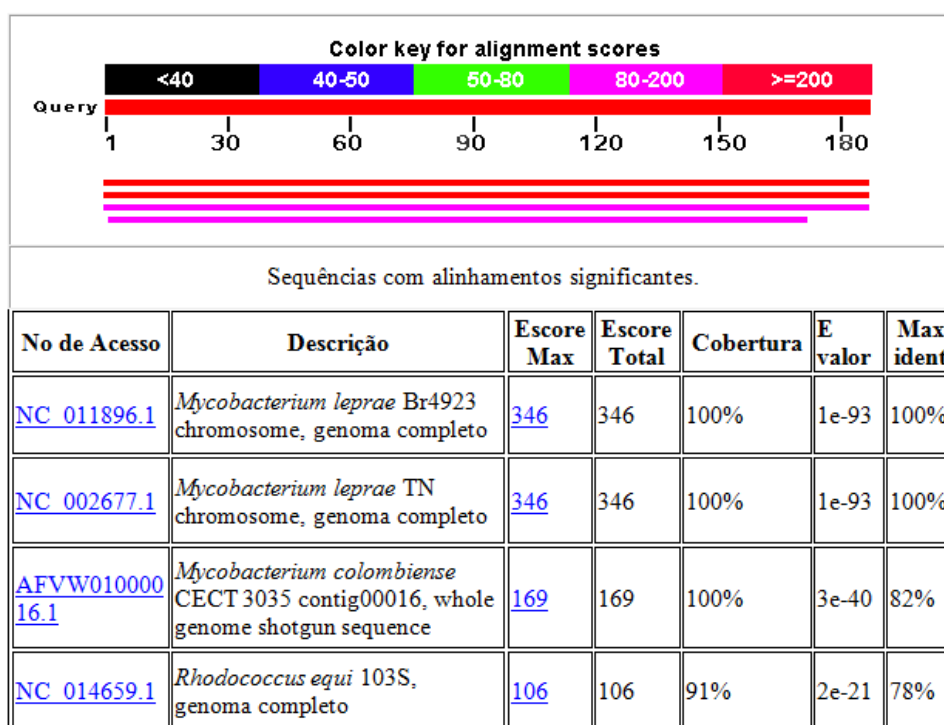
Tabela 7 - Iniciadores para amplificação do fragmento de 187pb do gene da *gyrA* de *M. leprae*.

Iniciadores	Seqüência
<i>gyrA-Forward</i>	5' - CCC GGA CCG TAG CCA CGC TAA GTC – 3'
<i>gyrA-Reverse</i>	5'–ATC GCT GCC GGT GGG TCA TTA–3'

Fonte: Elaborado pela autora.

Foi realizado um BLAST da região de 187pb a ser amplificada pelos iniciadores *gyrAF* e *gyrAR* em relação a todas as sequências nucleotídicas de microrganismos armazenadas no banco de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Figura 9).

Figura 9 - Alinhamento do produto de 187pb referente ao gene *gyrA* de *M. leprae* em relação a todas as sequencias nucleotídicas de micróbios empregando a ferramenta BLAST.



Fonte: BLAST- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3.5.2.1 Amplificação do DNA de *M. leprae*

A amplificação do DNA genômico extraído das amostras de águas ambientais foi realizada através do *Kit Master Mix PCR* (QIAGEN®) para amplificação de 187pb do gene *gyrA* com os iniciadores *gyrA-F* e *gyrA-R* (Invitrogen®). A *Taq PCR Mix Master* é uma solução pré-misturada contendo Taq DNA Polymerase 5u/μL, 2x QIAGEN® PCR Buffer, 3 mM MgCl₂, e 400 μM de cada dNTP.

Para a mistura da reação de PCR necessária para a amplificação da região *gyrA* foram utilizados 7µl de água, 12,5µl de *Taq PCR Mix Master* e 1,25µl de cada iniciador *gyrA-Forward* (5' - CCC GGA CCG TAG CCA CGC TAA GTC - 3') e *gyrA-Reverse* (5' - ATC GCT GCC GGT GGG TCA TTA - 3') (2µM). Três microlitros do DNA de cada amostra foram adicionados a 22 µl da mistura de PCR em tubos de 0,2 ml, formando um volume final de 25µl. 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 em diluição de 1 para 2.

A amplificação foi realizada utilizando o Mastercycler personal 5332 (epENDORF®) e envolveu as seguintes condições para a obtenção dos produtos: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 6 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 90 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 62 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após o término, as amostras foram mantidas a 4 °C até serem retiradas do termociclador e armazenadas a -20 °C.

3.5.2.2 Amplificação com Transcriptase Reversa do RNAm de *M. leprae*

A amplificação do RNAm foi realizada com o kit OneStep RT-PCR (QIAGEN®) para a síntese de DNA complementar seguido de amplificação. Os iniciadores empregados para a região *gyrA* foram os mesmos empregados na amplificação do DNA, iniciadores *gyrA-Forward* e *gyrA-Reverse* (Invitrogen®), com produto final de 187 pb. Nesse kit, as reações de transcrição reversa e de PCR ocorrem sequencialmente no mesmo tubo, sendo todos os componentes adicionados no início da reação e não havendo necessidade de parar a reação, uma vez que tiver começado.

Para a mistura da reação de RT-PCR necessária para a amplificação da região *gyrA* foram utilizados: 14,5µL de H₂O RNase-free; 5µL de 5x RT-PCR Buffer contendo 12,5 mM MgCl₂; 1µL de dNTP mix 10mM; 2,5µL do RNA total extraído das amostras ambientais; 0,5µL de cada iniciador *gyrA-Forward* (5' - CCC GGA CCG TAG CCA CGC TAA GTC - 3') e *gyrA-Reverse* (5' - ATC GCT GCC GGT GGG TCA TTA - 3') (2µM); 1µL de RT-PCR

Enzyme Mix, composto por: glicerol 50%(v/v), Omniscript e Sensiscript Reverse Transcriptases e HotStarTaq DNA Polymerase, sendo as duas primeiras enzimas responsáveis pela transcrição reversa e a última enzima pela PCR. O controle negativo recebeu 2,5 µL de H₂O RNase-free enquanto que o controle positivo utilizado foi DNA proveniente da extração de biópsias de pacientes MB em diluição de 1 para 2.

A amplificação foi realizada utilizando o Mastercycler personal 5332 (eppendorf®) e envolveu as seguintes condições para a obtenção dos produtos: transcrição reversa a 50°C por 5 minutos, na qual a fita simples de RNA serve com molde para a produção da fita dupla de DNA complementar; 95°C por 15 minutos para que as enzimas de transcrição reversa fossem desnaturadas e a HotStarTaq DNA Polymerase possa ser ativada. Posteriormente, seguiu-se a mesma ciclagem definida na PCR: aquecimento inicial a 94°C por 5 minutos seguidos de 6 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 90 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 62 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após o término, as amostras foram mantidas a 4 °C até serem retiradas do termociclador e armazenadas a -20 °C.

3.5.2.3 Visualização dos resultados

Os produtos das reações de amplificação da PCR e RT-PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose (UltraPure Agarose - Invitrogen®) 1% (w/v). A preparação dos géis de agarose ocorreu em tampão TBE 1x (0,09 M Tris-borate e 0,002 M EDTA) (Apêndice G) com adição de 3µl de brometo de etídio (Bio-Rad®) 10 mg/mL, à concentração final de 0,5 µg/mL. Após a solidificação do gel, uma quantidade de 10µl dos produtos da PCR e RT-PCR, foi misturada a 3µl do tampão de carregamento Blue/Orange Loading Dye 6x (Promega®). Para comparação das bandas foi utilizado 5µl do marcador de peso molecular de 100pb (Promega®).

Os fragmentos de DNA foram visualizados e as imagens digitalizadas no transluminador de luz ultra-violeta a 302 nm ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®). A eletroforese foi efetuada a voltagem constante de 50 V/cm linear por aproximadamente 75 minutos em fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS – (GE Healthcare®)).

3.5.3 Sequenciamento do produto amplificado

O produto de DNA de duas amostras de água que obtiveram amplificação da região *gyrA* foi submetido 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 National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

3.6 Características dos pacientes com hanseníase do peridomicílio dos locais de coleta no município de Sobral

No município de Sobral foram coletados dados referentes aos pacientes portadores de hanseníase através do Boletim de Acompanhamento Mensal do SINAN nas Unidades Básicas de Saúde de acordo com a Secretaria de Saúde. Comparou-se características desses pacientes como forma clínica da hanseníase (MB ou PB), sexo e o georeferenciamento (Anexo C) em relação aos locais de coleta com a frequência de ácidos nucleicos de *M. leprae* encontrados nas amostras de água analisadas.

3.7 Identificação de micobactérias não tuberculosas

Depois de homogeneizadas por inversão, foram retiradas duas alíquotas de 50 ml de cada amostra de água. A primeira alíquota foi utilizada para a preparação de lâminas de microscopia e a segunda foi submetida ao processo de descontaminação com posterior cultivo e identificação molecular.

3.7.1 Pesquisa de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) e Gram

A preparação das lâminas deu-se pela centrifugação da alíquota de 50 ml em tubo Falcon a 10.000 rpm por 10 minutos. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e do sedimento resultante foram retirados 20 µl por pipetagem. O sedimento pipetado foi colocado sobre lâmina de microscopia ótica, previamente limpa com álcool e deixada á temperatura ambiente para que secasse. De cada amostra foram feitas duas lâminas contendo duas réplicas. Uma das lâminas foi corada pelo método de Ziehl-Nielsen (ZN) (Apêndice H), o qual é utilizado para a detecção de bacilos álcool-ácido resistentes, como micobactérias. A segunda lâmina de cada amostra foi corada pelo método de Gram (Apêndice I), que diferencia bactérias Gram positivas de Gram negativas. A realização da coloração de Gram nesta etapa visava prover uma visão geral dos tipos de microorganismos presentes na amostra.

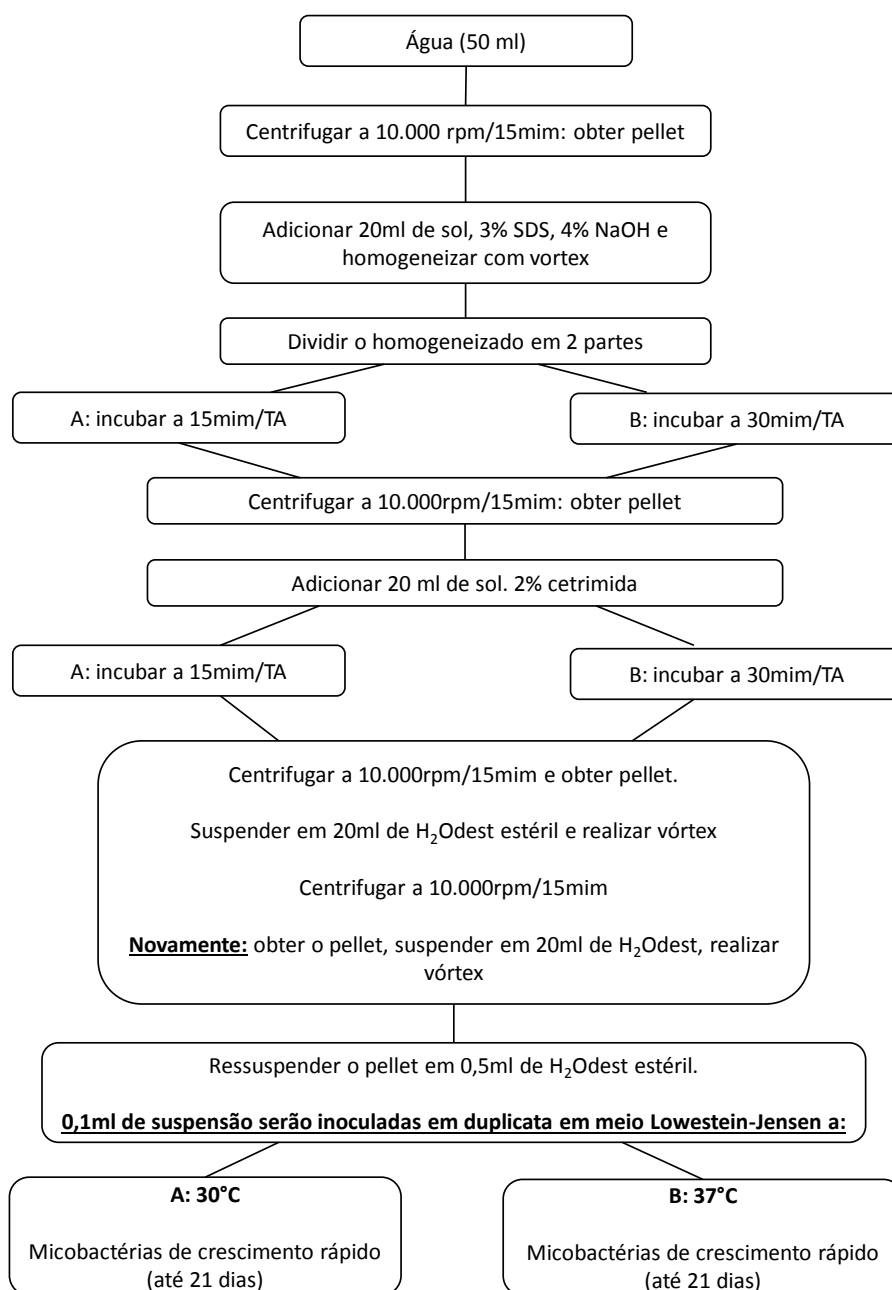
3.7.2 Descontaminação e cultivo das amostras

O método de descontaminação foi realizado de acordo com Parashar *et al.* (2004), que encontra-se descrito abaixo e resumido na figura 10. A figura 11 mostra algumas etapas da descontaminação. Esta etapa se destina a promover a viabilidade de micobactérias presentes na água por métodos químicos, eliminando da amostra ambiental microorganismos contaminantes.

Para a descontaminação, 50 mL das amostras de água foram centrifugadas a 8.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 20mL da solução de tratamento (3% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e 4% NaOH). Essa solução foi dividida em duas partes: parte A, incubada a temperatura ambiente (TA) por 15 minutos para obter produtos de crescimento rápido, e a parte B, incubada a TA por 30 minutos para obter produtos de crescimento lento. Após a encubação, todas as suspensões foram centrifugadas a 8.000 rpm por 15 minutos a 4 °C seguida do descarte do sobrenadante. Em seguida, os sedimentos foram tratados em solução de 20 mL de centramida 2%, onde uma parte foi incubada a TA por 5 minutos para crescimento rápido e a outra parte incubada a TA por 15 minutos para o crescimento de micobactérias de crescimento lento, seguidas de uma centrifugação a 8.000 rpm por 15

minutos a 4 °C. Posteriormente, os sedimentos foram lavados duas vezes com 20mL de água destilada e ressuspensão em 0,5mL de água destilada.

Figura 10 - Etapas do processo de descontaminação (Parashar *et al.*, 2004).

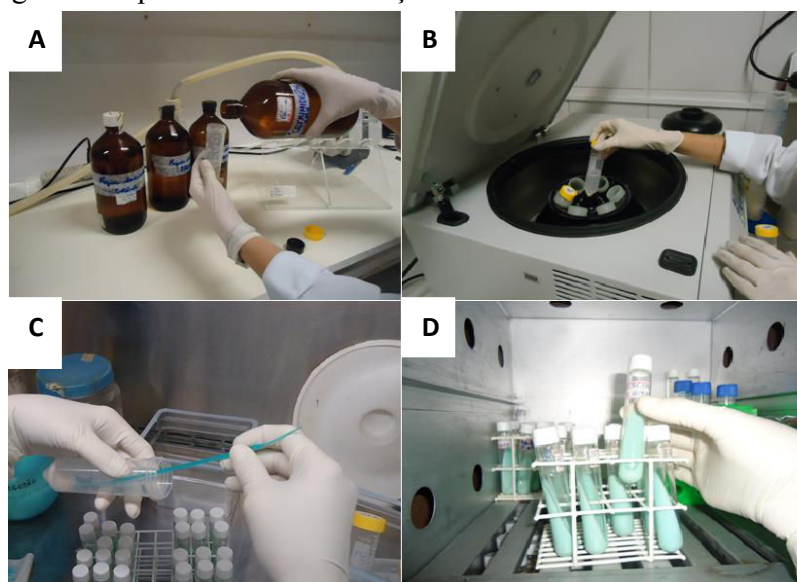


Fonte: Elaborado pela autora.

O cultivo das amostras foi realizado em capela de fluxo laminar com fluxo negativo. Antes do início do procedimento a cabine foi limpa com álcool a 70% e submetido à luz ultravioleta por 20 minutos. O produto da descontaminação de cada amostra foi inoculado em quatro tubos de meio de cultura sólido Lowenstein-Jensen (L-J) (Newprov®). Duas duplicatas destes foram mantidos a 30°C, para proporcionar o cultivo de micobactérias de crescimento rápido (MCR), enquanto as outras duas duplicatas foram mantidas à temperatura de 37°C, para proporcionar o cultivo de micobactérias de crescimento lento (MCL). Depois de inoculados, os tubos de meio de cultura permaneceram com tampa frouxa e foram mantidos a uma inclinação de 90°. No terceiro dia após o cultivo, as tampas foram fechadas e os tubos foram inclinados a 45° por todo o período de observação.

A partir da data de inoculação, os tubos de L-J foram observados diariamente até o sétimo dia. A partir de então, passaram a ser observados semanalmente até o período de 21 dias para as MCR e 40 dias para as MCL. Sendo consideradas negativas para micobactérias as que não cresceram após este período.

Figura 11 - Algumas etapas da descontaminação.



Fonte: Elaborado pela autora. A, adição da centrâmidia 2% durante a descontaminação; B, centrifugação das amostras em tubos Falcon de 50 ml em centrífuga refrigerada; C, cultivo em meio Lowenstein-Jensen de 0,1 ml de cada amostra descontaminada em capela de fluxo laminar; D, incubação dos tubos de L-J mantidos a 90° em estufa bacteriológica a 37°C.

3.7.3 Coloração das colônias cultivadas em ágar Lowenstein-Jensen

Ao término do tempo de incubação, os tubos que apresentaram crescimento tiveram as colônias removidas com alça bacteriológica descartável e colocadas em uma lâmina de microscopia óptica, sobre a qual foi feita um esfregaço da colônia. Depois de preparadas, as lâminas foram mantidas em recipiente de vidro contendo pastilhas de formalina umedecidas durante 48 horas, objetivando reduzir riscos de contaminação exposicional. Subsequentemente, as lâminas foram coradas pelo método de ZN.

As colônias cujas lâminas mostraram presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR +) foram completamente raspadas dos tubos com o uso de alça bacteriológica e submetidas a identificação molecular da espécie de micobactéria (TELENTI *et al*, 1993).

3.7.4 Extração do DNA a partir das colônias cultivadas em Lowenstein-Jensen

O DNA das colônias foi extraído seguindo o protocolo descrito por Telenti e colaboradores (1993), com algumas modificações. O processo de extração do DNA foi realizado em capela de fluxo laminar, onde antes do início do procedimento, esta foi limpa com hipoclorito de sódio 5% e submetida à luz ultravioleta por 20 minutos, juntamente com o material a ser utilizado na extração. Foram utilizadas as medidas de biossegurança adequadas como o uso de máscara com filtro N-95, luvas, aventais e gorros. Nesta etapa, o material reutilizável foi descartado em solução de hipoclorito de sódio a 5% e o material descartável foi isolado para posterior autoclavagem.

Foram utilizadas alças estéreis para aliquotar as colônias do meio de cultura em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml contendo 100 µl de água destilada estéril. Em seguida as colônias foram aquecidas a 100°C por 10 minutos a fim de inativá-las e, logo após, centrifugados a 14.000 rpm por cinco minutos. O sedimento foi lavado por centrifugação a 14.000 rpm com solução salina (0,1 %) por cinco minutos e ressuspenso em 0,2 ml de tampão tampão Tris EDTA Triton (TET). Após isso, os tubos foram novamente aquecidos a 100°C por 10 minutos e congelados a - 20°C até o dia seguinte, quando foram descongelados à

temperatura ambiente e centrifugados a 14.000 rpm por cinco minutos. O DNA extraído foi mantido a -20°C .

3.7.5 Amplificação da região *hsp65* do DNA de *Mycobacterium sp.*

O DNA extraído das colônias foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores Tb11 e Tb12 (Invitrogen®) (Figura 12), que amplificam a região genômica *hsp65* de 441 pb que codifica para a proteína do choque térmico de 65 kDa, presente em todas as micobactérias (SHINNICK, 1987).

Figura 12 - Localização do iniciador Tb11 e sequência complementar do iniciador Tb12 (mostrado em azul) no gene *Rv0440* ou *hsp65* do *M. tuberculosis*.

```
>M. tuberculosis H37Rv|Rv0440|groEL2: 1623 bp - 60 KDA CHAPERONIN 2
GROEL2 (PROTEIN CPN60-2) (GROEL PROTEIN 2) (65 KDA ANTIGEN) (HEAT
SHOCK PROTEIN 65) (CELL WALL PROTEIN A) (ANTIGEN A)
atggccaagacaattgcgtacgacgaagaggcccgctcgcggcctcgagcgggcttgaac
gccctcgccgatgctgtaaaaggtgacattggggcccaaggccgcaacgctcgtcctggaa
aagaagtggggtgccccacgatcACCAACGATGGTGTGTCATcgccaaggagatcgag
ctggaggatccgtacgagaagatcggcgccgagctggtcaaagaggtagccaagaagacc
gatgacgctcgccggtgacggcaccacgacggccaccgctgctggcccaggcgttggctcgc
gagggcctgcgcaacgctcgcggccggcgccaaccgctcggctctcaaacgcccgatcgaa
aagggcctggagaaggtcaccgagaccctgctcaagggcgccaaggaggtcgagaccaag
gagcagattgcccaccgcagcgatttcggcgggtgaccagtcctcgggtgacctgatc
gccgaggcgatggacaaggtgggcaacgagggcgctcatcaccgctcgaggaggtccaacacc
tttgggctgcagctcgagctcaccgAGGGTATGCGGTTGCACAAGggctacatctcgggg
tacttcgtagccgaccggagcgtcaggaggcggctcctggaggaccctacatcctgctg
gtcagctccaaggtgtccactgtcaaggatctgctgcccgtgctcgagaaggtcatcgga
gccgtaagccgctgctgatcctcgccgaggacgtcgagggcgaggcgtgtccaccctg
gtcgtcaacaagatccgcggcaccttcaagtcggtggcgggtcaaggctcccggcttcggc
gaccgcccgaaggcgatgctgcaggatagggccattctcaccgggtgggtcaggtgatcagc
gaagaggtcggcctgacgctggagaacgcccacctgtcgtgcttaggcaaggcccgaag
gtcgtgggtcaccaaggacgagaccaccatcgtcgagggcgccgggtgacaccgacgccatc
gccggacgagtgcccagatccgccaggagatcgagaacagcgactccgactacgaccgt
gagaagctgcaggagcggctggccaagctggccgggtggtgtcgcgggtgatcaaggccggt
gccgccaccgaggtcgaactcaaggagcgcaagcaccgcatcgaggatgctgggttcgcaat
gcccaaggccgcccgtcgaggagggcatcgtcgccgggtgggggtgtgacgctgttgaagcg
gccccgaccctggacgagctgaagctcgaaggcgacgagggcaccggcgccaacatcgtg
aaggtggcgctggaggccccgctgaagcagatcgccctcaactccgggctggagccgggc
gtgggtggccgagaaggtgcgcaacctgccggctggccacggactgaacgctcagaccggt
gtctacgaggatctgctcgtgcccggctgctgaccgggtcaagggtgaccgcttcggcg
ctgcagaatgcccgtccatcgccgggctgttccctgaccaccgagggcgtcgttgcggac
aagccggaaaaggagaaggttccgctcccgggtggcggcgacatgggtggcatggatttc
tga
```

Fonte: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>

Para a mistura de PCR necessária à amplificação foram utilizados 10µl de tampão 5x (Promega®) específico para a enzima Taq polimerase, 1µl de solução de dNTPs a 10 mM, 3µl de MgCl₂ 25 mM, 2,5µl de DMSO, 0,5µl de cada iniciador, TB11 e TB12 (Tabela 8), e 1µl da enzima TAQ DNA polimerase (STEINGRUBE, *et al.*,1995). Cinco microlitros do DNA de cada amostra previamente centrifugados foram adicionados à mistura e acrescidos de 27 µl de H₂O em tubos de 0,2 ml, formando um volume final de 50 µl e colocadas no termociclador Mastercicler (eppendorf). A amplificação envolveu as seguintes condições: desnaturação inicial das fitas de DNA a 95°C por 1 minuto, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos (LEÃO *et al.*, 2004). Após o término, as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador e armazenadas a -20°C.

Tabela 8 - Iniciadores da PCR para amplificação do gene *hsp65* de *Mycobacterium sp.*

Iniciadores	Seqüência
Tb11	5' –ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT – 3'
Tb12	5' – CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT – 3'

Fonte: Elaborado pela autora.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% para confirmação da amplificação. Para tanto, 5µl dos produtos da PCR foram misturados a 2µl de tampão de carregamento Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) e aplicados em um gel de agarose (UltraPure Agarose Invitrogen) 1,5% preparado com TBE 1x contendo 3µl de brometo de etídio (Bio-Rad) 10 mg/ml, à concentração final de 0.5 µg/ml. Foi utilizado o marcador de peso molecular (Invitrogen®) de 100 pb para comparação do tamanho das bandas. A eletroforese foi desenvolvida a 90V por aproximadamente 160 minutos e as bandas foram visualizadas através de iluminação ultravioleta no transluminador ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare).

3.7.6 Digestão enzimática do produto de 141 pb da região *hsp65* de *Mycobacterium sp.*

As amostras que evidenciaram produto de PCR compatível com 441pb foram submetidas à metodologia PRA (PCR- Amplification-Restriction Analysis), que consiste na digestão do DNA amplificado por PCR pelas enzimas de endorrestrição *BstEII* e *HaeIII*. Para a reação com enzimas de endorrestrição foram aliqotados dois volumes de 20µl do produto de PCR de cada amostra, para cada uma das enzimas a serem utilizadas. Este volume foi transferido para tubos de 0,2 ml, e a eles foram adicionados 3µl do tampão específico para cada enzima (buffer R 10X para *HaeIII* e buffer O 10X para *BstEII* (Fermentas®)), 2µl da enzima de digestão e 5µl de água ultra pure esterilizada, para um volume final de 30µl. As amostras a serem digeridas pela *HaeIII* foram incubadas a 37 °C por 18 horas, enquanto as amostras digeridas pela *BstEII* foram incubadas a 60 °C por 18 horas em banho seco (Thermo-Shaker, VHD®).

Os sítios de restrição das enzimas *HaeIII* e *BstEII* estão listados na tabela 9.

Tabela 9 - Sítios de restrição das enzimas empregadas no PRA (PCR- Amplification-Restriction Analysis).

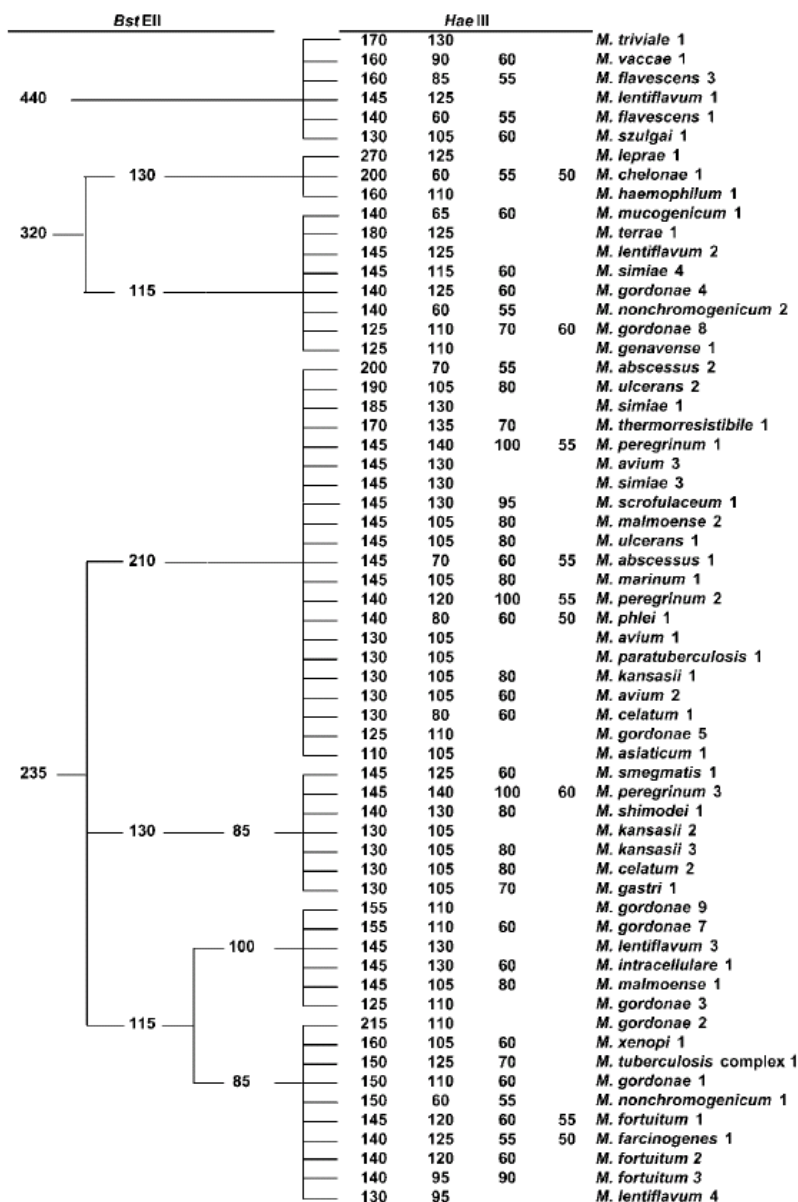
Enzima de restrição	Seqüência alvo	Sítio de restrição
<i>HaeIII</i>	5'...GGCC... 3' 3'...CCGG...5'	5'...GG▼CC...3' 3'...CC▼GG...5'
<i>BstEII</i>	5'...GGTNACC...3' 3'...CCANTGG...5'	5'...G▼GTNACC...3' 3'...CCANTG▼G...5'

Fonte: Elaborado pela autora. A letra N representa as bases nucleotídicas A, C, G ou T.

O resultado da digestão enzimática foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1000 (Invitrogen®) 4 % feito com 70 mL de tampão TBE 1X e 3,5µl de brometo de etídio a 10mg/mL no gel 2,5µl de brometo de etídio (Bio-Rad®) 10 mg/ml, à concentração final de 0.5 g/ml no tampão. Vinte microlitros do produto de digestão acrescidos a 7µl do tampão de carregamento Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) foram empregados na corrida eletroforética. A duração da corrida foi de aproximadamente 120 minutos em 110V.

Para cálculo do tamanho dos fragmentos, foi usado como referência os marcadores moleculares de 25pb e 50pb. As imagens foram capturadas no transiluminador ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®). A identificação foi finalizada comparando os tamanhos dos fragmentos digeridos com os padrões de bandas apresentados por cada espécie de micobactéria, encontrados no banco de dados eletrônico PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) e com os algoritmos descritos por Leão *et al.* 2004 (Figura 13) (ANEXO C) (CHIMARA *et al.*, 2008).

Figura 13 - Algoritmo de identificação dos padrões de PRA (Amplification-Restriction Analysis).



Fonte: Leão *et al.* (2004)

3.8 Análise dos dados

A análise dos dados do estudo constituiu de estatística descritiva através da apresentação dos dados por meio de tabelas para as variáveis descritivas e quadros de medidas descritivas (média, desvio padrão, mínimo e máximo) para as variáveis quantitativas. Os dados foram inseridos usando o Excel para Windows (versão 2007) e os testes de correlação executados no programa GraphPad Prism versão 5.01.

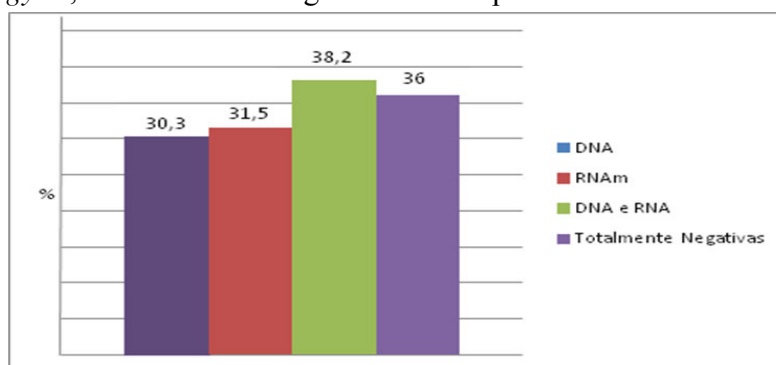
4 RESULTADOS

Durante o período de outubro de 2010 a setembro de 2012, foram coletadas amostras de água ambiental em 24 sítios localizados em quatro municípios do Ceará, sendo cinco em Juazeiro do Norte (J1-J5), quatro em Crato (C1-C4), oito em Sobral (S1-S8) e sete em Boa Viagem (B1-B7). De cada sítio, foram coletadas cinco amostras (réplicas) identificadas de “a” - “e”, totalizando 120 amostras. Estas amostras foram processadas com o propósito de avaliar a presença e viabilidade do bacilo de *M. leprae* causador da hanseníase, assim como a pesquisa de MNT através de técnicas de biologia molecular. Foram analisadas a região *gyrA* do genoma de *M. leprae* e *hsp65* do gênero *Mycobacterium*. Durante o transporte das amostras do município ao laboratório em Fortaleza, uma amostra do município de Boa Viagem (sítio B7d) foi danificada. Assim, este estudo totalizou 119 amostras dos quatro municípios.

4.1 Presença de ácidos nucleicos de *M. leprae* nas amostras analisadas

Das 119 amostras de água analisadas, 76 apresentaram positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae* (64%). Dentre a amostras positivas, 23 foram positivas apenas para DNA (30,3%), 24 apenas para RNAm (31,5%) e 29 positivas para ambos os ácidos nucleicos (38,2%) conforme ilustrado na figura 14.

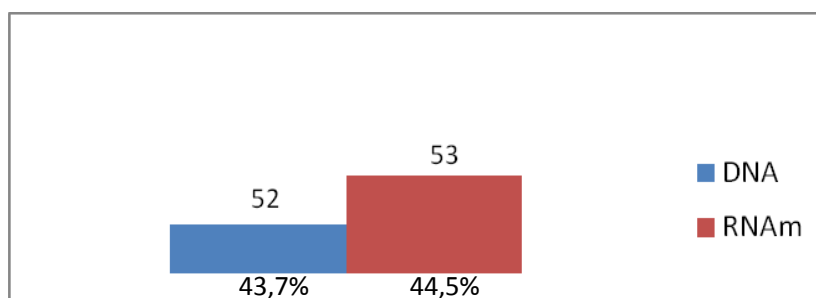
Figura 14 – Frequência de positividade de amplificação de ácidos nucleicos de *M. leprae*, região *gyrA*, nas amostras de água dos municípios estudados.



Fonte: Elaborado pela autora.

Logo, do total de 119 amostras analisadas, 52 (43,7%) amostras apresentaram positividade para DNA, enquanto que para o RNAm foram 53 (44,5%) amostras, assim, o RNAm apresentou maior porcentagem em relação ao DNA, quanto a amplificação da região *gyrA* de *M. leprae* (Figura 15).

Figura 15 – Frequência de positividade de amplificação de DNA e RNAm de *M. leprae*, região *gyrA*, nas amostras de água dos municípios estudados.



Fonte: Elaborado pela autora.

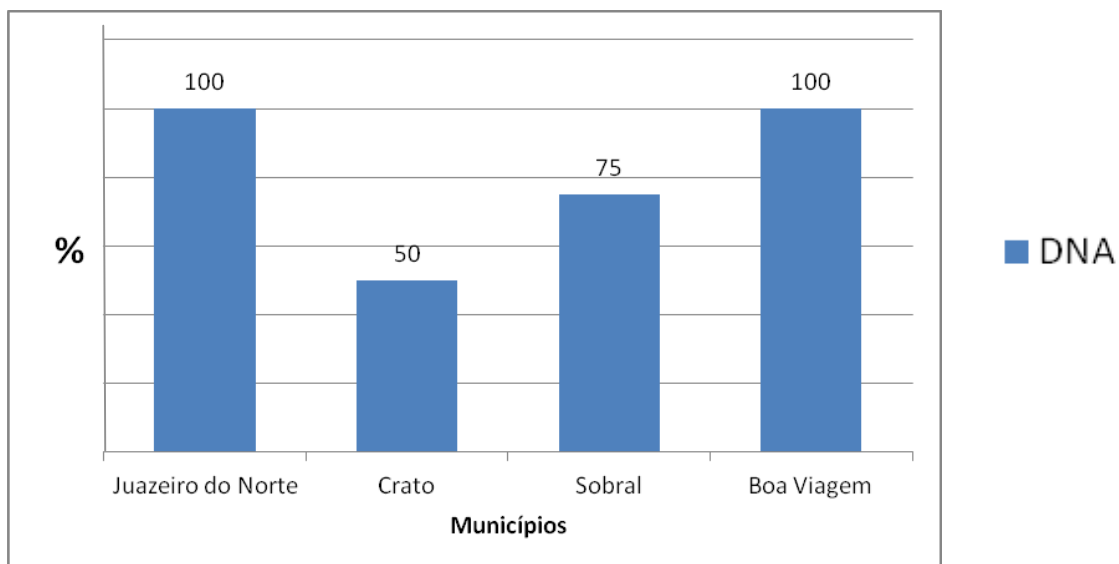
A amplificação dos ácidos nucleicos foi visualizada em gel de agarose 1% com obtenção do produto de 187pb referente ao gene *girA* do *M. leprae* (Figuras 23 e 24).

Dentre os municípios estudados, considerando os sítios de coleta, Juazeiro do Norte, com cinco sítios e Boa Viagem, com sete, foram os municípios que apresentaram DNA amplificado de *M. leprae* em todos os sítios de coleta (100%). Sobral apresentou positividade em seis dos oito sítios de coleta (75%) e dos quatro sítios de coleta analisados do município de Crato, dois apresentaram positividade (50%) (Figura 16).

Quanto ao RNAm, os municípios com maior prevalência foram Juazeiro do Norte e Crato com 100% de positividade cada um, seguido do município de Sobral com positividade em seis dos oito sítios de coleta analisados (75%). Por fim verificou-se a ocorrência de quatro sítios positivos dos sete pesquisados no município de Boa Viagem, com um percentual de 57,14% (Figura 17).

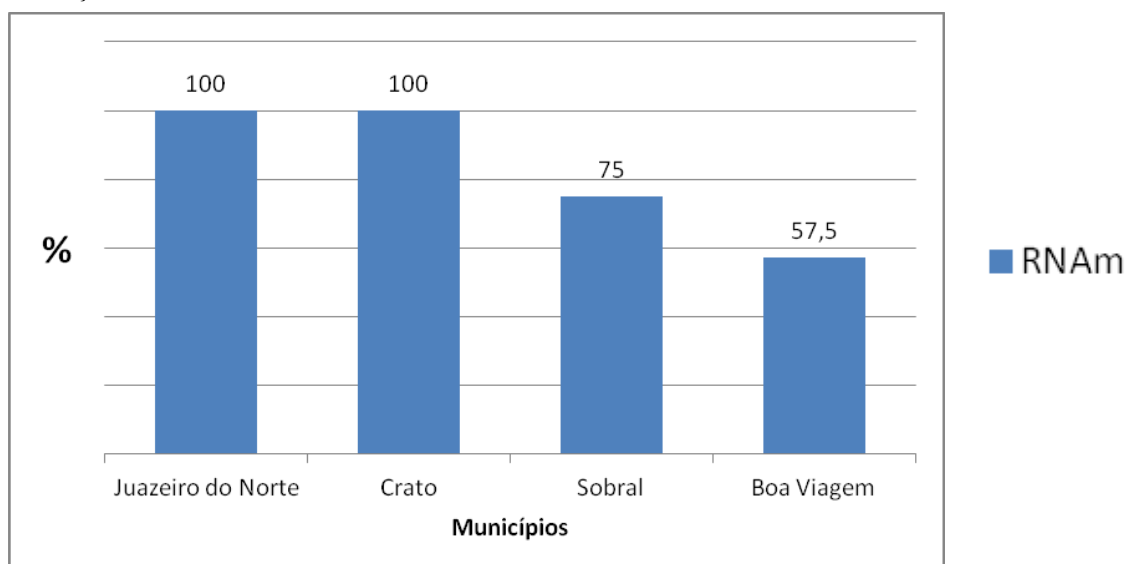
Logo, o município com maior positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae* foi o município de Juazeiro do Norte.

Figura 16 – Frequência da amplificação da região *gyrA* do DNA de *M. leprae* em águas ambientais coletadas nos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem em relação aos sítios de coleta.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 – Frequência da amplificação da região *gyrA* referente ao RNAm de *M. leprae*, em águas ambientais coletadas nos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem em relação aos sítios de coleta.

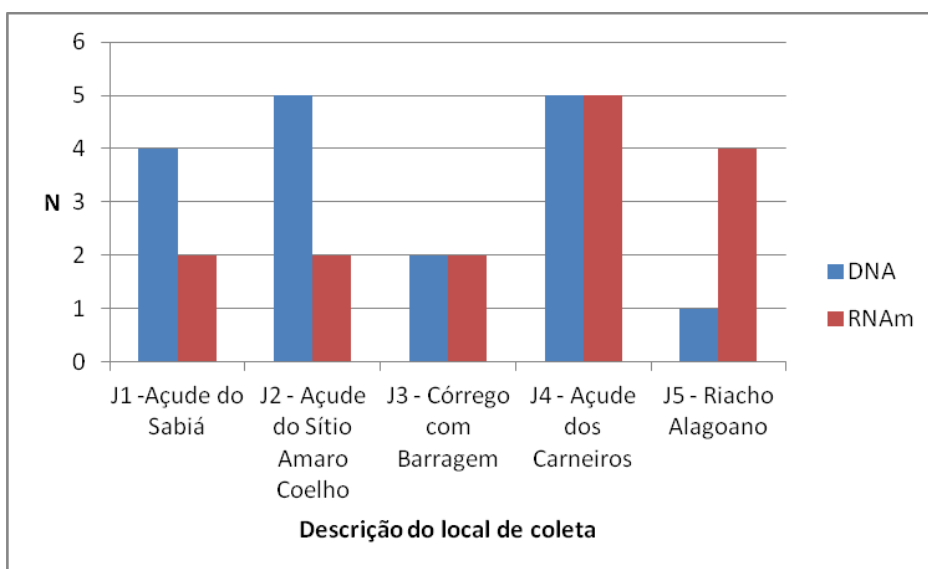


Fonte: Elaborado pela autora.

Nas figuras 18 a 21 estão apresentadas as frequências de amplificação referente ao DNA e RNAm de *M. leprae* de cada sítio por município individualmente com suas respectivas fontes identificadas.

Em relação à positividade quanto ao número total de amostras coletadas em cada município, considerando o número de cinco amostras por sítio, Juazeiro do Norte, com um total de 25 amostras, apresentou 17 amostras positivas (68%) para o DNA e 15 amostras positivas (60%) para o RNAm de *M. leprae* (Figura 18).

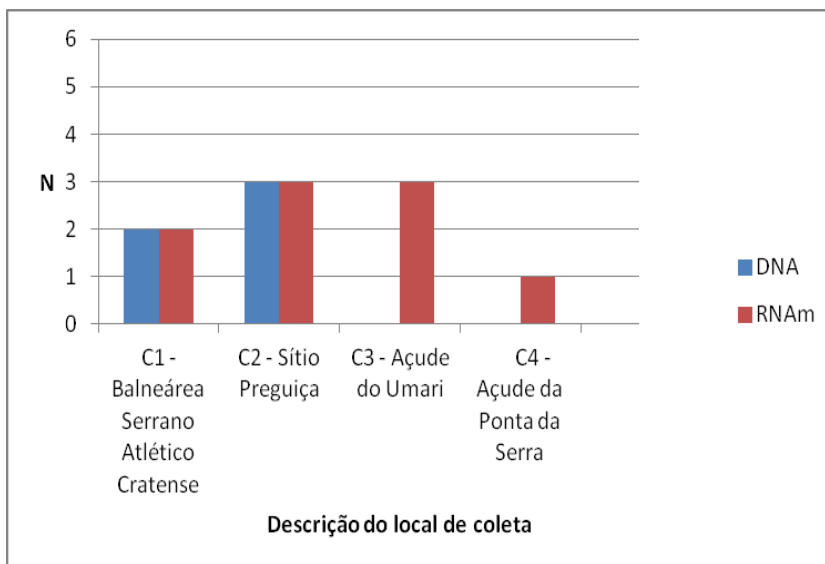
Figura 18 – Frequência de DNA e RNAm de *M. leprae* nos cinco sítios de coleta do município de Juazeiro do Norte, Ceará, em novembro de 2010.



Fonte: Elaborado pela autora

Das 21 amostras do município de Crato, cinco (25%) foram positivas para o DNA e nove (45%) para o RNAm de *M. leprae* (Figura 19).

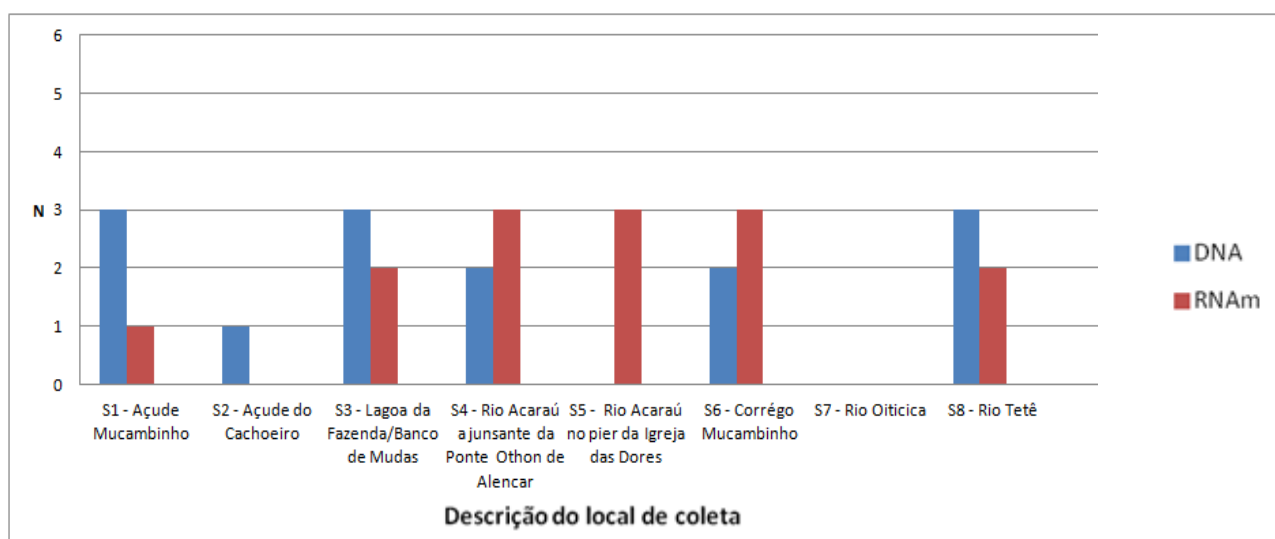
Figura 19 – Frequência de DNA e RNAm de *M. leprae* nos quatro sítios de coleta do município de Crato, Ceará, em novembro de 2010.



Fonte: Elaborado pela autora

Sobral apresentou 14 (35%) amostras positivas para DNA e 15 amostras (37,5%) para RNAm de *M. leprae* de um total de 40 amostras (Figura 20).

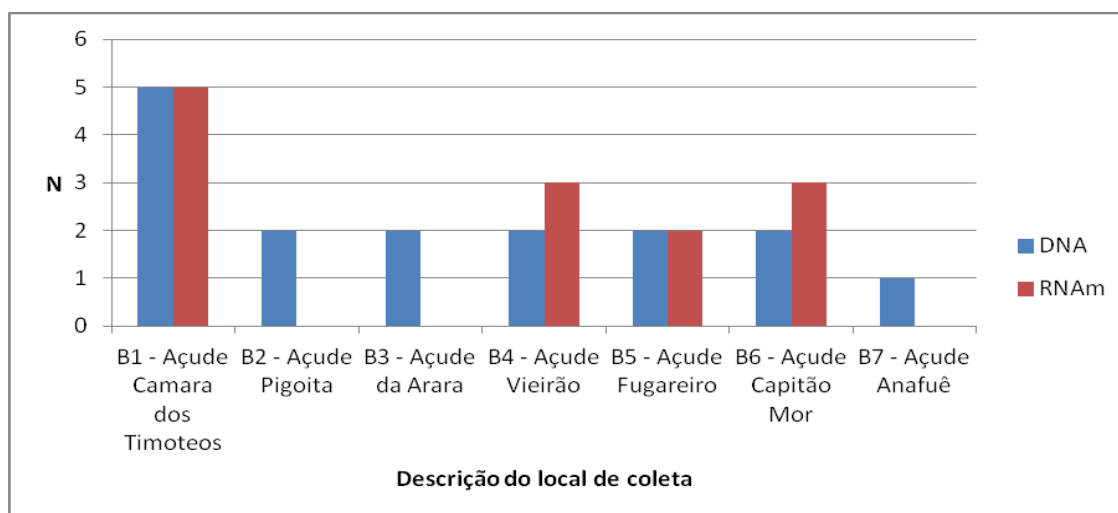
Figura 20 – Frequência de DNA e RNAm de *M. leprae* nos oito sítios de coleta do município de Sobral, Ceará, em outubro de 2011.



Fonte: Elaborada pela autora

Boa Viagem apresentou positividade para o DNA em 16 (47%) amostras das 34 analisadas e 14 amostras positivas para o RNAm (57,2%) de *M. leprae* (Figura 21).

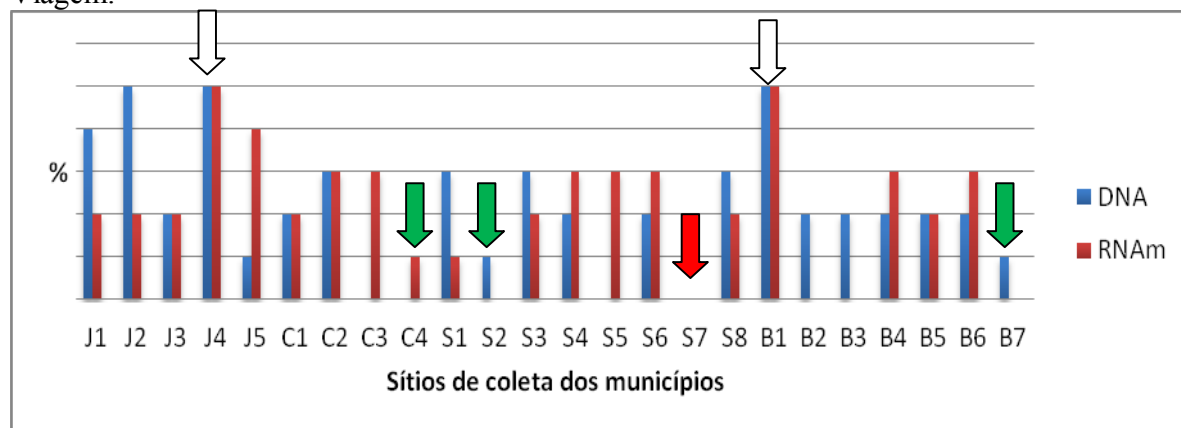
Figura 21 – Frequência de DNA e RNAm de *M. leprae* nos sete sítios de coleta do município de Boa Viagem, Ceará, em setembro de 2012.



Fonte: Elaborada pela autora

Entre os sítios estudados, dois sítios de diferentes municípios apresentaram positividade para DNA e RNAm nas cinco amostras analisadas, sendo os sítios J4 de Juazeiro do Norte e B1 de Boa Viagem, respectivamente. Por outro lado, os sítios C4, S2 e B7 apresentaram baixa positividade como pode ser observado na figura 22.

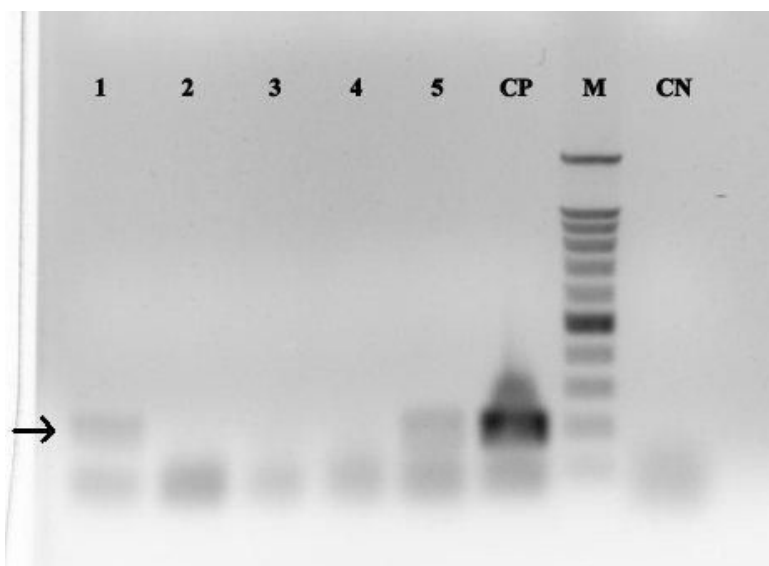
Figura 22 – Amplificação da região *gyrA* referente ao DNA e RNAm de *M. leprae* em relação as cinco réplicas por sítios nos municípios Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem.



Fonte: Elaborada pela autora. Setas brancas: indicam 100% de positividade para DNA e RNAm; Setas verdes: indicam sítios de positividade mais baixas; e, Seta Vermelha: Indica ausência de positividade para ambos.

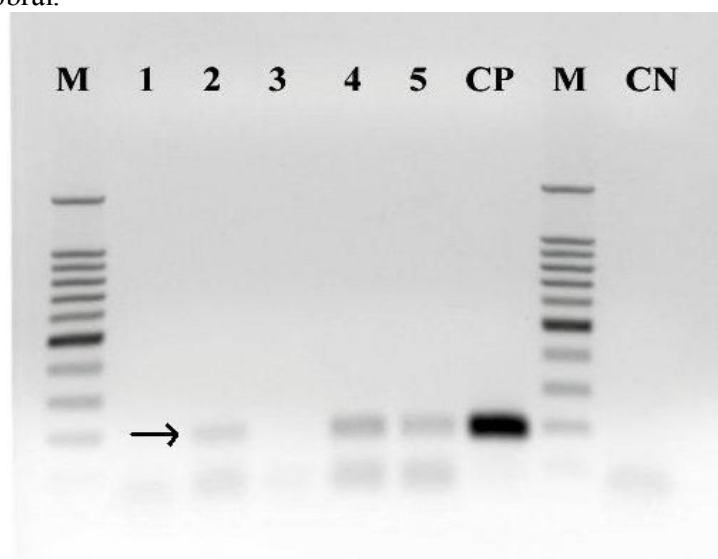
A amplificação dos ácidos nucleicos foi visualizada em gel de agarose 1% com obtenção do produto de 187pb referente ao gene *girA* do *M. leprae* (Figuras 23 e 24).

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1% para identificação do DNA de *M. leprae* com os pares de *primers gyrA-Forward* e *gyrA-Reverse* (Invitrogen) no ponto de coleta 6 do município de Sobral.



Fonte: Elaborada pela autora. Eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) de produtos de 187pb da amplificação do gene *gyrA* do *M. leprae*. Os poços 1 a 5 representam as amostras de águas ambientais. Os poços 1 e 5 representam as amostras que apresentaram positividade. Os poços 6 e 8 representam os controles positivo (CP) (biópsia de pacientes com hanseníase 1:2) e negativo (CN), respectivamente. O poço 7 contém 6,0 μ L do marcador (M) de peso molecular de 100pb (Promega). Foto obtida por uso de transluminador de luz ultravioleta (ImageQuant GE HealthCare).

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1% para identificação do RNAm de *M. leprae* com os pares de *primers gyrA-Forward* e *gyrA-Reverse* (Invitrogen) no ponto de coleta 6 do município de Sobral.



Fonte: Elaborada pela autora. Eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) de produtos de 187pb da amplificação do gene *gyrA* do *M. leprae*. Os poços 1 a 5 representam as amostras de águas ambientais. Os poços 6 e 8 representam os controles positivo (CP) (biópsia de pacientes com hanseníase 1:2) e negativo (CN), respectivamente. Os poços identificados com "M" contêm 6,0 μ L do marcador de peso molecular de 100pb (Promega). Foto obtida por uso de transluminador de luz ultravioleta (ImageQuant GE HealthCare).

4.2 Confirmação dos ácidos nucleicos de *M. leprae* por sequenciamento

O produto de DNA das amostras de água dos sítios de coleta J1 e S1 de Juazeiro do Norte e Sobral, ambos a réplica "a", foram submetidas ao sequenciamento, e de acordo com a figura 25 foi confirmada a amplificação da região *gyrA* de *M. leprae* nas amostras de água analisadas.

Essas amostras foram escolhidas para o sequenciamento por serem de diferentes municípios e, também por apresentaram positividade tanto para a pesquisa de DNA quanto para a de RNAm do bacilo da hanseníase.

Em seguida foi realizado o BLAST da região sequenciada do gene *gyrA* de *M. leprae* das mesmas amostras acima relacionadas, onde foi alinhada com a referência do *M. leprae* BR4923 no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Br4923 GenBank: FM211192.1) onde foi observado 100% de similaridade quanto ao fragmento analisado (Figuras 26).

Figura 25 - Eletroferograma de sequenciamento do fragmento de 187 pb do gene *gyrA* de *M. leprae* das amostras de água J1a e S1a.

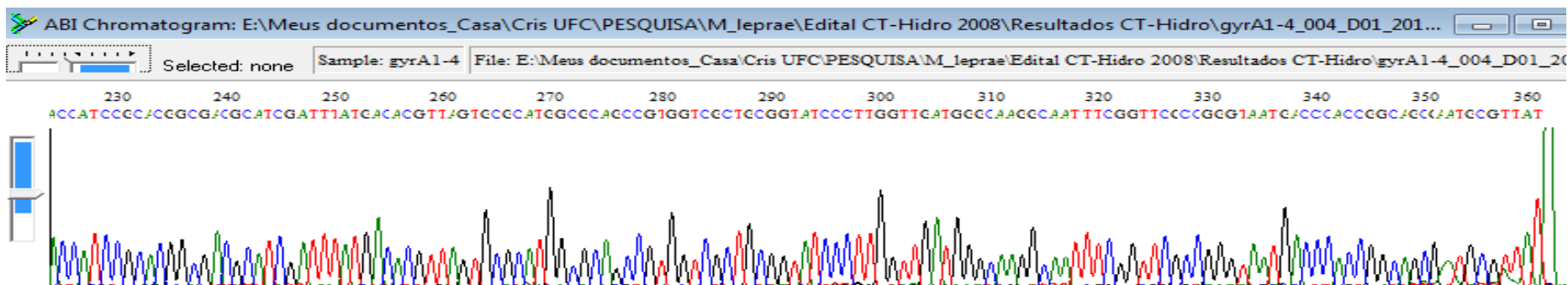
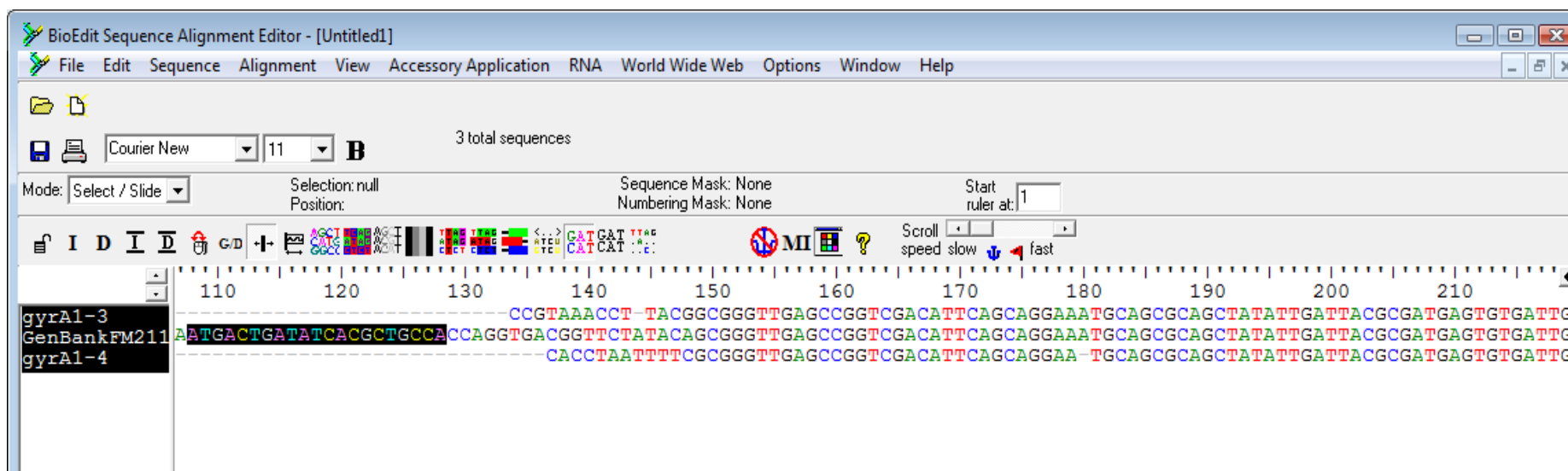


Figura 26 - Alinhamento do sequenciamento do gene *gyrA* de *M. leprae* das amostras de água J1a e S1a com a referência de *M. leprae* (Br4923 GenBank: FM211192.1) no NCBI.



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 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.

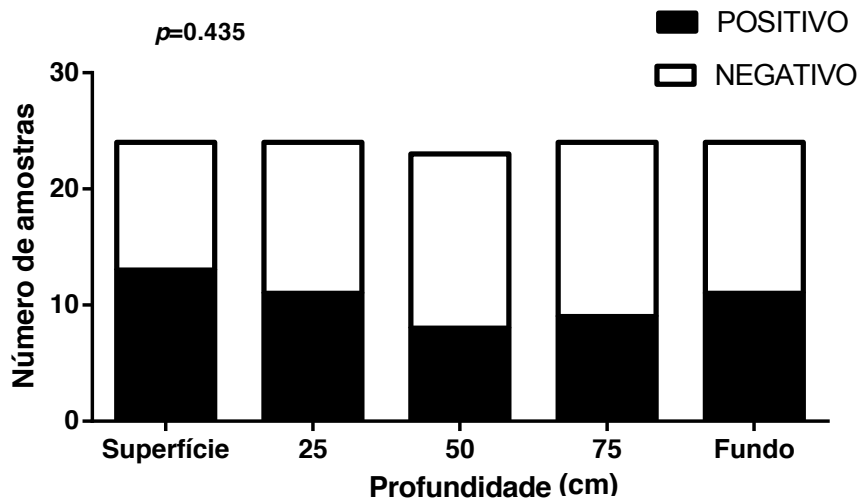
Quanto a profundidade, a tabela 10 apresenta uma análise de associação entre positividade para DNA e RNAm e a profundidade de coleta das amostras de água em todos os municípios estudados. Não houve diferença significativa na frequência de positividade tanto para DNA quanto para RNAm em relação à profundidade em que a amostra foi colhida ($p>0.05$). As figuras 27 e 28 expõem esses resultados de forma descritiva.

Tabela 10 - Relação entre positividade para DNA e RNAm e profundidade de coleta das amostras de água nos diferentes municípios em estudo.

Município	DNA			mRNA		
	Positivo (n)	Negativo (n)	<i>p</i>	Positivo (n)	Negativo (n)	<i>p</i>
<i>Juazeiro</i>						
Superfície	4	1	0.762	3	2	0.564
25cm	3	2		2	3	
50cm	3	2		3	2	
75cm	4	1		4	1	
100cm	3	2		3	2	
<i>Crato</i>						
Superfície	1	3	0.615	1	3	0.75
25cm	1	3		3	1	
50cm	1	3		1	3	
75cm	0	4		2	2	
100cm	2	2		2	2	
<i>Sobral</i>						
Superfície	4	4	0.815	2	6	0.339
25cm	2	6		2	6	
50cm	2	6		3	5	
75cm	3	5		2	4	
100cm	3	5		4	4	
<i>Boa viagem</i>						
Superfície	4	3	0.231	3	4	0.808
25cm	5	2		2	5	
50cm	2	4		4	2	
75cm	2	5		1	6	
100cm	3	4		4	3	

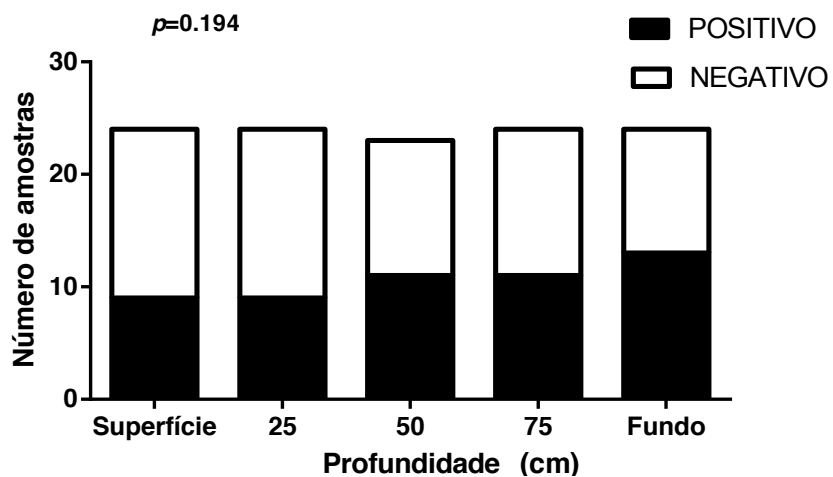
Teste Qui-Quadrado. Superfície, amostras designadas pela letra “a”; 25 cm, amostras designadas pela letra “b”; 50 cm, amostras designadas pela letra “c”; 75 cm, amostras designadas pela letra “d”; Fundo, amostras designadas pela letra “e”.

Figura 27 – Positividade de DNA quanto a profundidade da coleta das réplicas em todos os sítios analisados.



Fonte: Graphpad Prims.

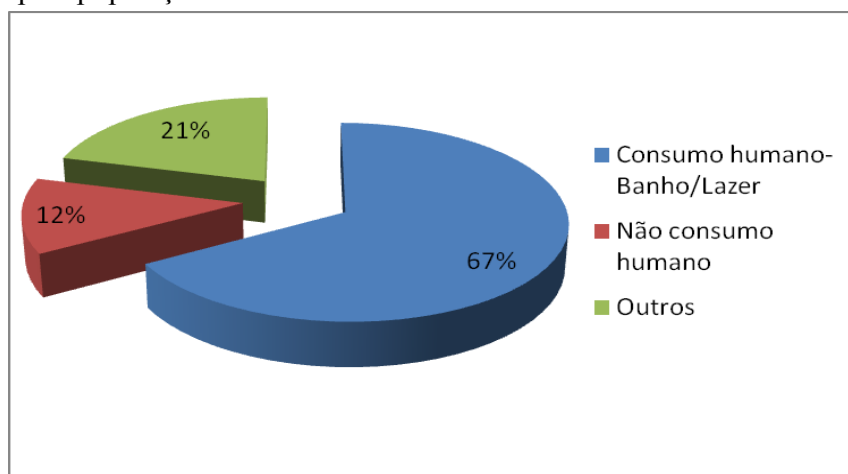
Figura 28 – Positividade de RNAm quanto a profundidade da coleta das réplicas em todos os sítios analisados.



Fonte: Graphpad Prims.

Dos 24 pontos de coleta pesquisados, 16 deles estavam envolvidos em atividades de banho/lazer e consumo humano, três locais não eram utilizados para consumo humano e os outros cinco locais estavam envolvidos em outras atividades (pesca, dessedentação¹ de animais, abastecimento de sede, associado às atividades de uma olaria² ou como escoamento de rede de esgoto das casas) como demonstrados nas figuras 29 e 30.

Figura 29 – Distribuição dos pontos de coleta dos municípios pelas atividades nos quais são empregados pela população.



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 30 – Demonstração do uso da água.



Fonte: elaborada pela autora. Açude Ponta da Serra e Açude do Umari – Crato – Ce.

¹ Dessedentar – saciar a sede. (Dicionário online de português (<http://www.dicio.com.br/dessedentar/>)).

² Olaria – Local onde se fabricam tijolos, telhas, manilhas e vasilhame de barro (panelas, moringas etc.). (Dicionário online de português (<http://www.dicio.com.br/olaria/>)).

4.3 Condições ambientais dos locais de coletas com a positividade dos ácidos nucleicos

Quanto às condições ambientais dos sítios de coleta, fazendo uma média geral dos valores de cada sítio, observou-se que os sítios do município de Boa Viagem apresentaram uma maior Condutividade Elétrica, 588,7 μ S/cm e também um pH mais elevado de 8,63. Se compararmos os quatro municípios, podemos observar que os municípios de Juazeiro do Norte e Boa Viagem apresentaram condições ambientais mais próximas quando comparadas aos demais (Tabela 11).

Tabela 11 – Características físico-químicas dos sítios de coleta no momento em que foi realizada a coleta das amostras por município.

Ponto de Coleta	Variáveis ambientais		
	Condutividade elétrica (μ S/cm)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	pH
Juazeiro do Norte 1	862	26,9	8,04
Juazeiro do Norte 2	370	28,7	9,49
Juazeiro do Norte 3	343	27,4	7,45
Juazeiro do Norte 4	218	28,9	8,04
Juazeiro do Norte 5	242	25,3	7,28
Média Juazeiro	407	27,4	8,06
Crato 1	14,12	27,9	6,04
Crato 2	41,8	24,6	7,00
Crato 3	200	29,2	9,14
Crato 4	744	31,2	6,78
Média Crato	249,9	28,2	7,24
Sobral 1	650	30,4	8,24
Sobral 2	333	30	8,40
Sobral 3	900	30,5	7,04
Sobral 4	240	29	7,40
Sobral 5	230	32	7,60
Sobral 6	1160	32,8	6,70
Sobral 7	1270	36	10,2
Sobral 8	239	31,5	7,70
Média Sobral	627,7	31,5	7,91
Boa Viagem 1	661	27,6	8,91
Boa Viagem 2	454	28,5	8,71
Boa Viagem 3	777	30,5	7,98
Boa Viagem 4	491	27	8,26
Boa Viagem 5	578	26,3	9,08
Boa Viagem 6	690	27,4	8,68
Boa Viagem 7	470	31,5	8,85
Média Boa Viagem	588,7	27,81	8,63

Fonte: Elaborado pela autora

Na análise estatística das condições ambientais com a positividade para DNA e RNAm de *M. leprae* nos municípios estudados pôde ser observada uma associação entre positividade destes ácidos nucleicos e as condições ambientais em todos os municípios em estudo. Observou-se que, de modo geral, em todos os municípios, os sítios que apresentaram positividade para DNA apresentaram valor médio de temperatura mais baixo ($28.4 \pm 0.27^{\circ}\text{C}$) em relação as negativas ($29.5 \pm 0.35^{\circ}\text{C}$) ($p < 0.05$). Padrão semelhante foi encontrado nos sítios com positividade para RNAm, que apresentaram valor médio de temperatura de $28.3 \pm 0.31^{\circ}\text{C}$ enquanto que as negativas apresentaram $29.8 \pm 0.34^{\circ}\text{C}$ ($p < 0.05$). Os pontos de coletas com maior positividade para RNAm também apresentaram menor condutividade elétrica ($452.9 \pm 42.3 \mu\text{S/cm}$) quando comparados com os negativos ($551.7 \pm 41.2 \mu\text{S/cm}$) ($p < 0.05$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Relação entre positividade para DNA e mRNA e condições ambientais em todos os sítios em estudo.

	Condições ambientais					
	Condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$)	<i>P</i>	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	<i>P</i>	pH	<i>P</i>
<i>Positividade para DNA</i>						
Positivo	494.7 ± 40.6	0.478	28.4 ± 0.27	0.01*	8.06 ± 0.12	0.382
Negativo	517.8 ± 42.9		29.5 ± 0.35		8.01 ± 0.13	
<i>Positividade para RNAm</i>						
Positivo	452.9 ± 42.3	0.041*	28.3 ± 0.31	0.01*	7.91 ± 0.12	0.098
Negativo	551.7 ± 41.2		29.8 ± 0.34		8.14 ± 0.12	

Teste Mann Whitney

Ainda com relação as condições ambientais, a tabela 13 apresenta uma análise de associação entre as condições ambientais dos sítios fortemente positivos para DNA e mRNA (J4 e B1) e as dos sítios fortemente negativos (C4, S2 e B7). Observou-se que os sítios fortemente positivos apresentaram valor médio de temperatura mais baixo ($28.25 \pm 0.21^{\circ}\text{C}$) em relação aos sítios fortemente negativos ($30.83 \pm 0.19^{\circ}\text{C}$) ($p < 0.05$). Não houve diferença significativa para as demais condições ambientais.

Tabela 13 - Relação entre as condições ambientais dos sítios fortemente positivos para DNA e mRNA (J4 e B1) e as dos sítios fortemente negativos (C4, S2 e B7).

Sítios	Condições ambientais					
	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	<i>P</i>	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	<i>p</i>	pH	<i>P</i>
Sítios fortemente positivos (J4 e B1)	439.5 \pm 73.8		28.25 \pm 0.21		8.47 \pm 0.14	
Sítios fortemente negativos (C4, S2 e B7)	501.6 \pm 49.4	0.111	30.83 \pm 0.19	<0.0001*	8.04 \pm 0.24	0.222

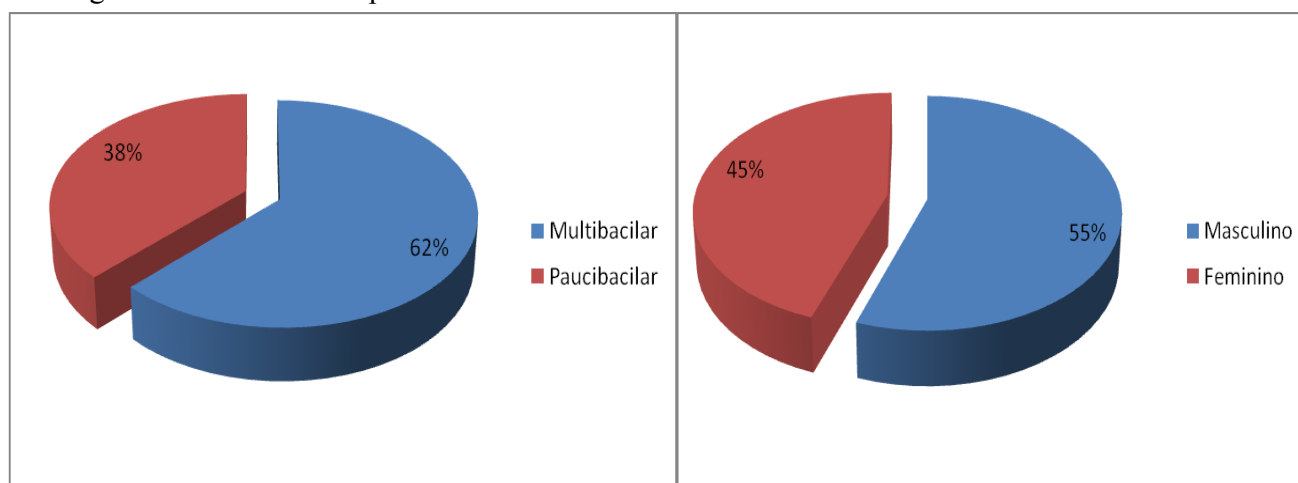
Resultados expressos em Média \pm erro padrão da média (EPM). Teste Mann Whitney. * $p < 0.05$.

O apêndice J mostra em forma de tabela todos os dados referente as condições ambientais, consumo, profundidade e positividade para DNA e RNAm.

4.4 Características dos pacientes com hanseníase no município de Sobral e sua relação com a detecção de *M. leprae* nas amostras de água

O município de Sobral apresentou 85 casos novos de pacientes portadores de hanseníase diagnosticados em 2011, destes 53 (62%) são da forma clínica MB e 32 (38%) PB. Quanto ao sexo dos pacientes, 47 (55%) casos são do sexo masculino e 38 (45%) do sexo feminino (Figura 31).

Figura 31 – Frequência da forma clínica e do sexo entre os novos casos de hanseníase diagnosticados no município de Sobral no ano de 2011.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação ao georeferenciamento do domicílio desses pacientes com a proximidade dos locais de coleta, dos 85 pacientes portadores de hanseníase, 43 (50,9%) residem próximo aos locais de coleta de água. O sítio que apresentou maior número de hansenianos em sua proximidade foi o sítio seis (S6) com 12 casos, seguido do sítio sete (S7) com 11 casos. O sítio cinco (S5) apresentou seis casos, os sítios três (S3) e quatro (S4) com cinco casos cada um e os sítios um (S1) e oito (S8) com dois casos cada um, respectivamente. O sítio dois (S2) não apresentou nenhum caso em sua proximidade. A figura 32 mostra o georeferenciamento da localização dos portadores de hanseníase com a proximidade em um raio de 1000 metros dos pontos de coletas. No apêndice K esses dados são descritos em forma de tabela. No anexo D a figura em tamanho ampliado.

Quando se compara a quantidade de pacientes com a proximidade dos pontos de coleta é possível observar que o sítio S6, que apresentou 12 pacientes em sua proximidade foi também um dos sítios com maior positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae* no município de Sobral, com três e duas amostras positivas para RNAm e DNA, das cinco coletadas. Por outro lado, o sítio S7 que também apresentou muitos pacientes em suas proximidades (11 casos) não apresentou nenhuma amostra positiva para DNA ou RNAm. Esses resultados coincidem com os dados já citados anteriormente quanto ao uso da água de cada sítio. De acordo com estes, o sítio S6 encontra-se entre aqueles usados para consumo humano, enquanto que o S7 não é usado para este fim. Já o sítio S2 não apresentou nenhum portador de hanseníase na distância estipulada, assim como também, só apresentou uma amostra positiva para DNA. Nos outros sítios analisados, não foi possível observar significância relevante.

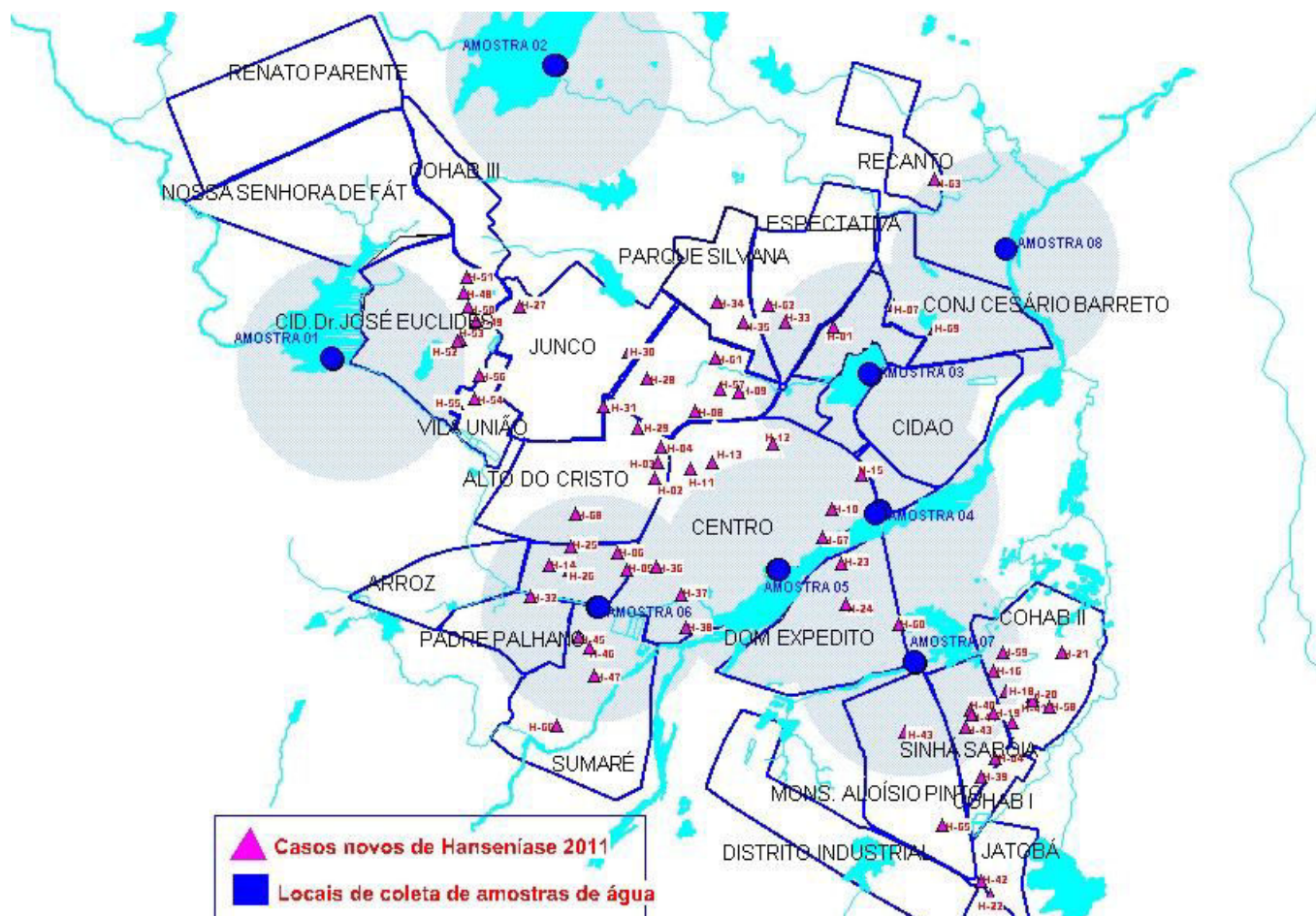
A tabela 14 apresenta uma análise de associação com os 43 pacientes que residem próximo aos sítios de coletas, entre as formas clínicas (MB e PB) e o sexo na população estudada em Sobral. Observou-se que 70% dos pacientes com a forma clínica MB eram do sexo masculino e 60% dos pacientes com a forma clínica PB eram do sexo feminino, no entanto essa diferença não apresentou significância considerável ($p=0.055$).

Tabela 14 - Relação entre as formas clínicas (MB e PB) e o sexo na população estudada em Sobral para os pacientes que residem próximo aos locais de coletas.

Forma clínica	Sexo		P
	Feminino (n / %)	Masculino (n / %)	
MB	8 / 30%	19 / 70%	0.055
PB	9 / 60%	6 / 40%	

Teste de Fisher

Figura 32 – Georeferenciamento da cidade de Sobral com os locais de coleta e a localização dos pacientes diagnosticados no ano de 2011.



Fonte: Secretária de Saúde de Sobral, Ce. Os sítios de coletas estão identificados como “amostra”.

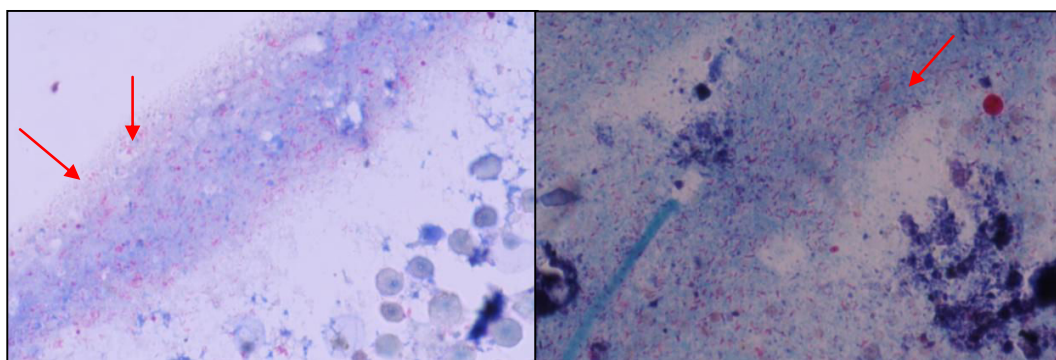
4.5 Identificação de micobactérias não tuberculosas

4.5.1 Análise das lâminas de sedimento

Todas as 119 amostras de água dos 24 sítios de coleta dos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem foram centrifugadas diretamente para obtenção do sedimento os quais foram submetidas a coloração de Ziehl-Neelsen e Gram.

Do total de sedimentos analisados, somente as 40 lâminas das amostras de água do município de Sobral coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR+) indicando presença de micobactérias em todas as amostras de água coletadas. Os bacilos foram observados em grande quantidade especialmente nas bordas das lâminas (figura 33).

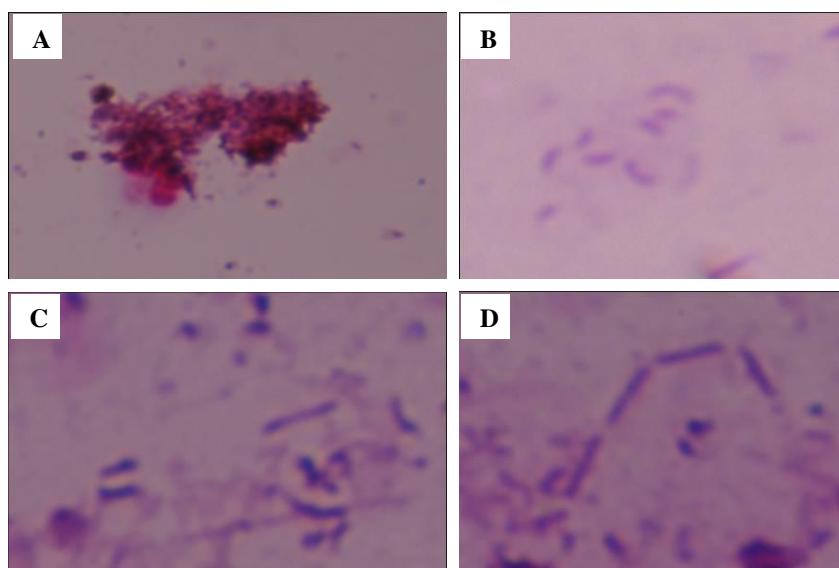
Figura 33 - Amostras de sedimento de água ambientais coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, evidenciando a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).



Fonte: Elaborado pela autora. Nikon D-60, aumento de 1000X.

A análise de algumas das lâminas submetidas a coloração de Gram evidenciaram a grande diversidade dos microorganismos que coexistiam com BAAR no ambiente, como cadeias de cocos Gram-positivos, espiroquetas Gram-negativas, bacilos Gram-positivos e Gram-negativos. As lâminas também evidenciaram a presença de leveduras na água (Figura 34).

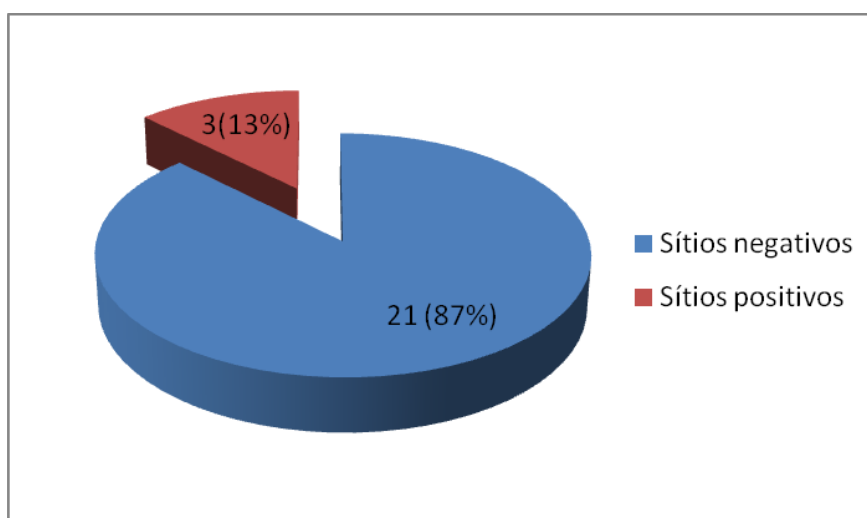
Figura 34 - Amostras de sedimento de água ambientais evidenciando a diversidade de microorganismos observados através da técnica de Gram.



Fonte: elaborado pela autora. A: Leveduras. B: Bacilos Gram-negativos. C: Bacilos Gram-positivos. D: bacilos Gram-positivos. Nikon D-60, aumento de 1000X.

Assim como para a obtenção do sedimento, todas as 119 amostras dos 24 sítios de coletas foram submetidas ao método de descontaminação e cultivo para identificação de micobacterias não tuberculosas. Cada amostra foi inoculada à 37°C e 30°C em duplicata em tubos de ágar Lowenstein-Jensen. Somente no município de Sobral houve crescimento de MNT, sendo observado em apenas três sítios de coleta (S4, S5e S6) (12,5%) (Figura 35).

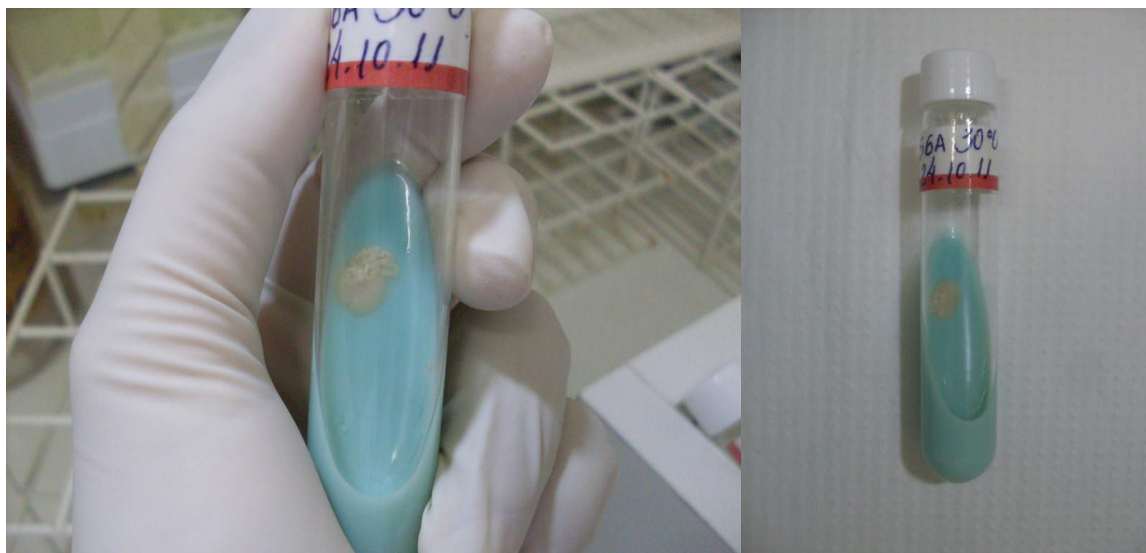
Figura 35: Percentual de positividade de cultivo de MNT nos 24 sítios de coletas referentes aos municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa Viagem.



Fonte: Elaborado pela autora.

De cada colônia foram anotados os dados relativos ao crescimento bacteriano (Figura 36).

Figura 36 – Cultivo apresentando crescimento de micobactérias em ágar Lowenstein-Jensen.



Fonte: Elaborada pela autora. Cultivo de micobactérias à 30 °C em ágar Lowenstein-Jensen.

As características das colônias cultivadas em meio Agar Lowenstein-Jensen são apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Descrição das características das colônias cultivadas em ágar Lowenstein-Jensen à 37°C e 30°C.

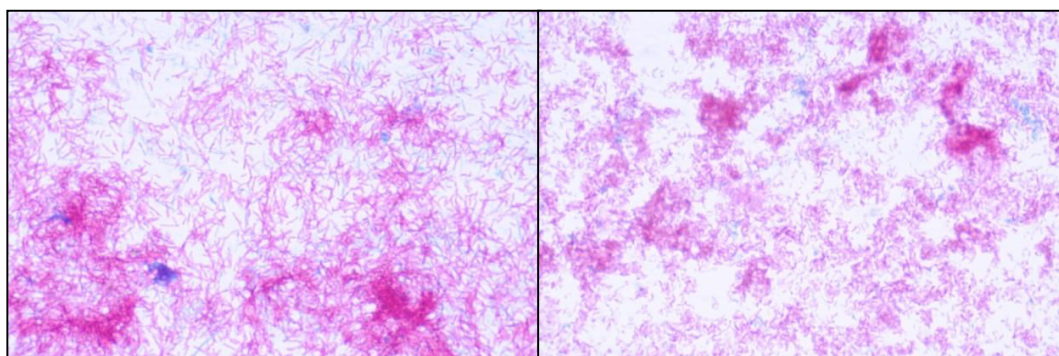
Local de coleta	Tubo de cultura	Classificação	Descrição da colônia
S4	a 37°C 1ª D	MCL	Cor amarelo pálido, forma irregular, aspecto liso
	b 37°C 1ª D	MCL	Cor amarelo intenso, forma irregular, aspecto rugoso, alto relevo
	c 30°C 1ª D	MCR	Cor amarelo intenso, arredondada, aspecto liso, alto relevo
	c 30°C 2ª D	MCR	Cor amarelo pálido, forma irregular, aspecto liso
	d 37°C 1ª D	MCL	Cor amarelo intenso, forma irregular, aspecto liso
	d 37°C 2ª D	MCL	Cor amarelo pálido, forma irregular, aspecto liso
	e 30°C 1ª D	MCR	Cor amarelo pálido, forma irregular, aspecto liso, alto relevo
S5	d 30°C 1ª D	MCR	Cor amarelo intenso, forma irregular, aspecto liso
S6	a 30°C 1ª D	MCR	Cor amarelo pálido, arredondada, aspecto liso, alto relevo
	a 30°C 2ª D	MCR	Cor amarelo pálido, arredondada, aspecto rugoso, alto relevo
	a 37°C 1ª D	MCL	Cor amarelo pálido, forma irregular, aspecto rugoso, alto relevo
	a 37°C 2ª D	MCL	Cor amarelo pálido, forma irregular, aspecto rugoso
	c 37°C 1ª D	MCL	Cor amarelo intenso, forma irregular, aspecto rugoso
	e 30°C 1ª D	MCR	Cor marrom, arredondada, aspecto liso

Fonte: Elaborada pela autora. Na primeira coluna, identificação do tubo de meio de cultura, constando o município de coleta (S – Sobral). Na segunda coluna, a réplica da amostra que mostrou crescimento (denominada por letras minúsculas do alfabeto, indo de “a” a “e”), a temperatura de incubação a que a cultura (Continuação da legenda) estava submetida (30 ou 37 °C) e a duplicata (D) em que houve crescimento (1ª ou 2ª). Na terceira coluna, classificação das colônias em micobactérias de crescimento rápido (MCR) ou micobactérias de crescimento lento (MCL). A quarta coluna mostra a descrição morfológica da colônia. Fonte: Elaborado pela autora.

Visando a confirmação do crescimento de micobactérias, a preparação de lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen a partir das 14 colônias crescidas em L-J permitiu a confirmação de BAAR em 13 tubos de meio de cultura. A colônia do tubo negativo para micobactérias (identificada como S6e30°C1^aD, representada na última linha da tabela 6), apresentou características morfo-tintoriais de bacilos Gram-positivos esporulados, semelhantes aos do gênero *Bacillus sp.*

A Figura 37 mostra BAAR coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen de colônias cultivadas em Lowestein-Jensen.

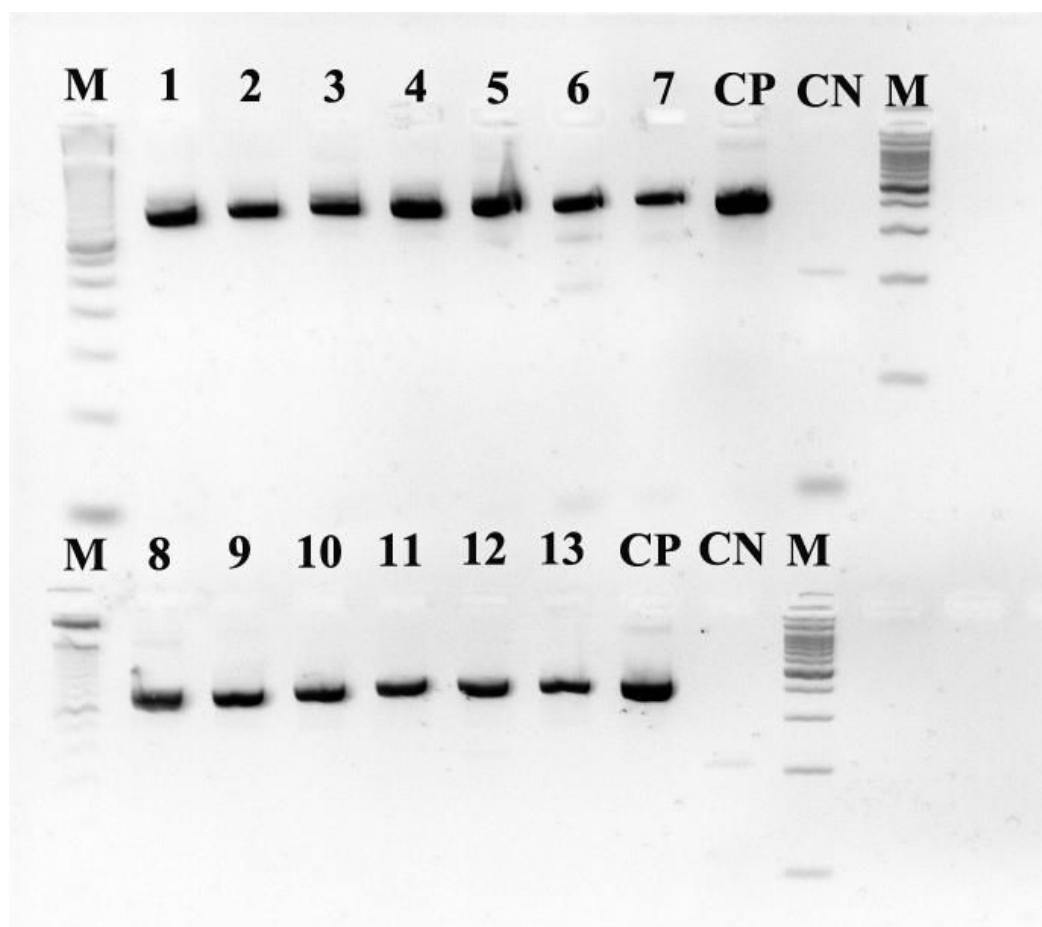
Figura 37 - Amostras de colônias cultivadas em ágar Lowenstein-Jensen de águas ambientais coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, evidenciando a presença de somente bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).



Fonte: Elaborada pela autora. Nikon D-60, aumento de 1000X.

O DNA das 13 colônias de micobactérias foi extraído e submetido à amplificação da região *hsp65*, de 441 pb. A figura 38 mostra o resultado da PCR, visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio.

Figura 38 – Amplificação por PCR da região *hsp65* visualizada em gel de agarose (Invitrogen) à 1,5%.



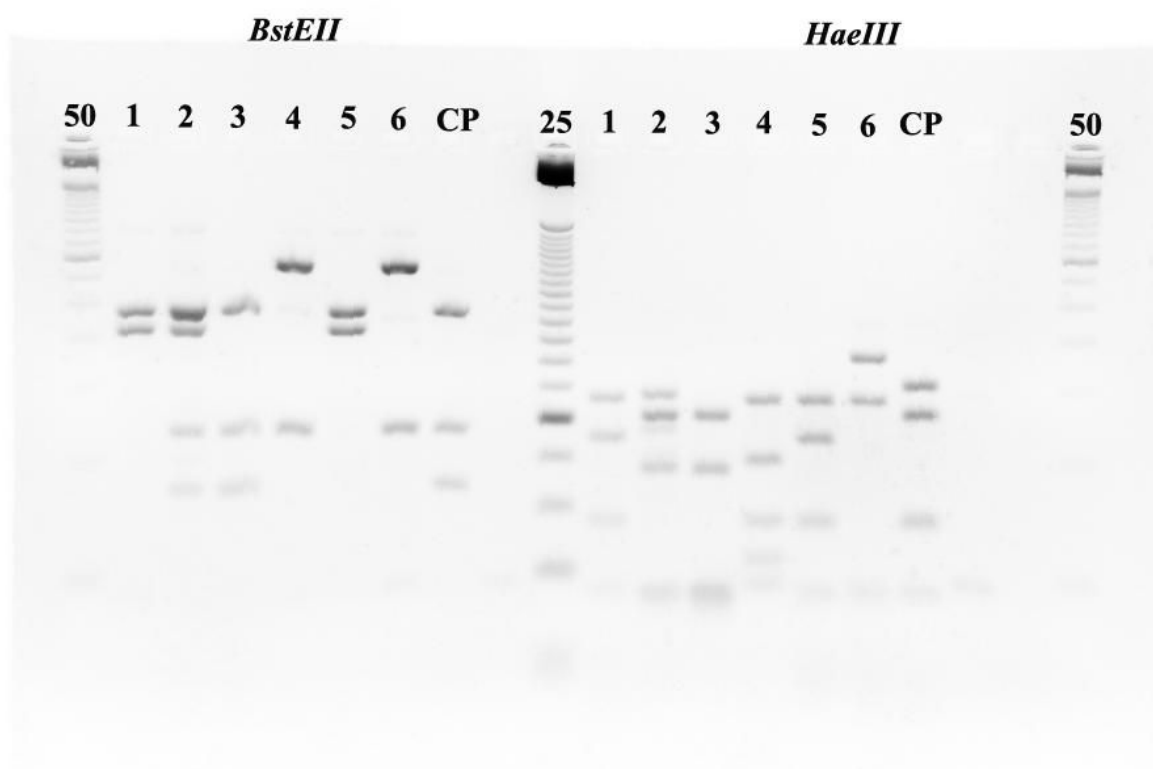
Fonte: Elaborado pela autora. Eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) de produtos de 441 pb. M: marcador de 100 pb. CP: controle positivo (DNA de *Mycobacterium tuberculosis*). CN: controle negativo (água destilada estéril). Poços de 1 a 13: DNA das colônias de micobactérias. Foto obtida por uso de transluminador de luz ultravioleta (ImageQuant GE HealthCare).

O DNA amplificado das micobactérias foi submetido à metodologia PRA (PCR-*Amplification-Restriction Analysis*). Portanto, após a extração de DNA, seguido de amplificação por PCR com os iniciadores Tb11 e Tb12 e, por último, digestão com as enzimas de endorrestricção *BstEII* e *HaeIII*, para obtenção dos padrões de digestão.

Os padrões de digestão enzimática obtidos permitiram a identificação molecular de todas as micobactérias cultivadas nos 13 tubos de meio Lowestein-Jensen. Na figura 39, foto de gel de agarose 1000 (Invitrogen) corado com brometo de etídio após eletroforese em tampão TE 1x, em que foi possível visualizar o aparecimento das bandas resultantes da digestão do DNA amplificado pelas enzimas de endorrestricção *BstEII* e *HaeIII*. Estes padrões ou perfis de digestão foram comparados com marcadores de DNA de peso molecular de 25pb

e 50pb, seguido de identificação final empregando o algoritmo de identificação publicado por Leão *et al.*, 2004 e também empregando o PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 16.

Figura 39 – Padrão de digestão com enzimas de endorrestrição *BstEII* e *HaeIII* em gel de agarose (Invitrogen) à 4% da PCR RFLP de micobactérias cultivadas em L-J.



Fonte: Elaborada pela autora. Eletroforese em gel de agarose 4% (UltraPure Agarose Invitrogen) de produtos de digestão enzimática do fragmento da região *hsp65* (441pb) de micobactérias com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*. Os poços 2 a 7 representam as amostras digeridas pela *BstEII*. Os poços 11 e 16 representam as amostras digeridas pela *HaeIII*. Os poços 9,18 e 19 representam os controles negativos. Os poços 8 e 17 representam a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv. Os poços 1 e 20 contêm 6,0µL do marcador de peso molecular de 50pb (Promega). O poço 10 contém 6,0µL do marcador de peso molecular de 25pb (Promega).

Tabela 16 – Descrição dos padrões de digestão enzimática obtidos com as enzimas de endorrestricção *BstEII* e *HaeIII* do produto de amplificação de 441 pb do *hsp65* de *Mycobacterium sp.*

Local de coleta	Amostra	Bandas <i>BstEII</i>	Bandas <i>HaeIII</i>	Identificação da espécie
S4	c 30°C 1ª D	440/235/210	190/160	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 1
	c 30°C 2ª D	320/115	140/60/55	<i>Mycobacterium terrae</i> tipo 3
	e 30°C 1ª D	320/115	140/60/55	<i>Mycobacterium terrae</i> tipo 3
S5	d 30°C 1ª D	235/115/85	130/90/<50	<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i> tipo 2
S6	a 30°C 1ª D	235/210	130/110/60	<i>Mycobacterium colombiense</i> tipo 1
	a 30°C 2ª D	235/210	140/130	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 3
S4	a 37°C 1ª D	235/210	145/115/60	<i>Mycobacterium terrae</i> tipo 4
	b 37°C 1ª D	235/210	145/130/95	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> tipo 1
	d 37°C 1ª D	235/130/85	130/95/40	<i>Mycobacterium alvei</i> tipo 1
	d 37°C 2ª D	320/115	140/100/60	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> tipo 3
S6	a 37°C 1ª D	235/210	145/115/60	<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 4
	a 37°C 2ª D	320/115	180/145	<i>Mycobacterium fallax</i> tipo 1
	c 37°C 1ª D	235/210	145/115/60	<i>Mycobacterium terrae</i> tipo 4

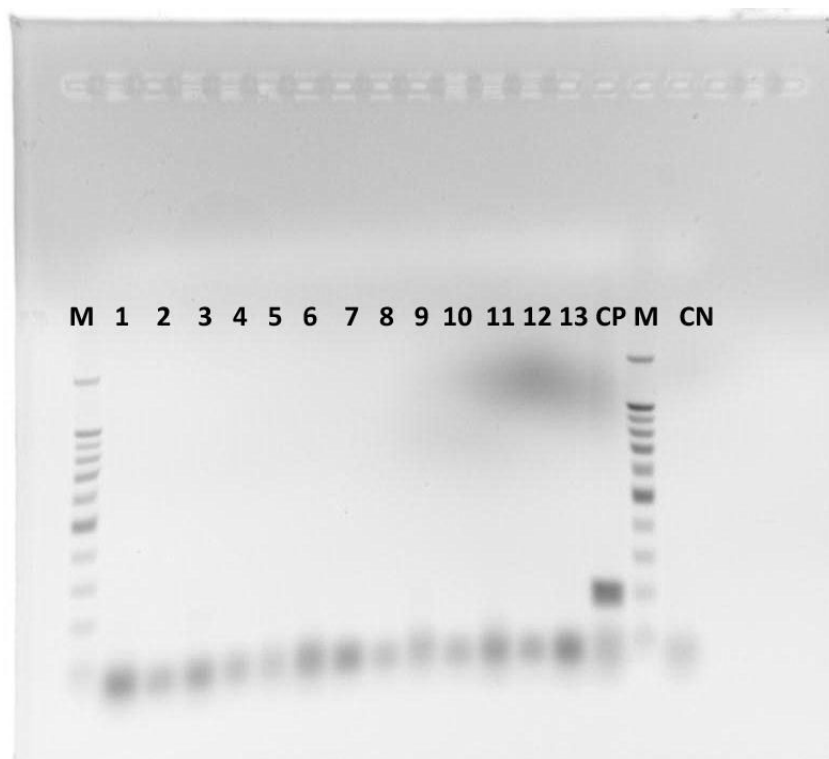
Fonte: Elaborada pela autora. Na primeira coluna, identificação da amostra de DNA digerido. Na segunda e terceira colunas, a altura das bandas após digestão com *BstEII* e *HaeIII* respectivamente, ao serem comparadas aos marcadores de 25 e 50 pb colocados no gel de agarose para eletroforese. Na última coluna, a identificação da micobactéria de acordo com o algoritmo do PRASITE.

As oito amostras das quais foram isoladas micobactérias estavam distribuídas em apenas três dos locais de coleta (S4, S5 e S6) do município de Sobral. S4 e S6 foram os locais com melhor recuperação de micobactérias, apresentando crescimento micobacteriano com formação de colônias em respectivamente sete e cinco tubos de meio de cultura L-J inoculados. De acordo com as coordenadas deste ponto de coleta foi possível observar que esses três sítios de coletas estão localizados em áreas urbanas do município de Sobral, inclusive, os sítios S4 e S5 fazem parte do mesmo “Rio Acaraú” e o S7 é um córrego que fica próximo ao mesmo (Apêndice C).

Não foi encontrada relação entre o isolamento de MNT das amostras e condutividade elétrica e temperatura. Por outro lado, foi observado que os tubos de meio L-J inoculados que apresentaram crescimento bacteriano coincidiam com as amostras de pH mais baixo no ambiente. Também, foi possível observar que sete dos 13 tubos de Lowenstein-Jensen que apresentaram crescimento bacteriano foram inoculados com amostras de água coletadas mais próximo à superfície (réplicas a, b e c).

Depois de realizada a amplificação, seguida digestão enzimática para obtenção dos padrões de bandas para a identificação de MNT, o DNA das culturas foi submetido a PCR com os iniciadores da *gyrA*, onde não se observou aparecimento de bandas referente a amplificação desta região (Figura 40), corroborando com os resultados do sequenciamento de que a região *gyrA* é específica para o *M. leprae*.

Figura 40 - Eletroforese em gel de agarose 1% para identificação de *M. leprae* com os pares de primers *gyrA-Forward* e *gyrA-Reverse* (Invitrogen) a partir do DNA das culturas que apresentaram crescimento de MNT.



Fonte: Elaborado pela autora. Eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) do DNA das culturas que apresentaram crescimento para MNT. M: marcador de 100 pb. CP: controle positivo (DNA de *M. leprae* extraído de biópsia). CN: controle negativo (água destilada estéril). Poços de 1 a 13: Amostras positivas para MNT. Foto obtida por uso de transluminador de luz ultravioleta (ImageQuant GE HealthCare).

5 DISCUSSÃO

Vários modos de transmissão da hanseníase são sugeridos (TURANKAR *et al.*, 2012). O principal e mais aceito atualmente é o fato de que a transmissão ocorre principalmente após exposição a um paciente MB. No entanto, evidências se acumulam de que essa visão convencional possa não ser totalmente correta e que fontes ambientais também contribuem para a endemicidade (LAVANIA *et al.*, 2006). Portanto, existe uma longa história de estudos, provas e argumentos que indicam possíveis fontes não humanas do agente causador da doença (TRUMAN, 2010). Assim, diferentes autores sugerem que o *M. leprae* pode estar presente no solo (LAVANIA, 2008; KADZA *et al.* 1986; BLACK, 1987), na água (MATSUOKA *et al.* 1999; WAHYUNI, 2010), em plantas (MOSTAFA, 1995) ou em várias seres vivos incluindo, ameba (JADIN, 1975; LAHIRI & KRAHENBUHL, 2008), insetos (SAHA, 1985; SREEVATSA, 1993) peixes (HUTCHINSON, 1906; COURET, 1911), primatas (GORMUS, 1998) e tatus (WALSH, 1986; TRUMAN, 1986; FROTA *et al.*, 2012).

Na suposição de que a hanseníase pode ser transmitida por intermédio de fontes ambientais, este estudo analisou amostras de águas ambientais dos Municípios de Juazeiro do Norte, Crato, Sobral e Boa viagem, no Estado do Ceará. Este U. F está localizada na região Nordeste que, juntamente com as regiões Norte e Centro-Oeste, concentram aproximadamente 17% dos casos de hanseníase detectados no Brasil (CEARÁ, 2012).

É sabido que a hanseníase é uma doença que sempre esteve associada à pobreza (MACIEL *et al.*, 2003), sendo a região Nordeste uma das que registra com maiores índices de desigualdades sociais no Brasil. Estudos realizados pelo IBGE indicaram que essa região possui o maior índice de pessoas que vivem abaixo da linha da pobreza (18,1% dos habitantes), concentrando 59,1% da população brasileira (BRASIL, 2011) em tal situação.

No Ceará a hanseníase continua endêmica, em parte devido ao pouco conhecimento aos mecanismos gerais e locais de transmissão da doença. O estado apresentou uma significativa queda no coeficiente de detecção geral no período de 2001 a 2011, porém registrou ocorrência da doença em menores de 15 anos, demonstrando a existência de focos de transmissão ativos de hanseníase (CEARÁ, 2012). Observando o cenário da hanseníase no Estado percebe-se um aumento no número de municípios silenciosos. Em 2010 foram 39 (21,2%) e em 2011 foi registrado o quantitativo de 54 (29,3%). Tal fato é demonstrativo da necessidade de implementação das ações de controle da hanseníase, ampliando-se a

capacidade de qualificação do diagnóstico e tratamento na rede de atenção primária em saúde (CEARÁ, 2012).

Alguns autores indicam que a distribuição geográfica da hanseníase no Ceará é determinada por fatores genéticos, por padrões econômicos sociais e/ou fatores ambientais (KERR-PONTES *et al.*, 2004; STERNE *et al.*, 1995). Grupos com alta incidência da doença foram identificados nos setores noroeste, central e sudeste do Estado, que, interessantemente, são locais mais urbanizados e desenvolvidos, mas com alto nível de desigualdade social (MONTENEGRO *et al.*, 2004).

Três dos quatro municípios estudados exibem elevados índices de hanseníase. Segundo dados do SINAN, Juazeiro do Norte é o município com maior número de casos novos da doença, com 95 eventos, ficando abaixo apenas da Capital, Fortaleza. Seguem-se os municípios de Sobral, com 85 casos novos e, após, vem o Crato com 39. Já Boa Viagem encontra-se com apenas quatro registros novos no SINAN (CEARÁ, 2012). Os municípios estudados neste experimento são considerados importantes do ponto de vista econômico da região, mas também possuem grande percentual de área rural, pobreza e urbanização descontrolada (MONTENEGRO *et al.*, 2004). Esses números elevados de casos novos detectados revelam que a transmissão da hanseníase continua ativa.

Truman e Fine (2010) citam em um de seus trabalhos que há dois diferentes tipos de observações motivando a busca por fontes não humanas de *M. leprae*. Um deles é a observação repetida de hanseníase em pessoas sem história aparente de exposição a outros casos conhecidos (TAYLOR, 1965; FINE, 1982; DEPS, 2008; ABIDE, 2008). A segunda é a observação de que há grupos de doentes em áreas específicas próximas a fontes de água, o que levou alguns autores a sugerir que o *M. leprae* pode ser proveniente uma fonte extra-humana em tal ambiente (STERNE *et al.* 1995; KERR-PONTES, 2006).

Os casos novos que acontecem em áreas endêmicas, dos quais não há relato de contato prévio com outros doentes, sugerem o envolvimento de outros fatores ainda não definidos, incluindo a possibilidade da disseminação indireta do bacilo (FINE *et al.*, 1997; FROTA, 2010). Transmissão e risco de infecção podem talvez estar relacionados com a presença de casos MB e serem controlados por fatores ambientais (TURANKAR *et al.*, 2012).

Vários relatos mostram que fontes não humanas, como tatus infectados ou macacos, poderiam atuar como reservatório para *M. leprae* (GORMUS, 1998; TRUMAN, 1986). Objetos inanimados ou fômites usados por pacientes infecciosos podem teoricamente contribuir para a infecção. E somente por meio do conhecimento detalhado da biodiversidade

e da ecologia, no entanto, que a importância deste modo de transmissão pode ser totalmente compreendida (TURANKAR *et al.*, 2012).

Estudos realizados nos Estados Unidos revelaram que duas amostras de solos de 12 tocas de tatus na Louisiana foram positivas para o antígeno glicolípido fenólico-I (PGL-1), que é único para a parede celular do *M. leprae*. A pesquisa, todavia não pôde assegurar que o antígeno PGL-1 seria remanescente de excreções ou secreções de tatus infectados, ou, ainda, se o antígeno proviria do bacilo viável que pode ter servido como fonte de infecção para tatus e humanos (TRUMAN *et al.*, 1986; BLAKE *et al.*, 1987).

Esses achados de Truman e cols. (1986) foram explicados recentemente em experimentos de Frota e cols. (2010), que avaliaram as taxas de soroprevalência de anticorpos IgM antifenólicos glicolipídicos-I (PGL-I) por ELISA em quatro grupos com diferentes modos de exposição ao *M. leprae* no Ceará, Brasil. Frota *et al.* (2010) observaram que a soropositividade dos níveis de anticorpos IgM para PGL-I de casos de hanseníase, contactantes e não contactantes não revelou diferenças entre si em áreas endêmicas. A soropositividade de ambos os contatos e não contatos conhecidos foi muito maior do que a relatada anteriormente, entre contatos conhecidos em outras áreas endêmicas, indicando que os anticorpos anti-PGL-I não são úteis como marcadores imunológicos de contatos domésticos e não contatos de hanseníase em áreas endêmicas (FROTA *et al.*, 2010).

A identificação definitiva do *M. leprae* às vezes é problemática, uma vez que o organismo não é cultivável e não há disponibilidade de modelos animais adequados e rápidos para estudos de pesquisas. Os ensaios moleculares são desenvolvidos para a detecção de *M. leprae* a partir de dados genéticos disponíveis e baseados na amplificação de sequências de DNA específicas do *M. leprae* para demonstrar a sua presença (LAVANIA *et al.*, 2008). Esta técnica é aplicada não só para as amostras de biópsia de pele, mas também para diferentes tipos de amostras. O RNA através da PCR com transcrição reversa (RT-PCR) tem a vantagem de detectar e confirmar a viabilidade do bacilo presente na amostra (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Pesquisadores demonstraram a alta sensibilidade e a especificidade da PCR comprovadas pela detecção de 1 a 100 organismos por esse método (YOON *et al.*, 1993; WIT *et al.*, 1991; WILLIAMS *et al.*, 1990; PLIKAYTIS *et al.*, 1990; WOODS *et al.*, 1990). De acordo com Scollard (2006), as técnicas de PCR e RT-PCR apresentaram uma especificidade de 100% na identificação de fragmentos de DNA e RNA de *M. leprae* (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Frota e colaboradores (2012) avaliaram tatus (*Dasypus novemcinctus*) como um reservatório para o bacilo da hanseníase no Estado do Ceará, um lugar endêmico, que mostra várias espécies de tatus, incluindo *D. novemcinctus* e *Euphractus sexcinctus*. De um total de 29 tatus (27 *D. novemcinctus* e dois *E. sexcinctus*) capturados em diferentes municípios do Estado, Frota e col. identificaram DNA de *M. leprae* por meio de *Nested* PCR nas duas espécies. O *M. leprae* foi detectado em 21% (6/29) dos animais, incluindo cinco *D. novemcinctus* e um *E. sexcinctus*, sendo a confirmação procedida por sequenciamento. Este foi o primeiro estudo brasileiro a identificar a presença de um biomarcador de *M. leprae* em tatus selvagens (*D. novemcinctus* e *E. sexcinctus*) em uma área hiperendêmica de hanseníase, onde há um contato permanente entre os seres humanos e tatus (FROTA *et al.*, 2012).

Considerada como uma substância relativamente inerte por muitos pesquisadores, a água não era muito ressaltada como possível reservatório de *M. leprae*, mas desde o século XX, pesquisas defendem amiúde o seu papel como uma fonte importante do bacilo (BLAKE *et al.*, 1987).

Kazda e cols.(1980) analisando amostras de água na costa da Noruega, em região endêmica de hanseníase, encontraram *M. leprae*, detectado primeiramente pela baciloscopia e depois, fato comprovado pelo crescimento em pata de camundongo, levando os autores a concluir sobre a possibilidade de haver uma fonte natural de *M. leprae*, um organismo que possui atividades enzimáticas autotróficas capazes de o manter viável na natureza (KAZDA *et al.*, 1980).

Em 1986, em outra pesquisa foi efetivada também por Kazda e colaboradores em Mumbai, onde foram analisados 13 amostras de água e quatro de solos coletadas numa mesma área endêmica. Destas, uma amostra de solo exibiu a presença de bacilos, os quais foram demonstrados pelo cultivo em tatus e camundongos, assim como pela presença de antígenos específicos do *M. leprae* (KAZDA *et al.*, 1986).

Esses achados de Kazda e cols. (1986) foram explicados mais tarde, em 1995, quando Desikan e Sreevatsa realizaram estudos sobre a viabilidade do *M. leprae*. Em um dos experimentos, a suspensão de bacilos foi exposta a temperatura ambiente nos meses de março e abril, com uma umidade atmosférica de 44 a 28%. Os bacilos não sobreviveram mais do que 14 dias. Quando os experimentos foram repetidos sob uma umidade atmosférica de 72 a 80%, os bacilos sobreviveram por 28 dias (DESIKAN *et al.*, 1995).

Estendendo-se as pesquisas sobre condições úmidas, o *M. leprae* foi encontrado viável por até cinco meses, sendo comprovada a influência positiva da umidade na sobrevivência do *M. leprae* fora do corpo humano. Quando, entretanto, mantidos em solução

salina ou na terra úmida, os bacilos morreram mais cedo, por volta de dois meses. Essas descobertas contraditórias foram explicadas pelo autor ao dizer que possivelmente as enzimas bacterianas seriam destruídas mais rapidamente quando expostas a fluidos como salina e água, todavia, numa lenta dessecação, as enzimas poderiam permanecer intactas por um longo tempo (DESIKAN *et al.*, 1995).

No mesmo estudo que se terminou de descrever, Desikan e Sreevatsa demonstraram a sobrevivência do *M. leprae* por três a sete dias quando expostas diretamente à luz do sol, por 30 minutos, quando exposto ao álcool etílico 70%, por um período de 60 dias sob refrigeração a 4 °C e -20 °C e, quando preservados a -70 °C, os organismos mantiveram a viabilidade por somente 28 dias. Portanto, o *M. leprae* é capaz de sobreviver fora do corpo humano por vários meses, sob condições desfavoráveis (DESIKAN & STREEVATSA, 1995). Desse modo, a micobactéria pode manter sua viabilidade o suficiente para ser transmitida (RESS, 1972; RESS, 1975; BLAKE *et al.*, 1987).

Em um ensaio realizado por Salem e colaboradores (1982), foi encontrado BAAR em até 80% das lâminas das amostras de água do Lago do Aleixo, na Amazônia, Brasil, local onde se encontra uma vila de hansenianos. Mesmo não tendo sido confirmado por meio de outras análises, que os bacilos eram o *M. leprae*, os autores explanaram que o Aleixo é, sem dúvida, uma coleção de água com um habitat favorável para atuar como um reservatório de *M. leprae*. Nesse estudo, foram encontrados BAAR agrupados, formando globias, e não cresceram em meios para micobactérias, de tal modo que os autores sugerem uma origem humana infectando a água local com *M. leprae*. Além do mais, uma amostragem idêntica foi realizada em outros locais, como os lagos Castanho, São Sebastião e Cristalino, os quais não revelaram a presença de micobactérias (SALEM *et al.*, 1982).

Em 1999, em estudo realizado por Matsuoka e colaboradores, eles encontraram BAAR em 32 das 44 amostras e PCR positiva para *M. leprae* em 21 das 44 amostras (47,7%) de águas testadas; essas águas eram utilizadas diariamente pelos moradores, para beber e tomar banho, em seis vilas de Halmahera, norte da Indonésia. Todos os produtos de PCR foram sequenciados e comparados com a sequência padrão do *M. leprae*; todos os nucleotídeos, com exceção de nove não identificados, foram idênticos a sequência padrão do bacilo causador da hanseníase, estabelecendo assim, a correlação entre a presença do *M. leprae* na água e a prevalência da hanseníase em três das seis vilas, relevando a importância do papel da água na propagação da doença (MATSUOKA *et al.*, 1999).

Pesquisa realizada (dados não publicados) previamente pelo grupo de estudos desta investigação, em amostras de água coletada nos Municípios de Sobral, Mulungu, Boa

Viagem, Crato e Juazeiro do Norte também indicou a presença de DNA de *M. leprae* em 16 (51,6%) das 31 amostras analisadas. Os resultados expressaram que a PCR foi positiva para 16 das 31 amostras e o bacilo foi visualizado com BAAR em quatro amostras (KERR-PONTES *et al.*, 2006).

A água representa um vasto ecossistema com características bióticas e abióticas próprias, como a presença de outros microrganismos, temperatura, salinidade, acidez, elementos químicos e luminosidade, que podem interferir tanto na viabilidade como na detecção laboratorial do DNA. Outro fator contribuinte, atualmente muito comum, é o lançamento de lixos e dejetos humanos, causando o aumento de matéria orgânica na água, permitindo uma grande proliferação de bactérias aeróbias que podem consumir uma grande quantidade de oxigênio ocasionando a morte de várias formas de vida, inclusive das próprias bactérias. É também comprovado que a presença de matéria orgânica na água afeta diretamente a detecção de DNA por PCR (PETIT *et al.*, 1999).

Avaliando o ambiente na dinâmica de transmissão da hanseníase, além das pesquisas com amostras de água, Lavania e cols. (2008) demonstraram a presença de *M. leprae* em solo próximo de residência de casos de hanseníase. Nesse estudo utilizando PCR, visando região específica do *M. leprae*, o DNA pôde ser demonstrado em 30 das 80 (37,5%) amostras de solo coletadas nas aldeias de Ghatampur, na Índia. Como Matsuoka e colaboradores já haviam realizado um estudo semelhante com amostras de água, esse estudo mostrou que a técnica de PCR também pode ser utilizada para detecção de *M. leprae* também em amostras de solo. Uma limitação importante do método utilizando para amplificação de DNA, no entanto, é a sua incapacidade para distinguir entre organismos viáveis e mortos. Assim, a detecção de *M. leprae* viável no ambiente no mesmo estudo foi possível, utilizando também métodos moleculares, com o emprego de PCR com transcrição-reversa para a região alvo 16S rRNA do gene do *M. leprae*, demonstrando positividade em 28 das 80 (35%) amostras de solo colhidos nas aldeias de área endêmica em Ghatampur, na Índia. Portanto, este estudo mostra que o *M. leprae* está presente e viável no solo e isso deve ser investigado como uma potencial fonte de transmissão contínua da doença.

Em outro ensaio realizado por Turankar, Lavania e colaboradores (2012), foram analisadas 207 amostras de solo, coletadas em uma aldeia de área endêmica onde residiam casos ativos da doença no momento da coleta. Foram coletados baciloscopia de 13 pacientes MB de hanseníase e 12 contatos domiciliares dos pacientes suspeitos de serem casos ocultos. DNA e RNA de *M. leprae* foram extraídos e amplificados utilizando os iniciadores específicos do *M. leprae*. Setenta amostras de solo mostraram a presença de DNA de *M.*

leprae, enquanto 16S rRNA foi detectado em 28 destas amostras. As amostras do ambiente e dos pacientes foram genotipadas para polimorfismo de base única (SNP) e exibiram o mesmo genótipo. Assim, o genótipo de *M. leprae* encontrado no solo e nos pacientes que residem na mesma área poderia ajudar na compreensão da cadeia de transmissão da hanseníase (TURANKAR *et al.*, 2012). Essa constatação atenta para a possível contribuição do ambiente na transmissão da hanseníase.

A observação da maior presença de bacilos viáveis em ambientes úmidos, como próximo às áreas de lavagem e de banho, encontrados no estudo de Turankar *et al.* (2012) e Lavania, (2008), assim como a alta positividade para RNAm nas amostras de água analisadas, podem ser correlacionadas aos resultados obtidos por Desikan e Sreevatsa (1995) nos estudos de viabilidade do bacilo. Esses pesquisadores concluíram que os bacilos sobreviviam melhor em condições úmidas, onde o *M. leprae* foi encontrado viável por até cinco meses, sendo comprovada a influência positiva da umidade na sobrevivência do bacilo fora do corpo humano.

Somada a observação da maior sobrevivência bacilar em ambientes úmidos, existem estudos que demonstram a sobrevivência e a viabilidade de *M. leprae* em espécies de amebas de vida livre (LAHIRI & KRAHENBUHL, 2008).

Em todos esses experimentos, foi obviamente demonstrado o fato de que o *M. leprae* pode resistir a várias condições ambientais adversas e ainda permanecer viável por um tempo considerável. Desikan e Sreevatsa ressaltam que o *M. leprae*, conhecido como tão exigente nutricionalmente e que somente pode crescer e se multiplicar *in vivo*, pode permanecer viável fora do corpo humano por longo intervalo de tempo, por até meses, apesar da desidratação ou até mesmo da exposição à luz do sol (DESIKAN *et al.*, 1977, 1995).

Evidências microbiológicas que indicam a existência de *M. leprae* em água já tinham sido relatadas por Kazda *et al* (1990). Com base nestas observações, assumiu-se a ideia de que a água utilizada diariamente em áreas endêmicas é a fonte mais provável de infecção com o bacilo da hanseníase (MATSUOKA *et al.*, 1999).

Assim, de acordo com a literatura, várias observações epidemiológicas e microbiológicas indicam que fontes ambientais desempenham papel na transmissão da doença. De tal modo, este estudo buscou se aprofundar na dinâmica de transmissão de hanseníase, investigando a presença e a viabilidade do *M. leprae* em amostras de água ambientais de municípios endêmicos e não endêmicos do Estado do Ceará, mediante de técnicas de Biologia Molecular.

Quanto à presença de *M. leprae* nas amostras analisadas utilizando PCR para a região *gyrA* específica do *M. leprae*, com a obtenção do produto de 187 pares de base (pb), o DNA foi encontrado em 52 das 119 (43,7%) amostras estudadas, estando de acordo com os estudos de Matsuoka e colaboradores (1999) e Lavania (2008). E, para avaliar a viabilidade do bacilo, foi utilizada a RT-PCR também para a região *gyrA* do *M. leprae*, com a obtenção do produto de 187 pb; o RNAm, então, foi encontrado em 53 das 119 (44,5%) amostras, comprovando que os bacilos presentes nas amostras de água estão vivos, e de acordo com Lavania, essas águas ambientais, assim como o solo da Índia podem vir a representar uma potencial fonte de transmissão contínua da doença.

Dentre essa positividade, algumas amostras exprimiram positividade para RNAm, e apresentaram negatividade para o DNA. Isso pode ter decorrido do fato de que a presença de ácidos húmicos e fúlvicos, que ordinariamente presentes em amostras ambientais - como solo, água e sedimentos - inibe a amplificação de ácidos nucleicos, fornecendo resultados falsos negativos (TSAI & OLSON, 1992). Apesar do *kit* de extração utilizado possuir reagente com função de remover esses inibidores, talvez a eficácia não seja suficiente para a remoção total dos inibidores presentes nas amostras de água ambientais, impossibilitando as reações de amplificação.

Em adição, existe o fato de que a extração do DNA das amostras foi o último procedimento realizado após a chegada das garrafas com as águas ambientais ao laboratório. Assim, pode ter ocorrido degradação do DNA antes da extração e amplificação das amostras.

Os produtos de PCR das duas amostras de água dos Municípios de Juazeiro do Norte e Sobral, sequenciadas, confirmam a amplificação da região *gyrA* de *M. leprae* nas amostras, seguida de BLAST, alinhado com a referência do *M. leprae* no NCBI (Br4923 GenBank: FM211192.1). Todos os nucleotídeos do fragmento foram idênticos à sequência de referência do bacilo causador da hanseníase, estando de acordo com os resultados de Matsuoka (1999) que em seu estudo, de 32 amostras com PCR positiva para *M. leprae*, 23 demonstraram sequenciamento do fragmente analisado compatível com a referência do *M. lepra*; sugerindo, portanto, que os resultados do ensaio sob relatório não só detectaram *M. leprae* nessas amostras ambientais como também ficou comprovada sua viabilidade, e que estes fragmentos são geneticamente iguais à referência do *M. leprae*.

Vale resaltar que o sequenciamento de todas as amostras positivas apontaria um resultado mais fidedigno, mas o sequenciamento dessas amostras envolveu uma série de dificuldades, visto que foi realizado no Instituto Evandro Chagas, em Belém, no Estado do Pará. Mas é uma meta a ser alcançada.

Ao realizar a comparação entre a frequência da positividade de ácidos nucleicos de *M. leprae* nas amostras ambientais com o número de casos novos da doença em registro ativo nos municípios analisados, esperou-se encontrar maior positividade no Município de Juazeiro do Norte, seguido do Município de Sobral. Os resultados apresentaram-se conforme esperado, pois as amostras ambientais do município de Juazeiro do Norte obtiveram a maior porcentagem de resultados positivos na PCR 17/25 (68%) e na RT-PCR 15/25 (60%) para a região *gyrA* do *M. leprae*.

A segunda maior positividade de amostras ambientais para *M. leprae*, de acordo com o total de casos da hanseníase seria em Sobral, mas, surpreendentemente, foi o município de Boa Viagem que ficou com essa colocação, visto que expressou PCR positiva em 16/34 (47%) e RT-PCR positiva em 14/25 (41,2%) das amostras analisadas. Já esses resultados destoam dos dados divulgados pelo Governo do Estado, pois segundo o SINAN, este município está classificado como “bom” quanto ao registro de novos casos notificados. Vale ressaltar que Boa Viagem é um município menos desenvolvido no plano econômico, quando comparado com os outros deste estudo. Evidencia-se, ainda, que para haver uma fidedigna notificação, se faz necessário, boa estrutura na saúde básica, inclusive tecnológica. Esses resultados submetem em dúvida a qualificação do diagnóstico e tratamento na rede de atenção primária em saúde, visto que, consoante o SINAN, o Ceará se encontra atualmente com muitos municípios como “silenciosos”, o que pode vir a justificar a tão baixa ocorrência da doença no município citado.

Sobral ficou em terceiro lugar quanto à positividade de DNA e RNAm nas amostras estudadas, indicando PCR positiva em 14/40 (35%) e RT-PCR positiva em 15/40 (37,5%) das amostras estudadas. Assim como Juazeiro do Norte, Sobral também expressa elevados índices da doença, fazendo que os resultados deste ensaio estejam condizentes com a realidade do local quanto à endemidade.

Crato ficou com a menor frequência de PCR positivas nas amostras analisadas - apenas 5/20 (25%) - porém a RT-PCR se exibiu positiva em 9/20 (45%) amostras. Os resultados da RT-PCR comprovam a viabilidade do bacilo nas amostras, mostrando que há quantidades significativas deste em águas ambientais cratenses. Acredita-se que esses resultados estão proporcionais à quantidade de sítios coletados, visto que o Município teve apenas quatro sítios de coleta. Assim, é válido considerar que os altos dados de positividade detectados nos municípios cearenses vão ao encontro do esperado pelo grande número de casos detectados anualmente, com exceção de Boa Viagem.

Essa discrepância entre a endemicidade de Boa Viagem e os resultados obtidos, podem ser explicado pela teoria de alguns autores, que descrevem a hanseníase como uma “endemia oculta”, destacando aspectos precários do controle da doença, como busca ativa pouco efetiva em áreas de grande concentração da patologia, diagnósticos tardios, deficiência nos programas público-assistenciais, precariedade dos serviços de saúde, abandono do tratamento e baixo nível de esclarecimento da população (MIRANZI *et al.*, 2010).

Os municípios cearenses estudados neste trabalho demonstraram possuir alta positividade nos sítios de pesquisa para RNAm do *M. leprae*, revelando um alto teor de detecção de bactérias viáveis do bacilo nas águas estudadas.

Avaliando a positividade dos ácidos nucleicos das amostras ambientais com a profundidade da coleta, os resultados deste experimento não se mostraram relevantes, visto que a positividade das amostras se distribuiu de forma semelhante nos níveis analisados. Até então, inexistem trabalhos na literatura citando esse tipo de associação.

Condutividade elétrica é a medida da capacidade da água em conduzir corrente elétrica, cujos valores são expressos em micro Siemens ($\mu\text{S cm}^{-1}$). É função da concentração de íons presente na água que possam conduzir esta corrente elétrica, mas seu valor, além de depender da temperatura, também difere para cada íon (ESTEVEZ, 1998).

Quanto às condições ambientais dos locais de coletas no momento da coleta, Juazeiro do Norte e Boa Viagem apontaram condições bem semelhantes quando comparada aos outros municípios, com a condutividade elétrica de 407 e 588,7 $\mu\text{S/cm}$, temperatura de 27,44 e 27,81°C e pH de 8,06 e 8,63 respectivamente. Tais resultados, paralelamente, concordam com a maior frequência de PCR e RT-PCR positivas nesses municípios. Em relação a todos os municípios, os pontos de coletas com maior positividade para DNA apontaram menor condutividade elétrica ($452.9 \pm 42.3 \mu\text{S/cm}$), quando comparados com os negativos ($551.7 \pm 41.2 \mu\text{S/cm}$). Salen e cols. (1982) relata que há relação intensiva entre a presença de bacilos e os valores médios de condutividade elétrica. Sugere, pois, que o nitrato, componente comum em amostras ambientais, possa vir a exercer proteção a integridade desses microorganismos.

Ao analisar as condições ambientais mediante o Teste Mann Whitney, observou-se que, de modo geral, os resultados obtidos indicam uma similaridade entre os pontos de coleta com a positividade para DNA e RNAm em todos os municípios. Os sítios que exibiram positividade para DNA expressaram valor médio de temperatura mais baixo ($28.4 \pm 0.27^\circ\text{C}$) em relação aos negativos ($29.5 \pm 0.35^\circ\text{C}$) ($p < 0.05$). Padrão semelhante foi encontrado nos sítios com positividade para mRNA, que registraram valores médios de temperatura de $28.3 \pm$

0.31°C, enquanto que os negativos marcaram $29.8 \pm 0.34^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$). Partindo do pressuposto que o *M. leprae* possui preferência de crescimento nas regiões mais frias do corpo humano, isto é, temperaturas inferiores a 37°C , como nas extremidades - mãos, pés e cabeça (MACIEIRA, 2012); e tomando como verdadeira essa afirmação para o desenvolvimento do bacilo no ambiente, pode-se considerar que a temperatura das águas ambientais dos municípios estudados, com um clima tropical quente e semiárido, é propícia à multiplicação da bactéria. Acresce referir-se que segundo Desikan e cols. (1995), evidências sugerem que a umidade pode favorecer a sobrevivência de *M. leprae* no ambiente. Portanto, o ambiente aquático das amostras do estudo pode favorecer a sobrevivência do bacilo. Esses dados auxiliam a compreender como a bactéria pôde permanecer viva com 44,5% das amostras positivas para o RNAm nas águas ambientais pesquisadas neste trabalho.

Esses resultados refletem a explanação feita no estudo realizado por Salem e cols. (1982) ao acentuarem que a presença do *M. leprae* está limitada não pela fonte, que é contínua, mas pelos condicionantes do ambiente e da qualidade físico-química da água. Blake e cols. (1987) mostram ainda que certas fontes ambientais podem ter maior poder de infecção do que outras, e que a patogenicidade pode depender mais da susceptibilidade inata da população do que da mera existência do *M. leprae* em várias fontes.

Quanto ao uso da água dos sítios de coletas, dentre os 24 analisados 16 estavam envolvidos em atividades de banho/lazer e consumo humano, três locais não eram utilizados para consumo humano e os outros cinco locais estavam envolvidos em outras atividades. E, de acordo com os resultados obtidos, sítios que são usados para consumo humano e banho obtiveram alta positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae*. Como os sítios J4 de Juazeiro do Norte e B1 de Boa Viagem que apresentaram todas as amostras positivas para DNA/RNAm. Estes dois sítios, açude dos Carneiros (J4) e açude Câmara dos Timóteos estão envolvidos em inúmeras atividades cotidianas da população, como na pesca, consumo humano, lazer e ações relacionadas ao gado bovino.

Por outro lado, foi possível observar que o único sítio de coleta com negatividade em todas as amostras tanto para DNA quanto para RNAm do *M. leprae* foi aquele que não estava envolvido nas ações diárias da população, como pesca, lavagem de roupas, banho, lazer ou consumo. O rio Oiticica do município sobralense (S7) é relatado como uso nas atividades de uma olaria, não estando relacionado às atividades de banho, lavagem e consumo direto humano. Em virtude desta comparação, a positividade dos pontos de coletas pode estar associada ao contato de portadores da doença com os ambientes aquáticos.

Entre os casos de hanseníase notificados na Secretaria de Saúde do Município de Sobral, notou-se uma predominância dos casos MB com 53 (62%) em relação aos PB, com 32 (38%) casos. A maior frequência de formas MB entre os pacientes adquire importância por serem estas as formas infectantes da doença, pois estas expressam elevada carga bacilar na derme e em mucosas e podem eliminar bacilos no meio exterior. Além do fato de seu diagnóstico ocorrer tardiamente, é um indicativo de que esses pacientes continuam disseminando a doença. A ocorrência de predomínio da classificação operacional MB leva à admissão de que a estrutura atualmente mobilizada no combate à hanseníase no Ceará esteja trabalhando de maneira estática, com uma demanda passiva de pacientes já antigos.

Quanto à variável sexo, neste estudo, predominou o masculino, com 47 (55%) casos. A literatura expõe resultados relacionados à prevalência da hanseníase no sexo masculino (MIRANZI *et al.*, 2010). Alguns autores asseguram que o maior contato social entre homens e sua frequente exposição a ambientes de risco contribuem para elevar o número de casos (SILVA *et al.*, 2010).

Considerando os sítios com PCR positiva em amostras de água com georreferenciamento dos pacientes, no ponto de coleta S6, ocorreram 12 pacientes em sua proximidade, tendo sido também um dos sítios com maior positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae* do Município de Sobral, com três e duas amostras positivas para RNAm e DNA, das cinco coletadas. Esses resultados corroboram as consequências quanto ao uso da água dos pontos de coleta para consumo/banho, visto que o ponto de coleta S6 apresentou uma positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae* considerada elevada e indicou o maior número de portadores de hanseníase em suas proximidades.

Enquanto isso, o ponto de coleta S7, já descrito acima por não apresentar nenhuma amostra positividade para ácidos nucleicos de *M. leprae*, chama a atenção pelos 11 portadores de hanseníase em suas proximidades, esses resultados associados ao fato de que as águas deste reservatório não são usadas para o consumo humano, corroboram com a sugestão de que esta positividade está relacionada com o contato de pacientes hanseníacos, estando de acordo com Lavania, (2008) e Turankar (2012).

O ponto de coleta S5 apresentou seis casos em suas proximidades, este também é usado principalmente para o consumo humano. Já os pontos de coletas S3 e S4 apontaram cinco casos cada um, próximos no raio determinado pelo estudo, sendo que uma amostra do sítio S3 está em interseção do sítio S4, de tal modo que, o sítio S3 traz apenas quatro casos. Estes dois sítios são usados para irrigação e consumo humano, respectivamente, e, conforme relatado, o sítio S4 também sugere a presença de casos de hanseníase relacionados com a

positividade para DNA e RNAm. Levando em consideração os resultados obtidos, sugere-se que o contato destas águas com portadores da hanseníase favorece a infecção dessas fontes ambientais e estas, venham a desempenhar relação na transmissão da doença.

O resultados obtidos estão em concordância com os estudos de Turankar *et al.*(2012) e Desikan e Sreevatsa (1995), que assim como este, encontraram maior presença de bacilos viáveis em ambientes úmidos, próximo às áreas de lavagem e de banho. Estes dados, também explicam os resultados de Salen e cols. (1982) que encontraram bacilos com características do *M. leprae* no Lago do Aleixo próximo a comunidades hansênicas. Já o trabalho realizado por Wahyuni *et al.* (2010) entra em conflito com os dados destas pesquisas, visto que curiosamente não encontrou diferença significativa entre as águas positivas para poços utilizados por pacientes hansênicos daqueles que nunca foram utilizados por eles, com 23% e 26% de positividade respectivamente.

Assim, os resultados analisados, somados ao elevado grau de confirmação de casos novos de hanseníase nesses municípios ampliam as evidências de possível transmissão da enfermidade por intermédio de fatores ambientais. De tal modo, é possível inferir que a água usada diariamente em áreas endêmicas deve desempenhar alguma função na transmissão do bacilo entre os consumidores, estabelecendo, pois, a correlação entre a presença do *M. leprae* nas águas ambientais e a prevalência da hanseníase.

Para provar a ocorrência de infecção pelo *M. leprae* através da água é necessária a realização de pesquisas mais específicas, como a inoculação em tatus ou patas de camundongos e a preparação de antígenos para testes “*in vivo*” em pacientes lepromatosos (MATSUOKA *et al.*, 1999; SALEM *et al.*, 1982).

A questão de eventuais fontes não humanas de *M. leprae* é um passo importante para epidemiologia e controle da hanseníase. Se fontes não humanas existir, o seu reconhecimento pode ajudar a explicar os padrões de infecção e doença em populações humanas. Ainda mais importante, eles têm implicações para o controle da doença, e em particular para a possibilidade de sua "eliminação" ou mesmo erradicação definitiva (TRUMAN, 2010).

Identificação de Micobacterias não Tuberculosas

Quanto à pesquisa de MTN, das 119 amostras estudadas, quanto à análise das lâminas de sedimento coradas pelas técnicas de Ziehl-Neelsen, destas, apenas 40 indicaram presença de BAAR inseridas em microbiota ambiental mista, amostras estas pertencentes só ao Município de Sobral. Isso, no entanto, não necessariamente, implica que as micobactérias poderiam ser isoladas de todas as amostras. Embora o meio de cultura L-J disponha dos nutrientes requeridos para o crescimento da maioria das micobactérias, algumas espécies podem requerer condições especiais de nutrição, não suficientemente supridas pelo L-J (PFYFFER *et al.*, 2003). Além disso, as espécies de micobactérias diferem quanto à resistência aos agentes descontaminantes usados, e, para algumas, o método aplicado pode ter resultado demasiadamente seletivo (BUIJTELS & PETIT, 2005). O NaOH também é relatado como redutor da capacidade de crescimento de micobactérias, o que pode ter influenciado a baixa recuperação de micobactérias obtida (BUIJTELS & PETIT, 2005).

Estes resultados são tidos como baixos quando comparados a estudos como o de Matsuoka e colaboradores (1999), que observaram BAAR+ em 72,7% das lâminas das amostras de água da Indonésia, e o de Salem e colaboradores (1982), que encontrou BAAR em 80% das lâminas das amostras de água do Lago do Aleixo na Amazônia. Em contrapartida, os resultados deste estudo estão condizentes com aqueles do trabalho preliminar (dados não divulgados), realizado pelo grupo de estudo do qual se faz fonte, onde foi observado BAAR em apenas quatro (12,9%) das 31 lâminas de águas ambientais de municípios de Ceará.

Um fator que talvez possa ter contribuído para os resultados deste ensaio é relatado por Salem e colaboradores (1982), ao registrarem que o número de BAAR na água é proporcional à quantidade de nitrato encontrado nesse ambiente. Os autores explicam a ideia de que o nitrato exerce proteção à integridade desses organismos no ambiente aquático e, com uma pequena mudança da qualidade da água, esse fator desaparece, reduzindo o número de BAAR nas amostras. Portanto, os dados desta pesquisa não relatam a presença de nitrato, mas as amostras do experimento sob relação, por serem ambientais, podem vir a ter pequenas quantidades deste, vindo a influenciar nos resultados, que foram baixos, quando comparados com a literatura e que, de acordo com esta, esse componente influencia na preservação dos microorganismos.

O percentual de isolamento de micobactérias desde os 24 sítios ambientais foi de 12,5% referentes a três sítios do Município de Sobral e, deste, quanto as 40 amostras analisadas, foi de 8,7 %, um indicador de recuperação muito baixo. Kanai (2006) relata uma taxa de recuperação e isolamento de micobactérias de 86,4% das 59 amostras de água com as quais trabalhou. No trabalho de Kanai, no entanto, foram utilizadas, além de amostras de água ambiental, amostragem de água de redes de tratamento, em que a eliminação de microrganismos diminui a competição e favorece o crescimento de micobactérias, que são resistentes ao cloro (LEITE, 1991; DAILLOUX *et al*, 1998). Além disso, trabalhos que têm como alvo o estudo de micobactérias no ambiente costumam utilizar a combinação de dois ou mais métodos de descontaminação e cultivo das amostras em pelo menos dois meios de cultura. Assim, este estudo utilizou apenas um método de descontaminação e um meio de cultura, sugerindo que para uma melhor isolamento de micobacterias, principalmente ambientais, haja a necessidade de uma associação de métodos de descontaminação (LEITE *et al*, 1989; COVERT *et al*, 1999). As oito amostras nas quais foi possível isolar micobactérias estavam distribuídas em apenas três dos oito locais de coleta, a saber, S4, S5 e S6.

Considerando que o uso de uma técnica de descontaminação não foi efetivo para o isolamento de micobactérias nas amostras estudadas, a alternativa é usar a extração do DNA total das amostras e realização de reação de amplificação com os iniciadores Tb11 e Tb12, para verificar a presença de micobactérias na água por métodos moleculares. As amostras positivas para DNA de micobactérias podem ser submetidas à digestão enzimática para identificação da espécie micobacteriana.

M. terrae foi a espécie predominante neste estudo, sendo isolada de três amostras. Esta espécie pertence ao complexo *M. terrae*, que também inclui *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. triviale* e, mais recentemente, *M. algericum*, *M. arupense*, *M. kumamotonense* e *M. senuense* (MUN *et al*, 2008; SAHRAOUI *et al*, 2011). É uma micobactéria não cromogênica de crescimento lento com colônias rugosas e pigmentadas (EUZÉBY, 2012). Nesta pesquisa, no entanto, uma colônia cresceu em um dos cultivos para micobactérias de crescimento rápido e duas colônias exibiram aspecto liso.

O *M. terrae* é uma micobactéria ambiental comumente encontrada em amostras de água, solo e vegetais. Seu isolamento com base em amostras clínicas é considerado como contaminante, a menos que seja isolado repetidas vezes. Esta espécie, entretanto, é frequentemente descrita como agente causador de infecções em humanos, como infecções no joelho, sinoviais, pulmonares e, raramente, em portadores do HIV (CARBONARA *et al*, 2000; LEÃO *et al*, 2004).

O *M. simiae* foi isolado pela primeira vez em 1965 (EUZÉBY, 2012). É uma micobactéria fotocromogênica que expressa bom crescimento até os 37°C e não cresce em temperaturas superiores a 45°C. Neste estudo, ela mostrou crescimento a 30°C. Pode ser difícil diferenciar esta espécie do *M. scrofulaceum* com base em testes bioquímicos, mas estas espécies diferem quanto à produção de pigmento e padrão de digestão enzimática no PRA (CHIMARA *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2012). O *M. simiae* é geralmente um contaminante ambiental, raramente associado a doenças humanas (GRIFFITH *et al.*, 2007). A maioria dos casos clínicos descritos é de doença pulmonar, embora também tenham sido descritos casos de infecção sistêmica em pessoas com AIDS (GRIFFITH *et al.*, 2007).

M. scrofulaceum é uma micobactéria geralmente isolada de lagos e rios de países com clima tropical (FALKINHAM, 1996; GRIFFITH *et al.*, 2007). É uma micobactéria de crescimento lento com 37°C como temperatura ótima de crescimento, a exata temperatura de seu crescimento neste estudo. As colônias são lisas e a sua cor varia entre amarelo e laranja (RODRIGUES, 2012). Esta MNT é um patógeno oportunista, recorrentemente associada a casos de linfadenite em crianças, infecções disseminadas, pulmonares e cutâneas (LEMENSE *et al.*, 1994). Atualmente, com a descrição de novas espécies isoladas de gânglios linfáticos, como o *M. parascrofulaceum*, há a tendência de redução do número de isolados de *M. scrofulaceum* (TORTOLI, 2003; TURENNE *et al.*, 2004; GRIFFITH *et al.*, 2007).

M. parascrofulaceum é uma MCL que cresce bem na faixa de temperatura de 25-37°C, com crescimento ótimo a 37°C (TURENNE *et al.* 2004). É semelhante ao *M. scrofulaceum* em relação à morfologia das colônias e comportamento em provas bioquímicas, sendo estas duas espécies diferenciadas por testes moleculares (TURENNE, 2004). Tortoli e colaboradores (2005) conseguiram isolar *M. parascrofulaceum* a partir de duas amostras clínicas de pacientes com AIDS e de um paciente idoso com infecção pulmonar, o que sugere que esta seja uma espécie causadora de infecções oportunistas.

M. intracellulare e *M. colombiense* são espécies pertencentes ao Complexo *M. avium*, do qual também fazem parte o *M. avium*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. marseillense*, *M. vulneris* e *M. timonense* (CAYROU *et al.*, 2010). Estas MCL são geralmente encontradas em ambientes antrópicos, como água potável. Diferentemente do *M. avium*, que é agente etiológico da maioria das micobacterioses em pacientes portadores do HIV, o *M. intracellulare* em geral é isolado de pacientes HIV-negativo e imunocompetentes (PORTAELS *et al.*, 1995). O *M. colombiense* já foi isolado a partir de sangue e expectoração de doentes infectados com HIV e de gânglios linfáticos em crianças (MURCIA *et al.*, 2006; TORTOLI, 2006; VUORENMAA *et al.*, 2009).

Desde sua descrição, em 1992, *M. alvei* é conhecida como uma micobactéria ambiental de água e solo. É uma MCR quando cultivada a 25°C, mas que necessita de duas a quatro semanas para crescer a 37°C (TORTOLI, 2003), o que é corroborado por este estudo, uma vez que essa espécie cresceu depois de quatro semanas de incubação a 37°C. Por conta da origem ambiental da maioria dos isolados e pelo pequeno número de casos de infecção associados ao *M. alvei*, sua presença em amostras clínicas é considerada apenas como contaminante (TORTOLI, 2003; CHEN-HSIANG, 2011).

M. mucogenicum é uma MNT não cromogênica de crescimento rápido, e suas colônias têm aspecto suave e mucoide. Sua composição de ácidos micólicos é semelhante à de outras MCL (*M. terrae*, *M. xenopi*), mas é único entre as MCR (SPRINGER *et al*, 1995; RODRIGUES, 2012). É uma espécie isolada de amostras de água de distribuição urbana e pode ser o agente etiológico de infecções nosocomiais e mais freqüentemente de infecções pós-traumáticas em feridas (WALLACE, 1983).

M. gordonae foi identificada em apenas uma das amostras, no entanto é uma espécie de crescimento lento, frequentemente isolada de água, especialmente dos sistemas de abastecimento e distribuição (VAEREWIJK *et al*, 2005). Ao estudar água de piscinas, Leoni e colaboradores (1999) conseguiram isolar *M. gordonae* em 73,5 % de suas amostras. Covert e colaboradores (1999) observaram em seu estudo que *M. gordonae* foi a única espécie isolada em amostras de águas que tinham como fonte águas subterrâneas. Esta espécie é o contaminante laboratorial mais comum dentre as micobactérias e pode causar infecções em pessoas imunocomprometidas (AGUADO *et al*, 1987; WEINBERGER *et al*, 1992; BAGARAZZI *et al*, 1996; RUSCONI *et al*, 1997).

M. fallax é uma MCR não pigmentada, cujo crescimento é visível em cinco dias no meio de cultura Lowenstein-Jensen a 30°C. A 37°C, entretanto, a maioria das colônias só se torna visível de 12 a 20 dias depois da inoculação do meio, e algumas não crescem mesmo depois de 28 dias de incubação. É uma micobactéria que pode ser encontrada em reservatórios naturais como água e solo (COLLINS, 1984). É, porém, uma espécie já relatada como isolada de pacientes com infecção pulmonar (LEVY-FREBAULT, 1983).

O emprego da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase e Análise de Restrição Enzimática (PRA) neste estudo ofereceu uma maneira fácil, rápida e barata para identificação das micobactérias (LEE *et al*, 2000; HIDAKA *et al*, 2000), e mostrou ser um recurso valioso para a avaliação da riqueza de espécies presentes nos reservatórios estudados. O uso da metodologia PRA permitiu, por exemplo, a identificação de *M. scrofulaceum* e *M.*

parascrofulaceum como espécies diferentes, algo que não seria possível com o uso de técnicas de identificação bioquímica (TURENNE, 2004).

Esta técnica, entretanto, também possui limitações. Conforme ilustrado no Algoritmo de Identificação de Micobactérias (LEÃO *et al.*, 2004), é possível que uma mesma espécie de micobactéria apresente mais de um padrão de endorrestrição na análise de restrição do gene *hsp65* (65-kDa HSP) com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*, e que espécies diferentes mostrem padrões de endorrestrição iguais (LEÃO *et al.*, 1999; LEÃO *et al.*, 2004; CHIMARA, 2004). Devallois e colaboradores (1997) descreveram cinco padrões diferentes da digestão enzimática para *M. kansasii*, demonstrando que este fato é investigado desde o início do desenvolvimento da técnica (TELENTI *et al.*, 1993). As espécies que exprimem mais de um padrão de digestão enzimática são classificadas em tipos, de acordo com a ordem de descrição do padrão na literatura (*M. terrae* tipo 3, *M. terrae* tipo 4) (LEÃO *et al.*, 2004; CHIMARA *et al.*, 2008).

Assim, espécies distintas que compartilham o mesmo padrão de endorrestrição devem ser diferenciadas com técnicas adicionais, como o sequenciamento do DNA (HÄFNER *et al.*, 2004). O uso de técnicas adicionais foi desnecessário neste estudo, pois os padrões de bandas obtidos em todos os isolados mostraram elevado de similaridade para apenas uma espécie, evidenciado pelo score superior a 85% no PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

As dez espécies isoladas neste estudo são comuns em ambiente aquático, o que era esperado, pois micobactérias podem colonizar ampla variedade de reservatórios naturais (GOTAZAR, 2011). Quatro dessas espécies, no entanto, também são consideradas como potencialmente patogênicas (*M. simiae*, *M. intracellulare*, *M. parascrofulaceum* e *M. scrofulaceum*), sendo a água havida como o principal veículo para transmissão de micobacterioses (RADOMSKI, 2010). Isso é preocupante, pois todos os locais pesquisados são fontes de água usadas para fins domésticos pela população (beber, banho, preparo de alimentos, lavagem de animais e roupas). Primm e colaboradores (2004) relatam que a incidência de infecções de pele e tecidos moles por MNT em águas fluviais em pacientes imunocomprometidos aumentaram prevalentemente, assim como infecções pulmonares em crianças, por ingestão ou inalação de água contaminada (ao nadar, por exemplo).

Na maior parte dos países, a distribuição e a incidência das micobacterioses não foram completamente pesquisadas, bem como a ocorrência das espécies, que é variável de região para região (KATOCH, 2004). No Brasil, os casos de infecções por MNT mais comuns

estão relacionados ao *M. kansasii* e *M. avium*, assim como pelo *M. massiliense*, que é o agente etiológico mais prevalente na maioria das cidades brasileiras (SAMPAIO *et al.*, 2006).

As MCL representaram 70% das espécies isoladas, resultado diferente do observado por Kanai (2006), que encontrou um percentual de 57,1 % de crescimento de MCR em isolados utilizando amostras ambientais. A autora acentua que em reservatórios de água natural as micobactérias de crescimento rápido são mais competitivas do que as de crescimento lento, o que justificaria seu número maior de isolados. Resultados semelhantes aos deste estudo, porém, foram obtidos por Donoghue e colaboradores (1997), que obtiveram 68 % de isolamento de MCL em amostras de água ambiental.

Este ensaio exibiu resultados discrepantes aos de outros autores quanto à relação entre isolamento de micobactérias e as condições físico-químicas da água (condutividade elétrica, temperatura e profundidade de coleta) e porcentagem de isolamento de MCL em relação às MCR. Tais diferenças podem ser explicadas pelo baixo percentual de recuperação das micobactérias presentes nas amostras, o que prejudicou a observação das tendências reais dessas variáveis.

Como os resultados obtidos foram poucos considerando o total de amostras analisadas, não foi possível realizar uma análise estatística, sendo possível apenas discutir os dados de forma descritiva.

Assim, quanto à análise das condições físico-químicas ambientais e à presença de MNT, as medições de pH mostraram que a água de todos os locais tinha caráter neutro ou básico, com pH variando de 6,7 a 10,2 (média de 7,91). Nos locais de coleta em que houve cultivo de micobactérias, o pH era neutro (média de 7,23, variando de 6,7 a 7,6), sendo, portanto, mais baixo do que nos de locais de onde não houve isolamento micobacteriano, cuja média de pH foi 8,32 (variação de 7 a 10,2). Em pesquisa realizada por Iivanainen e colaboradores (1993), foi encontrada correlação negativa entre a contagem de micobactérias e o pH da água, significando que micobactérias são encontradas com maior frequência em ambientes com condições ácidas. Embora uma relação negativa entre pH e isolamento de micobactérias tenha sido encontrada, a ausência de locais com pH ácido dentre os sítios de estudo não permitiu a confirmação de que micobactérias sejam encontradas com maior frequência em ambientes ácidos.

As águas dos sítios S4 e S5, das quais foi possível isolar seis espécies de micobactérias, mostraram uma condutividade mais baixa do que a maioria dos outros locais de coleta (S4 = 240 μ S/cm e S5 = 230 μ S/cm). A relação entre condutividade elétrica e isolamento de micobactérias, no entanto, não pôde ser estabelecida de fato, uma vez que o

local S6, onde foram isoladas cinco espécies de micobactérias, indicou o segundo maior valor de condutividade dentre os locais de estudo ($S6 = 1160 \mu\text{S}/\text{cm}$). Este resultado concorda com os encontrados por Castillo-Rodal e colaboradores (2012), que também não puderam estabelecer correlação entre condutividade elétrica da água e presença de micobactérias cultiváveis em meios axênicos.

O mesmo sucedeu em relação à temperatura, que variou até $3,8^\circ\text{C}$ (de 29°C a $32,8^\circ\text{C}$) entre os três sítios de coleta que mostraram positividade, S4, S5 e S6. 29°C e $32,8^\circ\text{C}$ são, respectivamente, o valor de temperatura mais baixo e mais alto dentre os locais de estudo. A relação entre isolamento de micobactérias e temperatura da água ainda não está bem estabelecida. Os resultados desta pesquisa concordam com o estudo de Leoni e colaboradores (2001), que não encontraram relação estatística entre isolamento de micobactérias e temperatura. Por outro lado, Kirschner e colaboradores (1992) relatam que temperaturas mais altas coincidem com um maior isolamento de micobactérias com suporte em outras amostras ambientais.

O quarto e o sexto sítios de coleta (S4 e S6, respectivamente) registraram maior positividade, com cinco espécies de micobactérias isoladas em cada um. Em S4 foi possível isolar micobactérias de todas as profundidades de coleta, enquanto em S6 a réplica com água coletada mais próximo da superfície (S6a) expressou crescimento de colônias em todos os tubos de Lowenstein-Jensen inoculados. Embora tanto ambientes aquáticos quanto terrestres sejam reservatórios naturais de micobactérias, alguns autores concordam com a ideia de que o solo é o principal hábitat das micobactérias no ambiente por ser mais estável e conservativo (VAEREJICK *et al*, 2005). Além disso, considerando que a interface sedimento-água apresenta maior atividade microbiana (IIVANAINEN *et al*, 1999), o esperado seria encontrar maior isolamento de micobactérias nas amostras mais próximas ao fundo dos locais de coleta, porém este estudo mostrou maior isolamento de micobactérias a partir da superfície da água. Mas considerando o fato das micobactérias serem microorganismos aeróbios, essa característica pode justificar os resultados obtidos quanto a profundidade.

É importante ressaltar que os resultados deste estudo tomados por meio do cultivo para identificação de MNT foram somente em amostras do Município de Sobral, enfatizando que esse município apresenta águas com grande potencial de contaminação para a população, tanto para hanseníase, como para doenças causadas por outros tipos de micobactérias.

6 CONCLUSÕES

- Comprovou-se a presença de *M. leprae* e MNT 100% das amostras ambientais que são usadas para consumo humano. Ressalta-se que a temperatura influencia significativamente nos resultados obtidos.
- Este estudo encontrou a presença de 43,7% DNA e 44,5% RNAm de *M. leprae* nas amostras de águas ambientais de quatro municípios do Ceará. Demonstrando, portanto, não somente a existência do bacilo da hanseníase, mas indicando fundamentalmente para a existência de bactérias viáveis.
- Através do sequenciamento foi possível afirmar que o fragmento analisado é geneticamente igual ao de *M. leprae* nas amostras analisadas.
- Não foi observada diferença significativa em relação à positividade dos ácidos nucleicos com a profundidade do ponto de coleta das águas.
- Foi observado que a temperatura da água apresenta influencia significativamente estatística na positividade de DNA e/ou RNAm de *M. leprae* nos sítios de coleta. Contudo, condutividade elétrica e pH não apresentaram influencia na positividade ao *M. leprae*.
- Foi observado associação da positividade de DNA e/ou RNAm de *M. leprae* nos sítios de coletas com a proximidade de casos de hanseníase, os quais estão fortemente relacionados com o consumo e contato de hansenianos.
- Foram identificadas 10 espécies de micobactérias não tuberculosas em quatro fontes de água ambiental no município de Sobral os quais são empregadas em consumo humano (*M. simiae*, *M. terrae*, *M. parascrofulaceum*, *M. colombiense*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. alvei*, *M. mucogenicum*, *M. gordonae* e *M. fallax*). Destas, três são classificadas como potencialmente patogênicas na literatura (*M. simiae*, *M. intracellulare*, *M. parascrofulaceum* e *M. scrofulaceum*).
- Desta forma, torna-se importante uma maior investigação da influência dos fatores ambientais na dinâmica de transmissão da hanseníase, esclarecendo o papel da água como importante fonte de contaminação do *M. leprae*.

REFERÊNCIAS

ABIDE, J. M.; WEBB, R. M.; JONES, H. L.; YOUNG, L. Three indigenous cases of leprosy in the Mississippi delta. **South Med. J.**, v. 101, p. 635–638, 2008.

AGUADO, J. M.; GÓMEZ-GARCÉS, J. L.; MANRIQUE, A.; SORIANO, F. Pulmonary infection by *Mycobacterium gorgoniae* in a immunocompromised patient. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 7, p. 261-263, 1987.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. **Am. J. Respir. Crit Care Med.**, v. 156, p. S1-S25, 1997.

AQUINO, D.M.C.; CALDAS, A.J.M.; SILVA, A.A.M.; COSTA, J.M.L. Perfil dos pacientes com hanseníase em área hiperendêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 57-64, 2003.

ARÁOZ, R.; HONORÉ, N.; CHO, S.; KIM, J.P.; MONOT, M.; DEMANGEL, C.; BRENNAN, P.J.; COLE, S. T. Antigen Discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 175-182, 2006.

ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.

BAGARAZZI, M. L.; WATSON, B.; KIM, I. K.; HOGARTY, M.; MCGOWAN, K. L. Pulmonary *Mycobacterium gordonae* infection in a two-year-old child: case report. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 1124-1125, 1996.

BARKER, L. P. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances. **Indian J Med Res.**, v. 123, n.6, p.748-59, 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.

BARON, J. H.; JORGENSEN, M. A.; PFALLER, YOLKEN, R. H. (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 8th ed., v. 1. ASM Press, Washington, D.C. 2003.

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.

BACKER, M.I.; HATTA, M.; KWENANG, A.; MOSSEVELD, P. V; FABER, W, R.; KLATSER P. R.; OSKAM, L. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. **Int. J. Epidemiol.**, v. 33, p 1329-1336, 2004.

BANGE, F. C.; BÖTTGER, E. Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 21, p. 546–548, 2002.

BARROS, R.P.C.; OLIVEIRA, M.L.W.L. Detecção de anticorpos específicos para o antígeno glicolípido fenólico-1 do *M.leprae* (anti PGL-1 IGM): aplicações e limitações. **An. Bras. Dermatol.**, v. 75, p. 745-753, 2000.

BAZAN-FURINI, R.; MOTTA, A. C. F.; SIMÃO, J. C. L.; TARQUÍNIO, D. C.; MARQUES JR, W.; BARBOSA, M. H. N.; FOSS, N. T. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 5, p. 536-540, 2011.

BECHELLI, L.M.; GARBAJOSA, P.G.; GYI, M.M.; WALTER, J.; TAMONDONG, C. Late lepromin reaction in untreated patients with indeterminate leprosy under 21 years old in Burma. **Bull. World Health Organ.**, v. 48, n. 1, p. 113-116, 1973.

BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 7, p. 117-128, 2002.
BELISLE, J.T.; BRENNAN, P.J. Mycobactéria. In: Enciclopedia Microbiol. San Diego: Academic press, 2000. p. 312-327.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdiscip. Perspect. Infect Dis.**, 2012.

BIRCH, L. *et al.* A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 296-301, 2001.

BLAKE, L.A.; WEST, B.C.; LARY, C.H.; TODD JR, I.V. Environmental nonhuman sources of leprosy. **Rev. Infect. Dis.**, v. 9, n. 3, p. 562-577, 1987.

BLAND, C. S.; IRELAND, J. M.; LOZANO, E.; ALVAREZ, M. E.; PRIMM, T. D. Mycobacterial Ecology of the Rio Grande. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 5719-5725, 2005.

BONNET, E.; MASSIP, P.; BAURIAUD, R.; ALRIC, L.; AUVERGNAT, J. C. Disseminated *Mycobacterium gordonae* infection in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p. 644-645, 1996.

BRASIL. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Art 34º, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Distribuição da hanseníase no Brasil**. Brasília, DF, 2012. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31200>.
Acesso em: 2 dez. 2012.

_____. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. 1. ed. Brasília, 2008.

_____. **Relatório de Situação:** Ceará. Brasília, DF, 2011. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_ceara_final.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2012.

_____. **A responsabilidade da atenção básica no diagnóstico da hanseníase:** informe da atenção básica. Brasília, 2007.

_____. **Estratégia de Eliminação da Hanseníase:** estratégia global aprimorada para redução adicional da carga da hanseníase, 2011-2015. Brasília: Organização Mundial da Saúde/ Organização Pan-Americana da Saúde, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/livro_glp_sea_glp_2009_3_025.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2012.

_____. **Guia de Procedimentos Técnicos:** Baciloscopia em Hanseníase. Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_hanseníase_10_0039_m_final.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para o controle da hanseníase.** Brasília, 2002. (Cadernos da Atenção Básica, n. 10).

_____. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncosomose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases:** plano de ação 2011-2015. Brasília, 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_2011_2015.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2013.

_____. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_n_3125_hanseníase_2010.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2012

_____. **Vigilância em saúde:** situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. Brasília, 2008.

_____. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Saúde Amplia Ações Contra Hanseníase No Ceará.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarNoticiaImpressao&codConteudo=4102&codModuloArea=162&impressao=ok>>. Acesso em: dezembro de 2012.

_____. Brasil tem 16,27 milhões de pessoas em extrema pobreza, diz governo. Portal G1 de Notícias, Brasília, maio de 2011. Disponível em: <<http://g1.globo.com/politica/noticia/2011/05/brasil-tem-1627-milhoes-de-pessoas-em-situacao-de-extrema-pobreza.html>>. Acesso em: dezembro de 2012.

BRITO, A. C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública**. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. *Lancet*. v. 363 p.1209-19, 2004.

BRITTON, W. J. Leprosy 1962-1992: immunology of leprosy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 508-514, 1993.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. A. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 3684-3689, 2002.

BÜHRER-SÉKULA, S. M. G.; CUNHA, N. T. F.; OSKAM, L.; FABER, W. R.; KLATSER, P. R. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, n. 4, p. 317-323, 2001.

BUIJTELS, P. C. A. M.; PETIT, P. P. Comparison Of NaOH-N-acetil cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **J. Microbiol. Methods**, v. 62, p. 83-88, 2005.

BROWN-ELLIOTT, B. A. & WALLACE, R. J. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 716–746, 2002.

CAYROU C, TURENNE C, BEHR MA, DRANCOURT M. Genotyping of Mycobacterium avium complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology*. v.156, n. 3, p. 687-94, 2010.

CARDOSO, C. M. **Avaliação de técnicas moleculares para identificação de micobactérias não causadoras de tuberculose**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

CASTILLO-RODAL, A. I.; MAZARI-HIRIART, M.; LLORET-SÁNCHEZ, L. T.; SACHMAN-RUIZ, B.; VINUESA, P.; LÓPEZ-VIDAL, Y. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, n. 5, p. 683–694, 2012.

CAYROU, C.; TURENNE, C.; BEHR, M. A.; DRANCOURT, M. Genotyping of Mycobacterium avium complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology* v.156, p. 687–694, 2010.

CEARÁ. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. **Situação da saúde no Ceará/** Secretaria da Saúde do Estado do Ceará; Organização, Cícera Borges Machado; Manoel Dias da Fonsêca Neto – Fortaleza: Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, 2012.

CEARÁ. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. **Perfil Básico Municipal 2011 – Boa Viagem**. Governo do Estado do Ceará, 2011

_____. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. **Perfil Básico Municipal 2010 – Juazeiro do Norte**. Governo do Estado do Ceará, 2010.

_____. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. **Perfil Básico Municipal 2011 – Crato**. Governo do Estado do Ceará, 2011

_____. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. **Perfil Básico Municipal 2011 – Sobral**. Governo do Estado do Ceará, 2011

CEARÁ. Secretária de Saúde. **Informe Epidemiológico Hanseníase**. Fortaleza, 2012.

CERCENADO, E.; CANTÓN, R. (Ed.). **Procedimientos en Microbiología Clínica**. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005.

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; UEKY, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; DURHAN, A. L.; D'ARBEIT, R.; LEÃO, S. C. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. **BMC Microbiology**, São Paulo, v. 48, n. 8, p. 1-12, mar. 2008.

CHEN-HSIANG, L, HUEY-LING, Y, JUN-WEN W, YA-FEN, T, JIEN-WEI, L. Prosthetic Joint Infection Caused by Mycobacterium alvei in an Elderly Patient. **Journal of clinical microbiology**, v.49, n. 8 p. 3096–3098. 2011.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; GORDON, S. V.; GAS, S.; BARRY, C.E.; EGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

COLE, S. T.; EGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARRELL, B.G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-10011, 2001.

CONCHA, S. T.; COSSIO, T. M. L.; SALAZAR, S. I.; FICH, F. S.; PÉREZZ, C. C.; GONZALEZ, S. B. Enfermedad de Hansen: Revisión a propósito de um caso. **Rev. Chil. Infectol.**, v. 25, n. 1, p. 64-69, 2008.

CORREA, R.G.C.F.; AQUINO, D.M.C.; CALDAS, A.J.M.; AMARAL, D. K. C. R.; FRANÇA, F. S.; MESQUITA, E. R. R. B. P. L. Epidemiological, clinical, and operational

aspects of leprosy patients assisted at a referral service in the state of Maranhão, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 89-94, 2012.

COURET, M. The behavior of bacillus leprae in cold-blooded animals. **J. Exp. Med.**, v. 13, p. 576–589, 1911.

COVERT, T. C.; RODGERS, M. R.; REYES, A. L.; STELEMA, G. N. Occurrence of non tuberculous mycobacteria in environmental sample. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 3159–3161, 1999.

CREE, I. A.; SMITH, W. C. Leprosy transmission and mucosal immunity: towards eradication? **Lepr. Rev.**, v. 69, p. 112-121, 1998.

CRUZ, A. F.; BAZAN FURINI, RENATA.; ROSELINO, A. M. F. Comparison between microsatellites and Ml MntH gene as targets to identify Mycobacterium leprae by PCR in leprosy. **An. Bras. Dermatol.** v.86 n.4, Rio de Janeiro, 2011.

DAILLOUX, M.; LAURIAN, C.; WEBER, M.; HARTEMENN, P. H. Water and nontuberculous mycobacteria. **Water Res.**, v. 33, p. 2219-2228, 1998.

DART, R. K.; STRETTON, R. J. **Microbiological aspects of pollution control**. Amsterdam: Elsevier, 1980.

DATASUS. **Hanseníase**: casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2012. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hanseniase/bases/Hansbrnet.def>>. Acesso em: 17 dez. 2012.

DAVEY, T. F.; REES, R. J. W. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. **Lepr. Rev.**, v. 45, p. 121–134, 1974.

DE MATTOS, K. A.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C.; BOZZA, P. T. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 107, Suppl. I, 2012.

DEPS, P. D.; ALVES, B. L.; GRIPP, C. G.; ARAGAO, R. L.; GUEDES, B.; FILHO, J. B.; ANDREATTA, M. K.; MARCARI, R.S.; PRATES, I.; RODRIGUES, L. C. 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.

DESIKAN, K.V. Viability of Mycobacterium leprae outside the human body. **Lepr. Rev.**, v. 48, p. 231–235, 1977.

DESIKAN, K.V.; SREEVATSA. Extended studies on the viability of M. leprae outside the human body. **Lepr. Rev.**, v. 66, p. 287-295, 1995.

DEVALLOIS, A.; GOH, K. S.; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p. 2969-2973, 1997.

DONOGHUE, H. D.; OVEREND, E.; STANFORD, J. L. A longitudinal study of environmental mycobacteria on a farm in south-west England. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, p.57-67, 1997.

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.

EISENACH, K.D.; CAVE, M.D.; BATES, J.H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, v. 161, n. 5, p. 977-981, 1990.

ENGBAEK, H. C.; VERGMANN, I. B.; BENTZON, M. W. The sodium lauryl sulphate method in culturing sputum for mycobacteria. **Scand. J. Respir. Dis.**, v. 48, p. 268–284, 1967.

ESTEVEZ, F.A. Fundamentos de limnologia. Interciência, Rio de Janeiro. 602 pp., 1998.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium***. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em: 02 Nov. 2012.

FALKINHAN III, J. O. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 5685-5689, 2003.

FALKINHAN III, J. O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. **Clin. Chest. Med.**, v. 20, p. 529-551, 2002.

FALKINHAN III, J. O.; NORTON, C. D.; LE CHEVALLIER, M. W. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 1225-1231, 2001.

FALKINHAN III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 177-215, 1996.

FEAZEL, L. M.; BAUMGARTNER, L. K.; PETERSON, K. L.; FRANK, D. N.; HARRIS, J. K.; PACE, N. R. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, p. 16393–16399, 2009.

FINE, P. E.; STERNE, J. A.; PONNIGHAUS, J. M.; BLISS, L.; SAUI, J.; CHIHANA, A.; MUNTHALI, M.; WARNDORFF, D. K. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **Am. J. Epidemiol.**, v. 146, p. 91-102, 1997.

FINE, P.E. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. **Epidemiol. Rev.**, v. 4, p. 161-188, 1982.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 335-339, 1997.

FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 74, p. 113-119, 1999.

FSIHI, H.; VINCENT, V.; COLE, S. T. Homing events in the *gyrA* gene of some mycobacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci**, vol. 93, p. 3410-3415, 1996.

FROTA, C. C. FREITAS, M. V.; FOSS, N. T.; LIMA, L. N.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; KERR, L. R. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 104, n. 7, p. 490-495, 2010.

FROTA, C. C.; LIMA, L. N.; ROCHA ADA, S.; SUFFYS, P. N.; ROLIM, B. N.; RODRIGUES, L.C.; BARRETO, M. L.; KENDALL, C.; KERR, L. R. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in northeast Brazil. **Mém. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 209-213, 2012.

GLOVER, N. A.; HOLTZMAN, T.; ARONSOS, S. The isolation and identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) recovered from Los Angeles potable water, a possible source of infection in AIDS patients. **Int. J. Environ. Health Res.**, v. 4, p. 63-72, 1994.

GOODFELLOW, M & MAGEE, J. G. **Taxonomy of mycobacteria**. In: Gangadharam PRJ, Jenkins PA. *Mycobacteria: basic aspects*. New York: Champman & Hall; v.1, p. 1-71, 1998.

GORMUS, B. J.; XU, K.; BASKIN, G. B. et al. Experimental leprosy in rhesus monkeys: transmission, susceptibility, clinical and immunological findings. **Lepr. Rev.**, v. 69, p. 235-245, 1998.

GOULART, I. M.; CARDOSO, A. M.; SANTOS, M. S.; GONÇALVES, M. A.; PEREIRA, J. E.; GOULART, L. R. 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. 267-227, 2007.

GOULART, I. M.; PENNA, O.G.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

GRANGE, J. M. Environmental mycobacteria and human disease. **Lepr. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 353-361, 1991.

GRANUCCI, G. F. **Estudo das micobactérias veiculadas pelas águas da região de Itápolis – SP**. 2001. 89 p. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROW-ELLIOT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIM, F. An Official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 175, p. 367-416, 2007.

GRYSEELS, S.; AMISSAH, D.; DURNEZ, L.; VANDELANNOOTE, K.; LEIRS, H. Amoebae as Potential Environmental Hosts for *Mycobacterium ulcerans* and Other Mycobacteria, but Doubtful Actors in Buruli Ulcer Epidemiology. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 8, p. 1764-1774, 2012.

HAFNER, B.; HAAG, H.; GEISS, H. K.; NOLTE, O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. **Mol. Cell Probes**, v. 18, n. 1, p.59-65, 2004.

HASTINGS, R.C.; GILLIS, T.P.; KRAHENBUHL, J.L.; FRANZBLAU, S.G. Leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, n. 3, p. 330-348, 1988.

HECKERT, R. A.; ELANKUMARAN, S.; MILANI, A.; BAYA, A. Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 710–715, 2001.

HIDAKA, E.; HONDA, T.; UENO, I.; YAMASAKI, Y.; KUBO, K.; KATSUYAMA, T. Sensitive identification of mycobacterial species using PCR-RFLP on bronchial washings. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, p. 930–934, 2000.

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

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994.

HUTCHINSON, J. **On leprosy and fish-eating**: a statement of facts and explanations. [S. l.]: Archibald Constable and Co., 1906.

IBGE Cidades. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>
Acesso em: novembro de 2012.

IGNOTTI, E.; DE PAULA, R. C. Situação Epidemiológica da Hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010. In: BRASIL. Ministério da Saúde. (Org.). **Saúde Brasil 2010**: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. Brasília, v. 1, p. 185-202, 2011.

IIVANAINEN, E. Isolation of mycobacteria from acid forest soil samples: comparison of culture methods. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 663-668, 1995.

IIVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P. J.; KATILA, M. L. Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, p. 121-127, 1997.

IIVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P. J.; KATILA, M. L. Effect of freezing of water samples on viable counts of environmental mycobacteria. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 21, p. 257-260, 1995.

IIVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P. J.; VÄÄNÄNEN, P.; KATILA, M. L. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 398-404, 1993.

IIVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P. J.; VÄÄNÄNEN, P.; KATILA, M. L. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 673-681, 1999.

ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. 1st ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

JARDIN, J. B. Amibes limax vecteurs possible de Micobacteries et de *M. leprae*. **Act Lepr.**, v. 59, p. 37-67, 1975.

JENKINS, P. A.; PATTYN, S. R.; PORTAELS, F. Diagnostic bacteriology. In: RATLEDGE, C.; STANFORD, J. (Ed.). **The biology of the mycobacteria**. London: Academic Press, 1982. v. 1, p. 441-470.

KAMALA, T.; PARAMASIVAN, C. N.; HERBERT, D.; VENKATESAN, P.; PRABHAKAR, R. Evaluation of procedure for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 1021-1024, 1994.

KANAI, K. Y. **Detecção e identificação de micobactérias em corpos de água destinados à captação para abastecimento urbano da cidade de São Carlos – SP**. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e de Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

KANG, T. J.; KIM, S. K.; LEE, S. B.; CHAE, G.T.; KIM, J.P. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 28, n. 4, p. 420-424, 2003.

KATOCH, V.M. Infections due to non-tuberculous micobactéria (NTM). **Indian J. Med. Res.**, v. 120, p. 290-304, 2004.

KAZDA, J. Occurrence of non-cultivable acid-fast bacilli in the environment and their relationship to *M. leprae*. **Lepr. Rev.**, v. 52, Suppl. 1, p. 85-91, 1981.

KAZDA, J.; GANAPATI, R.; REVANKAR, C.; BUCHANAN, T. M.; YOUNG, D. B.; IRGENS, L.M. Isolation of environment-derived *Mycobacterium leprae* from soil in Bombay. **Lepr. Rev.**, v. 57, Suppl. 3, p. 201-208, 1986.

KAZDA, J.; IRGENS, L.M.; MULLER K. Isolation of non-cultivable acid-fast bacilli in sphagnum and moss vegetation by foot pad technique in mice. **Int. J. Lepr. Mycobact. Dis.**, v. 48, p. 1–6, 1980.

KERR-PONTES, L. R. S.; MONTENEGRO, A. C. D.; BARRETO, M. L.; WERNECK, G. L.; FELDMEIERS, H. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. **Int. J. Epidemiol.**, v. 33, p. 262-269, 2004.

KERR-PONTES, L. R.; FROTA, C. C.; REZENDE, A.; DE SOUSA, C. A. B.; Barreto, M. L.; Evangelista, C. M. N.; Rodrigues, L. C. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: Results of a case-control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, p. 994-1000, 2006.

KIRSCHNER JUNIOR, R. A.; PARKER, B. C.; FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 145, p. 271-275, 1992.

KLATSER, P. R. Serology of leprosy. **Trop. Geograp. Med.**, v. 46, p. 115-118, 1994.

KRAHENBUHL, J.; ADAMS, L. B. Exploitation of gene knockout mice models to study the pathogenesis of leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 71, p. 170-175, 2000.

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. **Lepr. Rev.**, v. 79, p. 401–409, 2008.

LANA, F. C. F.; AMARAL, E. P.; LANZA, F. M.; LIMA, P. L.; CARVALHO, A. C. N.; DINIZ, L. G. Hanseníase em menores de 15 anos no Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 60, p. 696-700, 2007.

LAVANIA, M.; KATOCH, K.; KATOCH, V.M.; GUPTA, A. K.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, R.; GANDHI, R.; CHAUHAN, V.; BANSAL, G.; SACHAN, P.; SACHAN, S.; YADAV, V. S.; JADHAV, R. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infect. Genet. Evol.**, v. 8, p. 627–631, 2008.

LAVANIA, M.; KATOCH, K.; SACHAN, P.; DUBEY, A.; KAPOOR, S.; KASHYAP, M.; CHAUHAN, D. S.; SINGH, H. B.; SHARMA, V. D.; JADHAV, R.S.; KATOCH, V.M. Detection of *Mycobacterium leprae* from soil samples by PCR targeting RLEP sequence. **J. Commun. Dis.**, v. 38, n. 3, p. 269-273, 2006.

LEÃO, S. C. BRIONES, M. R. S.; SIRCILI, M. P.; BALIAN, S. C.; MORES, N.; FERREIRA-NETO, J. S. Identification of Two Novel *Mycobacterium avium* Allelic Variants in Pig and Human Isolates from Brazil by PCR-Restriction Enzyme Analysis. **J. Clin. Microbiol.**, p. 2592–2597, 1999.

LEÃO, S. C.; BRIONES, M. R.; SIRCILI, M. P.; BALIAN, S. C.; MORAES, N.; FERREIRA-NETO, J. S. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 8, p. 2592-2597, 1999.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.** [S.l: s.n.] ,2004.

LE DANTEC, C.; DUGUET, J. P.; MONTIEL, A.; DUMOUTIER, N.; DUBROU, S.; VINCENT, V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution system. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 5318-5325, 2002.

LEE, H.; PARK, H.; CHO, S.; BAI, G.; KIM, S. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2966–2971, 2000.

LEITE, C. Q. F. **Estudo epidemiológico das micobactérias das águas de algumas regiões do Estado de São Paulo.** 1991. 106 p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1991.

LEITE, C. Q. F.; FERRACINI JR, R.; FALCÃO, D. P.; LEVY-FREBAUT, V. Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do Estado de São Paulo. **Rev. Microbiol.**, v. 20, p. 432-441, 1989.

LEMENSE, G. P.; VANBAKEL, A. B.; CRUMBLEY III, A. J.; JUDSON, M. A. *Mycobacterium scrofulaceum* infection presenting as lung nodules in a heart transplant recipient. **Chest**, v. 106, p. 1918-1920, 1994.

LEONI, E.; LEGNANI, P.; MUCCI, M. T.; PIRANI, R. Prevalence of mycobacteria in swimming pool environment. **J. Appl. Microbiol.**, v. 87, p. 683-688, 1999.

LEVY-FRÉBAUT, V. V.; PORTAELS, F. Proposed minimal standarts for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 315-326, 1992.

MACIEIRA, S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. Disponível em: <http://hansen.bvs.ils.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoos/PDF/aspecto_leprae.pdf>. Acesso em: novembro de 2012.

MACHADO, K. Controle da hanseníase. Agora, de olho nos jovens. **Radis**, v. 68, p. 10-13, 2008.

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

MAEDA, S. *et al.* Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, vol. 45, n. 12, p. 3635–3639, 2001.

MANIAR, A. C.; VENBUCKETHOUT, L. R. *Mycobacterium kansasii* from environmental source. **Can. J. Public Health**, v. 67, p. 59-60, 1976.

MARRAS, T. K.; CHEDORE, P.; YING, A. M.; JAMIESON, F. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. **Thorax**, v. 62, p. 661–666, 2007.

MARSOLLIER, L.; STINEAR, T.; AUBRY, J.; ST. ANDRE, J. P.; ROBERT, R.; LEGRAS, P.; MANCEAU, A. L.; AUDRAIN, C.; BOURDON, S.; KOUAKOU, H.; CARBONNELLE, B. Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 1097–1103, 2004.

MATSUOKA, M.; IZUMI, S.; BUDIAWAM, T.; NAKATA, N.; SAEKI, K. *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.

MARTINEZET, 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.

MENDONÇA, V.A *et al.* Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 83(4), p.343-50, 2008.

MEYERS, W.M.; MARTY, A.M. Current concepts in the pathogenesis of leprosy. Clinical, pathological, immunological and dermotherapeutic aspects. **Drugs**, v. 41, n. 6, p. 832-856, 1991.

MIRANZI, S. S. C.; PEREIRA, L. H. M.; NUNES, A. A. Perfil epidemiológico da hanseníase em um município brasileiro, no período de 2000 a 2006. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 1, p. 62-67, 2010.

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.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 1, p. 48-54, 2010.

MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Immune regulation: learning from leprosy. **Hosp. Pract.**, v. 28, n. 11, p. 71-84, 1993.

MODLIN, R.T.; MELACON, K.J.; YOUNG, S.M.M.; PIRMEZ, C.; KINO, H.; CONVIT, J.; REA, T.H.; BLOOM B.R. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 1213-1217, 1988.

MOKADDAS, E.; AHMAD, S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *M. tuberculosis* complex members from non-tuberculous micobactéria. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 60, p. 140-144, Apr. 2007.

MONTENEGRO, A.C., WERNECK, G.L., KERR-PONTES, L.R., BARRETO, M.L., FELDMIEIER, H., Spatial analysis of the distribution of leprosy in the State of Ceara, Northeast Brazil. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 99, 683-686, 2004.

MOSTAFA, H. M.; KAZDA, J.; IRGENS, L. M.; LUESSE, H. G. Acid-fast bacilli from former leprosy regions in coastal Norway showing PCR positivity for *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr. Mycobact. Dis.**, v. 63, p. 97-99, 1995.

MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L.W.; BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 2, p.11-18, 2008.

MUN, H. S., PARK, J.; KIM, H.; YU, H.; PARK, Y.; CHA, C.; KOOK, Y.; KIM, B. *Mycobacterium senuense* sp. nov., a slowly growing, non-chromogenic species closely related to the *Mycobacterium terrae* complex. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58 p. 641-646, 2008.

MURCIA, M. I.; TORTOLI, E.; MENENDEZ, M. C.; PALENQUE, E.; GARCIA, M. L. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 2049-2054, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NEUMANN, M.; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; HAGENAU, C.; BEHRINGER, K. Comparison of method for isolation of mycobacteria from water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 547-552, 1997.

OTTENHOFF, T.H.M. Immunology of leprosy. **Trop. Geograp. Med.**, v. 46, p. 72-80, 1994.

PARASHAR, D.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, V. D.; CHAUHAN, A. CHAUHAN, S. V. S.; KATOCH, V. M. optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in Northern India. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 3751-3753, 2004.

PETIT, F.; CRAQUELIN, S.; GUESPIN-MICHEL, J.; BUFFET-JANVRESSE, C. Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. **Rev. Microbiol.**, v. 150, p. 143-151, 1999.

PFYFFER, G. E.; BROWN-ELLIOT, B. A.; WALLACE JR, R. J. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. In: MURRAY, P. R.; BARON, E.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003. p. 531-559.

PHILPOTT, J. A.; WOODBURNE, A. R.; PHILPOTT, O. S.; SCHAEFER, W. B.; MOLLOHAN, C. S. Swimming pool granuloma: a study of 290 cases. **Arch. Dermatol.**, v. 88, p. 158-162, 1963.

PLIKAYTIS, B. B.; PLIKAYTIS, B. D.; YAKRUS, M. A.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; SILCOX, V. A.; SHINNICK T. M. Differentiation of slowly growing

Mycobacterium species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol.**, v. 30, n. 7, p. 1815–1822, 1992.

PITOMBO, M. B.; LUPI, O.; DUARTE, R. S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 31 n.11, 2009.

PLIKAYTIS, B. B.; GELBER, R. H.; SHINNICK, T. M. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 9, p. 1913-1917, 1990.

PLIKAYTIS, B. B.; PLIKAYTIS, B. D.; YAKRUS, M. A.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; SILCOX, V. A.; SHINNICK, T. M. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p. 1815-1822, 1992.

PORTAELS, F. Epidemiology of mycobacterial diseases. **Clin. Dermatol.**, v. 13, p. 207-222, 1995.

PORTAELS, F.; MUYNK, A. D.; SYLLA, M. P. Selective isolation of mycobacteria from soil: a statistical analysis approach. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 849–855, 1988.

PRIMM T. P. LUCERO, C. A.; FALKINHAM, J. O.; Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 98-106, 2004.

RADOMSKI, N.; CAMBAU, E.; MOULIN, L.; HAENN, S.; MOILLERON, R.; LUCAS, F. S. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 3514-3520, 2010.

RESS, R. J. W. Can arthropods transmit leprosy? **Lepr. Rev.**, v. 43, p. 165-166, 1972.

RESS, R. J. W. Do flies transmit leprosy? **Lepr. Rev.**, v. 46, p. 255-256, 1975.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: A five-group system. **Int. J. Lepr.**, v.34, p.255-273, 1966.

RODRIGUES, I. J. S. S. **Validação de um algoritmo para identificação de *Mycobacterium* spp. no diagnóstico laboratorial.** 2012. 169 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) – Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

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

ROSS, B. C.; JOHNSON, P. D. R.; OPPEDISANO, F. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. **J. Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 4135-4136, 1997.

RUNYON, E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Med. Clin. North Am.**, v. 43, p. 273-290, 1959.

RUSCONI, S. A.; GORI, A.; VAGO, L.; MARCHETTI, G.; FRANZETTI, F. Cutaneous infection caused by *Mycobacterium gordonae* in a human immunodeficiency virus-infected patient receiving antimycobacterial treatment. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1490-1491, 1997.

SAHA, K.; JAIN, M.; MUKHERJEE, M. K.; CHAWLA, N. M.; CHAUDHARY, D. S.; PRAKASH, N. Viability of *Mycobacterium leprae* within the gut of *Aedes aegypti* after they feed on multibacillary lepromatous patients: a study by fluorescent and electron microscopes. **Lepr. Rev.**, v. 56, p. 279-290, 1985.

SAHRAOUI, N.; ZELLEG, S.; YOUSFI, N.; ZINSSTAG, J.; GUETARNI, D. Survey on tuberculosis goats in two slaughterhouses in Algeria. *African Journal of Agricultural Research* v. 6, p. 6741-6744, 2011.

SALEM, I. J.; FONSECA, M. J. O. Bacilos álcool-ácido-resistentes na água do Lago do Aleixo. **Hansen. Int.**, v. 7, n. 1, p. 25-35, 1982.

SAMPAIO, J. L.; NASSAR JUNIOR, D.; DE FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A. L.; MIYASHIRO, K.; ALBERTO, F. L.; LEAO, S.C. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 9, p. 3201-3207, 2006.

SANGUINETTI, G. MILO, M.; RATTRAY, M.; LAWRENCE, N. D. Accounting for probe-level noise in principal component analysis of microarray data. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3748-3754, 2005.

SANTOS, R.; FERNANDES, J.; FERNANDES, N.; OLIVEIRA, F.; CEDETE, M. *Mycobacterium parascrofulaceum* in acidic hot springs in Yellowstone National Park. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 15, p. 5071-5073, 2007.

SANTOS, A. P. T. *et al.* Imunopatologia da hanseníase: aspectos clínicos e laboratoriais. **NewsLab**, edição 73, p.142-156, 2005.

SASAKI, B. M.; COOPER, A. M. Restraining mycobacterie: role of granulomas in micobacterial infections. **Immunol. Cell Biol.**, v. 78, p. 334, 2001.

SAÚDE amplia ações contra hanseníase no Ceará. **Veja Juazeiro**, 2012. Disponível em:< <http://vejajuazeiro.com.br/v2/index.php/cariri/item/2608-sa%C3%BAde-amplia-a%C3%A7%C3%B5es-contra-hansen%C3%ADase-no-cear%C3%A1.html>>. Acesso em: 30 dez. 2012.

SCHULZE-RÖBBECKE, R.; JANNING, B.; FISCHEDER, R. Occurrence of mycobacteria in biofilms samples. **Tubercle Lung Dis.**, v. 73, p. 141-144, 1992.

SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L.B.; GILLIS, T. P. KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 338-381, 2006.

SHERIDAN, G. E. C. MASTERS, C. I.; SHALLCROSS, J. A.; MACKEY, B. M. 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.

SHINNICK, T. M. The 65-kilodalton of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.** 169:1080–1088, 1987.

SILVA, A. R.; MATOS, W.B.; SILVA, C. C. B.; GONÇALVES, E. G. R. Hanseníase no município de Buriticupu, Estado do Maranhão: busca ativa de casos na população adulta. **Rev Soc Bras Med Trop.** 43:691-694, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HANSENOLOGIA. **Indicadores epidemiológicos operacionais de hanseníase no Brasil 2000-2011**: ainda uma realidade preocupante. 2012. Disponível em:<<http://www.sbhansenologia.org.br/index.php/epidemiologia>>. Acesso em: 25 nov. 2012

SONGER, J. G. Methods for selective isolation of mycobacteria from the environment. **Can. J. Microbiol.**, v. 22, p. 1–7, 1981.

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

SOUZA, C. W. O. **Ocorrência de *Mycobacterium* sp em exemplares de *Rana catesbeiana*, SHAW, 1802, de alguns ranários comerciais do estado de São Paulo, Brasil.** 1993. 80 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

SPRINGER, B. et al. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 2, p. 296-303, 1996.

SREEVATSA. Leprosy and arthropods. **Indian J. Lepr.**, v. 65, p. 189–200, 1993.

STEFANI, M. M. A.; GRASSI, A. B.; SAMPAIO, L. H.; DE SOUSA, A. L.; COSTA, M. B.; SCHEELBEEK, P.; NEUPANE, K. D.; HAGGE, D. A.; MACDONALD, M.; CHO, S. N.; OSKAM, L.; BÜHRER-SÉKULA, S. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, 2012.

STEINERT, M.; BIRKNESS, K.; WHITE, B.; FIELDS, B.; QUINN, F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 2256-2261, 1998.

STEINGRUBE, V. A. GIBSON, J. L.; BROWN, B. A.; ZHANG, Y.; WILSON, R. W.; RAJAGOPALAN, M.; WALLACE JR, R. J.; PCR Amplification and Restriction Endonuclease Analysis of a 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene Sequence for Taxonomic 14. Separation of Rapidly Growing Mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 149-153, 1995.

STERNE, J. A.; PONNIGHAUS, J. M.; FINE, P. E.; MALEMA, S. S. Geographic determinants of leprosy in Karonga District, Northern Malawi. *Int. J. Epidemiol.*, v. 24, p. 1211–1222, 1995.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. DNA gyrase subunit A, Function. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/uniprot/Q57532> >. Acesso em: dezembro de 2012.

TAYLOR, C. E.; ELLISTON, E. P.; GIDEON, H. Asymptomatic infections in leprosy. *Int. J. Lepr. Mycobact. Dis.*, v. 33, p. 716–731, 1965.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTER, E.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 175-178, 1993.

THOMSON, R.; CARTER, R.; GILPIN, C.; COULTER, C.; HARGREAVES, M. Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 74, p. 3094–3098, 2008.

THOREL, M. F.; FALKINHAN, J. O. III; MOREAU, R. G. Environmental mycobacteria from alpine and subalpine habitats. *FMES Microbiol. Ecol.*, v. 49, p. 343-347, 2004.

TORTOLI, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 15, p. 906-910, 2009.

TORTOLI, E. The new mycobacteria: na update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 48, p. 159-178, 2006.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 2, p. 319-354, 2003.

TORTOLI, E.; BARTOLONI, A.; ERBA M.; LEVRÈ, E.; LOMBARDI, N.; MANTELLA, A.; MECOCCHI, L. Human infections due to *Mycobacterium lentiflavum*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 728–729, 2002.

TRUMAN, R.; FINE, P. E. M. Environmental sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. *Lepr. Rev.*, v. 81, p. 89–95, 2010.

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

TRUMAN, R. W.; SHANNON, E. J.; HAGSTAD, H. V.; HUGH-JONES, M. E.; WOLFF, A.; HASTINGS, R. C. Evaluation of the origin of *Mycobacterium leprae* infections in the wild armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 35, n. 3, p. 588-593, 1986.

TSAI, Y.; OLSON, B. H. Rapid method for separation of bacterial dna from humic substances in sediments for Polymerase Chain Reaction. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 58, n. 7 p. 2292-2295, 1992

TURANKAR, R.P.; LAVANIA, M.; SINGH, M.; SIVA, Sai K.S.; JADHAV, R. S. Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: deciphering the role of environment as a potential reservoir. **Infect. Genet. Evol.**, v. 12, n. 1, p. 121-126, 2012.

TURENNE, C. Y.; COOK, V. J.; BURDZ, T. V. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov, novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.54, n. 5, p. 1543–1551, 2004.

UEKI, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; TELLES, M. A. S.; VIRGILIO, V. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, p. 1-8, 2005.

VAEREWIJCK, M. J. M.; HUYS, G.; PALOMINO, J. C.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Mycobacteria in drinking water distribution systems; ecology and significance for human health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 911–934, 2005.

VAN BEERS, S.M.; DE WIT, M.Y.L.; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Recent insight. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 136, p. 221-230, 1996.

VINCENT, V., B. A. BROWN-ELLIOTT, K. C. J. JOST, AND R. J. J. WALLACE. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification, p. 560-584. In P. R. Murray, E. J.

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.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genoma of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol.**, v. 2, n. 8, reviews 1023.1-1023.8, 2001.

VUORENMAA K. *Mycobacterium colombiense* and pseudotuberculous lymphadenopathy. **Emerg Infect Dis** v. 15, p. 619, 2009.

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.

WALLACE RJ JR, SWENSON JM, SILCOX VA, GOOD RC, TSCHEN JA, STONE MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. **Rev Infect Dis**.v.5, n. 4, p. 657-79, 1983.

WALKER, S.L.; LOCKWOOR, D.N.J. The clinical and immunological features of leprosy. **Br. Med. Bull.**, v. 77-78, p. 103-121, 2006.

WALSH, G. P.; MEYERS, W. M.; BINFORD, C. H. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975–1985. **J. Leukoc. Biol.**, v. 40, p. 645–656, 1986.

WAYNE, L. G.; GROSS, W. M. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from mycobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 96, p.1915-1919, 1968.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, D. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, p. 6578–6583, 1998.

WILDNER, L. M.; NOGUEIRA, C. L.; SOUZA, B. S.; SENNA, S. G.; SILVA, R. M.; BAZZO, M. L. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, p. 207-229, 2011.

WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. **Leprosy Review**, vol. 75, p. 118-130, 2004.

WILLIAMS, D.L.; GILLIS, T.P.; BOOTH, R.J.; LOOKER, D.; WATSON, J. D. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J. Infect.**, v. 162, p. 193-200, 1990.

WIT, M.I.L.; FABER, W.R.; KRIEG, S.R.; DOUGLAS, J.T. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 906-910, 1991.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. **Mol. Microbiol.**, v. 4, p. 1745-1751, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy elimination. Leprosy Today. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/en/>>. Acesso em: 17 Nov. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**. n. 34, p. 317-328, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy elimination. **Leprosy Today**. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/en/>>. Acesso em: 22 Out. 2010.

YOON, D.H.; CHO, S.N.; LEE, M.K. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 895-899, 1993.

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.

YOUNG, S. K.; TAYLOR, G. M.; JAIN, S.; SUNEETHA, L. M.; SUNEETHA, S.; LOCKWOOD, D. N. *et al.* Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4931-4936, 2004.

ZUBER, B.; CHAMI, M.; HOUSSIN, C.; DUBOCHET, J.; GRIFFITHS, G.; DAFPE, M. Direct Visualization of the Outer Membrane of *Mycobacteria* and *Corynebacteria* in Their Native State. **J. Bacteriol.**, p. 5672–5680, 2008.

APÊNDICE A – LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE COLETAS DO MUNICÍPIO DE JUAZEIRO DO NORTE



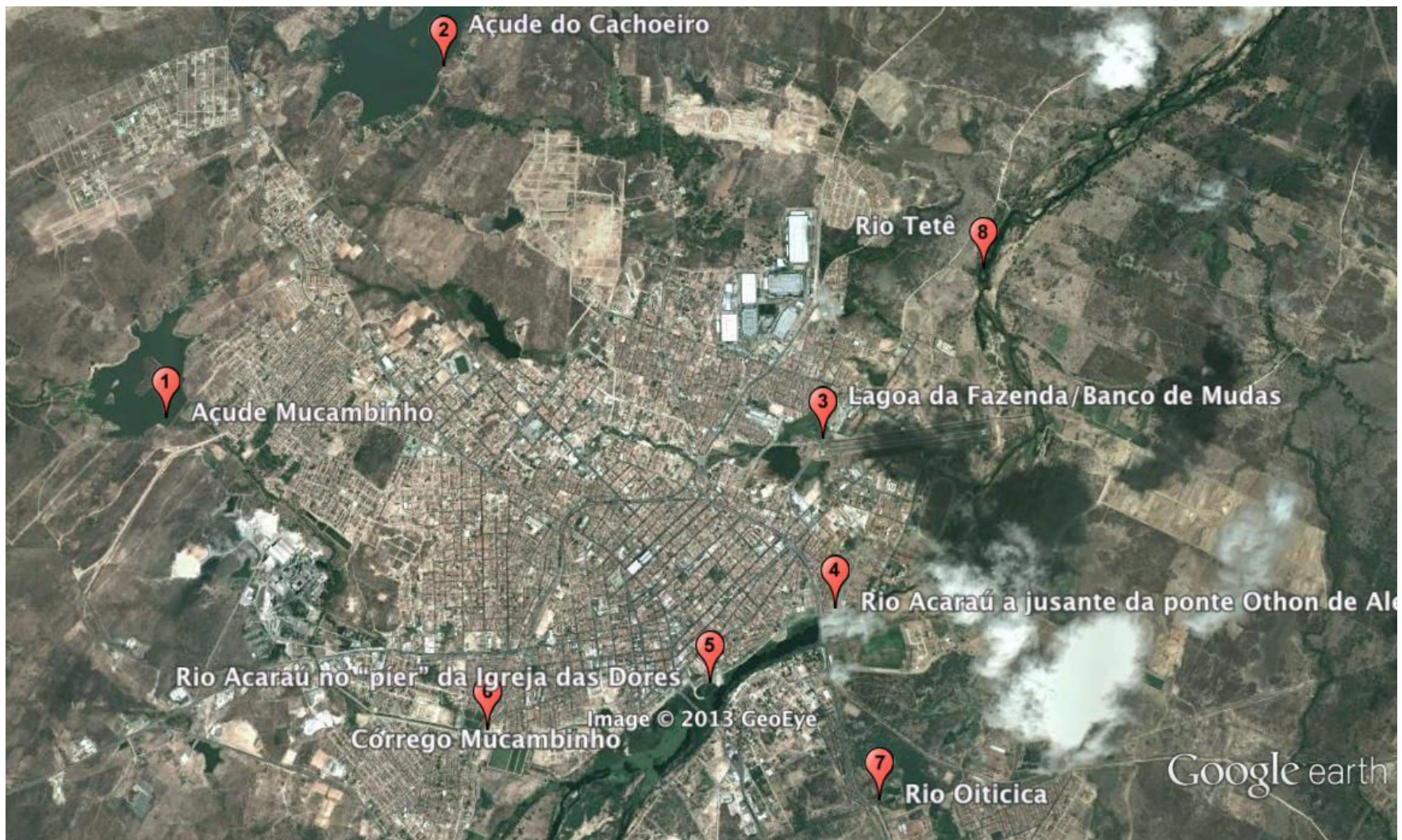
Fonte: Imagem do Google Earth.

APÊNDICE B – LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE COLETAS DO MUNICÍPIO DE CRATO



Fonte: Imagem do Google Earth.

APÊNDICE C – LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE COLETAS DO MUNICÍPIO DE SOBRAL



Fonte: Imagem do Google Earth.

APÊNDICE D – LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE COLETAS DO MUNICÍPIO DE BOA VIAGEM



Fonte: Imagem do Google Earth.

APÊNDICE E – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

(Power Water DNA Isolation Kit - MoBio)

Introdução: O PowerWater DNA Isolation Kit pode isolar DNA genômico de uma variedade de amostras de água filtrada. Utilizando Inhibitor Removal Technology (IRT), mesmo a água contendo grandes quantidades de contaminantes podem ser processadas para fornecer DNA de alta qualidade e rendimento. O kit difere do Ultra Clean pela adição de um novo *bead tube* com uma mistura de beads otimizados, um tampão de lise reformulada, tecnologia em IRT e a redução do volume de amostra de modo que quase todo processamento ocorre em uma microcentrífuga. O DNA purificado possui um volume de eluição final de 100 μL .

Importante: Usar luvas durante todo o protocolo e evitar contato da pele com reagentes.

Solution PW1 deve ser aquecida a 55°C por 5 a 10 min para dissolver precipitados antes do uso. Essa solução deve ser usada ainda quente. Solution PW3 pode precipitar ao longo do tempo. Se a precipitação ocorrer, aqueça a 55°C por 5 a 10 min. Essa solução deve ser usada ainda quente. Agite para misturar a Solution PW4 antes do uso.

PROTOCOLO

1. Filtrar as amostras de água utilizando um filtro ligado a uma bomba de vácuo. O volume de água filtrado depende da carga microbiana e turbidez da amostra de água.
2. Se estiver utilizando um filtro MO BIO, remover a parte superior correspondente a 100 mL do copo do filtro do reservatório de captura, colocando-a fora.
3. Usar pinças estéreis para coletar a membrana filtrante branca.
4. Inserir a membrana no PowerWater Bead Tube 5 mL.
5. Adicionar 1 mL de Solution PW1 no PowerWater Bead Tube 5 mL.
6. Colocar PowerWater Bead Tube horizontalmente em um MO BIO vortex adaptador.
7. Vortex na velocidade máxima por 5 min.
8. Centrifugar (@) os tubos a 4000 rpm por 1 min à TA.
9. Transferir todo o sobrenadante para um limpo Collection Tube 2 mL. Retire o sobrenadante usando uma pipeta de 1 mL colando a ponteira abaixo dos beads.

OBS: Colocar a ponteira abaixo dos beads é necessário. Pipetar mais de uma vez para garantir a remoção de todo o sobrenadante. Qualquer reporte de beads não afetará as etapas subseqüentes. A expectativa é recuperar entre 600/650 μ L do sobrenadante dependendo do tipo de membrana filtrante utilizada.

10. @ a 13000 rpm 1 min.

11. Evitando o pellet, transferir o sobrenadante para um novo Colletion Tube 2 mL.

12. Adicionar 200 μ L de Solution PW2 e vortex brevemente (10s) para misturar.

13. @ a 13000 rpm 1 min.

14. Evitando o pellet, transferir o sobrenadante para um novo Colletion Tube 2 mL.

15. Adicionar 600 μ L de Solution PW3 e vortex brevemente (10s) para misturar.

16. Transferir 650 μ L do sobrenadante para um Spin Filter e @ por 1 min a 13000 rpm.

Descartar o material que passar pelo filtro e repetir a operação até todo o sobrenadante ter passado pelo Spin Filter.

OBS: Um total de 2 transferências serão necessárias.

17. Transferir o Spin Filter para dentro de um Colletion Tube 2 mL.

18. Agitar para misturar a Solution PW4 antes de usar. Adicionar 650 μ L de Solution PW4 e @ a 13000 rpm 1 min.

19. Descartar o filtrado e adicionar 650 μ L de Solution PW5 e @ a 13000 rpm 1 min.

20. Descartar o filtrado e @ novamente a 13000 rpm por 2 min para remover os resíduos de lavagem.

21. Transferir um Spin Filter para dentro de um Colletion Tube 2 mL.

22. Adicionar 100 μ L de Solution PW6 no centro da membrana branca filtrante.

23. @ a 13000 rpm 1 min.

24. Descartar o Spin Filter. O DNA está pronto para qualquer utilização.

APÊNDICE F – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO RNA total DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

(Power Water RNA Isolation Kit - MoBio)

Importante: Aquecer a Solution **PWR1** a 55 °C antes de usar, durante 5 a 10 minutos, para dissolver precipitados. Use a solução PWR1 enquanto ainda estiver quente.

1. Filtrar as amostras de água utilizando um filtro associado a uma fonte de vácuo. O volume de água filtrado dependerá da carga microbiana e da turbidez da amostra de água. (Ver tipos de amostra de água no Troubleshooting).
2. Depois da filtração, remover a parte superior do recipiente do filtro.
3. Usando duas pinças estéreis, apanhar a membrana por bordas opostas e enrolar levemente de modo que ela caiba dentro de um cilindro. O lado de cima da membrana deve estar voltado para o interior. OBS: Não apertar ou dobrar demais a membrana do filtro. Um vídeo desta técnica está disponível no site do MO BIO.
4. Insirir a membrana no Power Water Bead Tube de 5 ml.
5. Adicionar 1 ml de Solution **PWR1** contendo β ME ao Power Water Bead Tube.
Alternativamente: Adicione 990 μ l de PWR1 Solution e 10 μ l de β ME diretamente em cada tubo.
6. Assegurar-se de que as tampas estão firmemente fixadas ao *Power Water Bead Tube*.
7. Fixar o *Power Water Bead Tube* horizontalmente no vortex com adaptador. As tampas dos tubos devem estar orientadas em direção ao centro do adaptador.
8. Usar o vortex em velocidade máxima por 5 min.
9. Centrifugar os tubos a $<4000 \times g$ por 1 minuto à temperatura ambiente. (Este passo é opcional se uma centrífuga de tubos de 15 não estiver disponível).
10. Transferir todo o sobrenadante para um *Collection Tube*. Puxe o sobrenadante utilizando uma ponteira de 1 ml. Assegure a remoção de todo o sobrenadante. É esperado recuperar entre 600 e 650 μ l de sobrenadante.
11. Centrifugar a $13000 \times g$ por 1 minuto.
12. Evitando tocar o pellet, transferir o sobrenadante para um *Collection Tube* limpo.

13. Adicionar 200 µl de Solution **PWR2** e vortex rapidamente para misturar. Incubar a 4 °C por 5 min. OBS: Este passo pode ser omitido para amostras de água sem turbidez que estão livres de inibidores de PCR.
14. Centrifugar a 13000 x g por 1 minuto.
15. Evitando o pellet, transferir o sobrenadante para um Collection Tube limpo.
16. Adicionar 650 µl de Solution **PWR3** e 650 µl de Solution **PWR4**. Vortex para misturar.
17. **(Repetir 3x)** Levar 650 µl do sobrenadante até um Spin Filter e centrifugar a 13000 x g por 1 minuto. Descartar o filtrado e repita até que todo o sobrenadante tenha sido levado até o Spin Filter.
18. Agitar a Solution **PWR5**. Adicionar 650 µl de Solution PWR5 e centrifugar a 13000 x g por 1 minuto.
19. Descartar o filtrado e centrifugar de novo a 13000 x g por 1 minuto para remover a lavagem residual.
20. Colocar o cesto do *Spin Filter* em um *Collection Tube* de 2 ml limpo.
21. Adicionar 50 µl de DNase I Solution (preparada pela mistura de 45 µl de de Solution **PWR6** e DNase I Stock Solution) bem no centro do *Spin Filter*.
22. Incubar à temperatura ambiente por 15 minutos. OBS: Não centrifugar o *Spin Filter* antes da adição da *Solution PWR7*.
23. Adicionar 400 µl de Solution **PWR7** e centrifugar a 13000 x g por 1 minuto.
24. Descartar o filtrado e adicionar 650 µl da Solution **PWR5** e centrifugar a 13000 x g por 1 minuto.
25. Descartar o filtrado, adicionar Solution **PWR4** e centrifugar a 13000 x g por 1 minuto.
26. Descartar o filtrado e centrifugar de novo a 13000 x g por 2 minutos para remover a lavagem residual.
27. Colocar o Spin Filter dentro de um Collection Tube de 2 ml limpo.
28. Adicionar 100 µl de Solution **PWR8** no centro da membrana de filtro branca. OBS: A eluição com 100 µl de Soluton PWR8 irá maximizar o rendimento do RNA. Para um RNA concentrado, um mínimo de 50 µl de Solution PWR8 deve ser usado. Não usar que 50 µl de Solution PWR8.
29. Centrifugar a 13000 x g por 1 minuto.
30. Descartar o cesto Spin Filter. O RNA no tubo pode ser estocado a – 80 °C até seu uso.

Observações:

- Preparação de *DNase I stock enzyme*:

Adicionar 300 μl de *RNase-Free Water (Solution PRW8)* no recipiente de pó liofilizado de *DNase I* e agitar gentilmente. Aliquite a *DNase I stock enzyme* em porções de 50 μl , estocando-as a -20°C . Nota: A *DNase I stock enzyme* pode ser congelada/descongelada 3 vezes sem perda de atividade.

- Preparação da *DNase I Solution*

Descongelar a quantidade de *DNase I stock enzyme* necessária de acordo com o número de amostras. Combinar 5 μl de *DNase I stock enzyme* com 45 μl de *Solution PWR6*.

Número de preparações	<i>DNase I stock enzyme</i>	<i>Solution PWR6</i>
1	5 μl	45 μl
2	10 μl	90 μl
10	50 μl	450 μl

APÊNDICE G – PREPARAÇÃO TAMPÃO TBE (Tris Borato EDTA) 1x

Preparação da solução de estoque 10X:

Tris Base 1M.....	121 g
Ácido Bórico 0,9M.....	61,83 g
EDTA 10mM.....	18,612 g

1. Dissolver os componentes em 600 ml de água destilada.
2. Ajustar o pH final para 8.
3. Completar o volume até 1000 ml com água destilada.
4. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Preparação da solução de TBE 1X:

Aliquotar 100 ml de TBE 10X e diluir em 900 ml de água destilada.

APÊNDICE H – TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELEN

1. Preparar um esfregaço em uma lâmina limpa e deixar secar à temperatura ambiente.
2. Fixar o material do esfregaço passando três a quatro vezes pela chama do bico de Bunsen.
3. Cobrir a totalidade da superfície do esfregaço com solução de fucsina de Ziehl concentrada.
4. Deixar agir por cerca de cinco minutos, aquecendo brandamente utilizando lamparina ou com a chama do bico de Bunsen, passando lentamente por baixo da lâmina, até que se produza emissão de vapores e, quando estes são visíveis, cessar o aquecimento. Repetir essa operação até completar três emissões sucessivas.
5. Lavar em água corrente para eliminar a fucsina.
6. Cobrir toda a superfície do esfregaço com solução de Álcool-ácido. Tomar a lâmina entre o polegar e o indicador e fazer um movimento de vai-e-vem, de modo que o Álcool-ácido vá descorando suavemente a Fucsina. Considera-se descorado o esfregaço quando suas partes mais grossas conservarem somente um ligeiro tom rosado.
7. Lavar a lâmina da mesma forma como se procedeu depois da coloração com fucsina.
8. Cobrir toda a superfície do esfregaço com solução de Azul de metileno durante 30 segundos a um minuto.
9. Lavar o esfregaço e a parte inferior da lâmina.
10. Colocar a lâmina com o esfregaço para cima, sobre o papel limpo, para secar a temperatura ambiente ou estufa a 35° C.

APÊNDICE I - MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM

1. Fazer um esfregaço do material desejado em uma lâmina limpa.
2. Fixar o material do esfregaço passando três a quatro vezes pela chama do bico de Bunsen.
3. Cobrir o esfregaço com cristal violeta por um minuto.
4. Escorrer o corante. Cobrir com lugol por um minuto.
5. Lavar em água corrente de baixa pressão.
6. Descorar com álcool-cetona por um a cinco segundos.
7. Lavar em água corrente de baixa pressão.
8. Cobrir o esfregaço com fucsina ou safranina por 30 segundos.
9. Lavar em água corrente de baixa pressão.
10. Deixar secar à temperatura ambiente.

APÊNDICE K – DADOS DO GEORREFERENCIAMENTO DOS PACIENTES DE SOBRAL COM A POSITIVIDADE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

Sítio de coleta	Nº casos clínicos	Ident. do paciente	Forma Clínica	Sexo	DNA positivo	RNA^m positivo
S1 - Açude Mucambinho	2	H-52 H-53	MB MB	M M	3	1
S2 - Açude do Cachoeiro	-	-	-	-	1	0
S3 - Lagoa da Fazenda/Banco de Mudás	5	H-33 H-01 H-07 H-09 H-15	MB PB MB PB PB	F F M F M	3	2
S4 - Rio Acaraú a jusante da ponte Othon de Alencar	5	H-15 H-10 H-07 H-24 H-23	PB PB MB MB MB	M M M M M	2	3
S5 - Rio Acaraú no pier da Igreja das Dores	6	H-10 H-24 H-07 H-23 H-37 H-38	PB MB MB MB MB MB	M M M M M F	0	3
S6 - Corrégo Mucambinho	12	H-37 H-38 H-30 H-06 H-08 H-25 H-32 H-46 H-45 H-47 H-09 H-14	MB MB PB MB PB PB MB MB MB MB PB MB	M F F F F F F M M M F F	2	3
S7 - Rio Oiticica	11	H-24 H-60 H-59 H-16 H-18 H-19 H-40	MB MB MB PB PB MB PB	M M M M F M M	0	0

continua

		H-44 H-43 H-49	MB MB PB	F M F		
S8 - Rio Tetê	2	H-03 H-09	MB PB	F F	3	2

APÊNDICE J – MUNICÍPIOS ESTUDADOS E RESULTADOS OBTIDOS

Municípios	Identificação	Amostra/ réplica	Condutividade elétrica (μS/cm)	Temperatura (oC)	pH	USO	Profundidade	DNA	RNA_m
Juazeiro do Norte	J1 - Açude do Sabiá	J1a	862	26,9	8,04	consumo humano/banho	Superfície	Positivo	positivo
		J1b					25 cm	Positivo	negativo
		J1c					50cm	Positivo	negativo
		J1d					75cm	Positivo	positivo
		J1e					Fundo	Negativa	negativo
								4	2
	J2 - Açude do Sítio Amaro Coelho	J2a	370	28,7	9,49	pesca e uso animal	Superfície	Positivo	negativo
		J2b					25 cm	Positivo	negativo
		J2c					50cm	Positivo	positivo
		J2d					75cm	Positivo	positivo
		J2e					Fundo	Positivo	negativo
								5	2
	J3 - Córrego com Barragem	J3a	343	27,4	7,45	consumo humano	Superfície	Negativa	negativo
		J3b					25 cm	Negativa	positivo
		J3c					50cm	Negativa	negativo
		J3d					75cm	Positivo	negativo
		J3e					Fundo	Positivo	positivo
								2	2
	J4 - Açude dos Carneiros	J4a	218	28,9	8,04	consumo humano	Superfície	Positivo	positivo
		J4b					25 cm	Positivo	positivo
		J4c					50cm	Positivo	positivo
		J4d					75cm	Positivo	positivo
		J4e					Fundo	Positivo	positivo
								5	5
	J5 - Riacho Alagoano	J5a	242	25,3	7,28	consumo humano	Superfície	Positivo	positivo
J5b						25 cm	Negativa	negativo	
J5c						50cm	Negativa	positivo	

continua

		J5d					75cm	Negativa	positivo
		J5e					Fundo	Negativa	positivo
								1	4
Crato	C1 - Balneária Serrano Atlético Cratense	C1a	14,12	27,9	6,04	consumo humano/banho	Superfície	Negativa	negativo
		C1b					25 cm	Negativa	positivo
		C1c					50cm	Positivo	negativo
		C1d					75cm	Negativa	negativo
		C1e					Fundo	Positivo	positivo
								2	2
	C2 - Sítio Preguiça	C2a	41,8	24,6	7	consumo humano	Superfície	Positivo	positivo
		C2b					25 cm	Positivo	positivo
		C2c					50cm	Negativa	negativo
		C2d					75cm	Negativa	positivo
		C2e					Fundo	Positivo	negativo
								3	3
	C3 - Açude do Umari	C3a	200	29,2	9,14	consumo humano/banho	Superfície	Negativa	negativo
		C3b					25 cm	Negativa	positivo
		C3c					50cm	Negativa	negativo
		C3d					75cm	Negativa	positivo
		C3e					Fundo	Negativa	positivo
								0	3
	C4 - Açude da Ponta da Serra	C4a	744	31,2	6,78	pesca e uso animal	Superfície	Negativa	negativo
		C4b					25 cm	Negativa	negativo
	C4c					50cm	Negativa	positivo	
	C4d					75cm	Negativa	negativo	
	C4e					Fundo	Negativa	negativo	
							0	1	
Sobral	S1 - Açude Mucambinho	S1a	650	30,4	8,24	consumo humano/banho	Superfície	Positivo	positivo
		S1b					25 cm	Negativo	negativo

continua

	S1c					50cm	positivo	Negativo
	S1d					75cm	positivo	Negativo
	S1e					Fundo	Negativo	Negativo
							3	1
S2 - Açude do Cachoeiro	S2a	333	30	8,4	consumo humano/banho	Superfície	positivo	Negativo
	S2b					25 cm	Negativo	Negativo
	S2c					50cm	Negativo	Negativo
	S2d					75cm	Negativo	Negativo
	S2e					Fundo	Negativo	Negativo
							1	0
S3 - Lagoa da Fazenda/Banco de Mudas	S3a	900	30,5	7,04	irrigação	Superfície	Negativo	Negativo
	S3b					25 cm	Positivo	Negativo
	S3c					50cm	negativo	Positivo
	S3d					75cm	Positivo	Positivo
	S3e					Fundo	Positivo	Positivo
							3	3
S4 - Rio Acaraú a jusante da ponte Othon de Alencar	S4a	240	29	7,4	uso humano para diversos fins	Superfície	positivo	Positivo
	S4b					25 cm	positivo	Negativo
	S4c					50cm	Negativo	Positivo
	S4d					75cm	Negativo	Negativo
	S4e					Fundo	Negativo	Positivo
							2	3
S5 - Rio Acaraú no pier da Igreja das Dores	S5a	230	32	7,6	consumo humano/banho	Superfície	Negativo	Negativo
	S5b					25 cm	Negativo	Positivo
	S5c					50cm	Negativo	Negativo
	S5d					75cm	Negativo	Positivo
	S5e					Fundo	Negativo	Positivo

continua

							0	3	
S6 - Corrêgo Mucambinho	S6a	1160	32,8	6,7	consumo humano	Superfície	positivo	Negativo	
	S6b					25 cm	Negativo	Positivo	
	S6c					50cm	Negativo	Negativo	
	S6d					75cm	Negativo	Positivo	
	S6e					Fundo	positivo	Positivo	
							2	3	
S7 - Rio Oiticica	S7a	1270	36	10,2	não consumo humano	Superfície	Negativo	Negativo	
	S7b					25 cm	Negativo	Negativo	
	S7c					50cm	Negativo	Negativo	
	S7d					75cm	Negativo	Negativo	
	S7e					Fundo	Negativo	Negativo	
							0	0	
S8 - Rio Tetê	S8a	239	31,5	7,7	não consumo humano	Superfície	Negativo	Negativo	
	S8b					25 cm	negativo	Negativo	
	S8c					50cm	positivo	Positivo	
	S8d					75cm	positivo	Positivo	
	S8e					Fundo	positivo	Negativo	
							3	2	
a Viagem	B1 - Açude Camara dos Timoteos	B1a	661	27,6	8,91	consumo humano/banho	Superfície	Positivo	Positivo
		B1b					25 cm	Positivo	Positivo
		B1c					50cm	Positivo	Positivo
		B1d					75cm	Positivo	Positivo
		B1e					Fundo	Positivo	Positivo
								5	5
	B2 - Açude Pigoita	B2a	454	28,5	8,71	consumo humano/banho	Superfície	Positivo	Negativo
		B2b					25 cm	Positivo	Negativo
		B2c					50cm	Negativo	Negativo
		B2d					75cm	Negativo	Negativo
	B2e					Fundo	Negativo	Negativo	

continua

ANEXO A - INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE HANSENÍASE POR MUNICÍPIO NO CEARÁ, 2011

Indicadores epidemiológicos de hanseníase por município no Ceará, 2011*							
CRES	Municípios	CASOS NOVOS		CONTATOS			Situação
		Casos	Deteção	Registrados	Examinados	%	
1	Aquiraz	5	6,9	17	2	12,0	Precário
	Cascavel	10	15,1	48	44	92,0	Bom
	Chorozinho	1	5,3	3	2	67,0	Regular
	Eusébio	5	10,9	19	6	32,0	Precário
	Fortaleza	639	26,1	2355	1061	45,0	Precário
	Horizonte	10	18,1	37	25	68,0	Regular
	Itaitinga	19	53	63	25	40,0	Precário
	Ocara	4	16,7	11	2	18,0	Precário
	Pacajus	6	9,7	17	8	47,0	Precário
Pindoretama	2	10,7	15	15	100,0	Bom	
2	Apuiarés	12	86,2	41	22	54,0	Regular
	Caucaia	59	18,1	216	155	72,0	Regular
	General Sampaio	1	16,1	6	6	100,0	Bom
	Itapagé	6	12,4	23	13	57,0	Regular
	Paracuru	4	12,6	9	5	56,0	Regular
	Paraipaba	1	3,3	4	0	0,0	Silencioso
	Pentecoste	6	16,9	19	12	63,0	Regular
	São Gonçalo do Amarante	18	41	59	44	75,0	Bom
	São Luís do Curu	3	24,3	5	0	0,0	Silencioso
Tejuçuoca	2	11,9	15	13	87,0	Bom	
3	Acarapé	5	32,6	28	1	4,0	Precário
	Barreira	2	10,2	10	10	100,0	Bom
	Guaiúba	4	16,6	8	5	63,0	Regular
	Maracanaú	79	37,8	275	157	57,0	Regular
	Maranguape	21	18,5	64	56	88,0	Bom
	Pacatuba	16	22,1	50	24	48,0	Precário
	Palmácia	2	16,7	5	5	100,0	Bom
Redenção	3	11,4	11	11	100,0	Bom	
4	Aracoiaba	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Aratuba	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Baturité	2	6	7	2	29,0	Precário
	Capistrano	1	5,9	1	0	0,0	Silencioso
	Guaramiranga	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Itapiúna	4	21,5	8	3	38,0	Precário
	Mulungu	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Pacoti	2	17,2	16	0	0,0	Silencioso
5	Boa Viagem	4	7,6	8	7	88,0	Bom
	Canindé	42	56,4	167	68	41,0	Precário
	Caridade	6	30	32	13	41,0	Precário
	Itatira	3	15,9	12	7	58,0	Regular
	Madalena	4	22,1	22	15	68,0	Regular
	Paramoti	2	17,7	10	6	60,0	Regular
6	Amontada	2	5,1	12	12	100,0	Bom
	Itapipoca	22	19	98	66	67,0	Regular
	Miraima	1	7,8	0	0	0,0	Silencioso
	Trairi	7	13,6	31	18	58,0	Regular
	Tururu	3	20,8	7	0	0,0	Silencioso
	Umirim	5	26,6	14	9	64,0	Regular
Uruburetama	15	75,9	62	50	81,0	Bom	
7	Aracati	2	2,9	7	4	57,0	Regular
	Beberibe	3	6,1	20	10	50,0	Regular
	Fortim	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Icapuí	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Itaíba	1	13,7	12	12	100,0	Bom
8	Banabuiú	6	34,7	14	4	29,0	Precário
	Choró	1	7,8	8	0	0,0	Silencioso
	İbaretama	3	23,2	17	7	41,0	Precário
	Milhã	1	7,6	2	2	100,0	Bom
	Pedra Branca	18	43	52	41	79,0	Bom
	Quixadá	18	22,3	48	31	65,0	Regular
	Quixeramobim	26	36,2	89	36	40,0	Precário
	Senador Pompeu	12	45,3	47	29	62,0	Regular
Solonópole	4	22,6	9	2	22,0	Precário	

continua

**ANEXO A - INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE HANSENÍASE POR
MUNICÍPIO NO CEARÁ, 2011**

CRES	Municípios	CASOS NOVOS		CONTATOS			Situação
		Casos	Deteccção	Registrados	Examinados	%	
9	Ibicaitinga	1	8,8	6	5	83,0	Bom
	Jaguetama	2	11,2	10	10	100,0	Bom
	Jaguaruana	2	6,2	8	0	0,0	Silencioso
	Morada Nova	20	32,2	163	131	80,0	Bom
	Palhano	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Russas	13	18,6	60	60	100,0	Bom
10	Alto Santo	1	6,1	12	12	100,0	Bom
	Ereré	1	14,6	4	4	100,0	Bom
	Iracema	1	7,3	0	0	0,0	Silencioso
	Jaguaribara	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Jaguaribe	6	17,4	19	17	89,0	Bom
	Limoeiro do Norte	3	5,3	20	20	100,0	Bom
	Pereiro	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Potiretama	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Quixeré	1	5,2	0	0	0,0	Silencioso
	São João do Jaguaribe	1	12,7	4	4	100,0	Bom
Tabuleiro do Norte	6	20,5	21	15	71,0	Regular	
11	Acântaras	1	9,3	4	0	0,0	Silencioso
	Cariré	14	76,3	50	50	100,0	Bom
	Catunda	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Coreaú	11	50,1	45	10	22,0	Precário
	Forquilha	4	18,4	13	13	100,0	Bom
	Frecheirinha	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Graça	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Groairas	4	39,1	11	0	0,0	Silencioso
	Hidrolândia	2	10,3	10	3	30,0	Precário
	Ipu	3	7,4	6	6	100,0	Bom
	Irauçuba	3	13,4	13	6	46,0	Precário
	Massapé	7	19,9	36	0	0,0	Silencioso
	Meruoca	1	7,3	5	0	0,0	Silencioso
	Moraújo	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Mucambo	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Pacujá	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Pires Ferreira	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Reriutaba	4	20,6	8	0	0,0	Silencioso
	Santa Quitéria	8	18,7	25	16	64,0	Regular
	Santana do Acaraú	4	13,4	12	3	25,0	Precário
Senador Sá	3	43,8	9	1	11,0	Precário	
Sobral	85	45,2	332	278	84,0	Bom	
Uruoca	1	7,8	4	4	100,0	Bom	
Varjota	11	62,5	43	26	60,0	Regular	
12	Acaraú	7	12,2	21	10	48,0	Precário
	Bela Cruz	2	6,5	7	7	100,0	Bom
	Cruz	2	8,9	6	6	100,0	Bom
	Itarema	1	2,7	2	2	100,0	Bom
	Jjoca de Jericoacoara	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Marco	1	4	4	4	100,0	Bom
	Morrinhos	1	4,8	0	0	0,0	Silencioso
13	Camaubal	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Croatá	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Guaraciaba do Norte	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Ibiapina	2	8,4	6	6	100,0	Bom
	São Benedito	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Tianguá	1	1,5	3	3	100,0	Bom
	Ubajara	1	3,1	0	0	0,0	Silencioso
Viçosa do Ceará	3	5,5	12	12	100,0	Bom	
14	Auaba	2	12,3	4	4	100,0	Bom
	Arneiroz	3	39,2	11	9	82,0	Bom
	Parambu	13	41,5	42	37	88,0	Bom
	Tauá	8	14,4	42	27	64,0	Regular

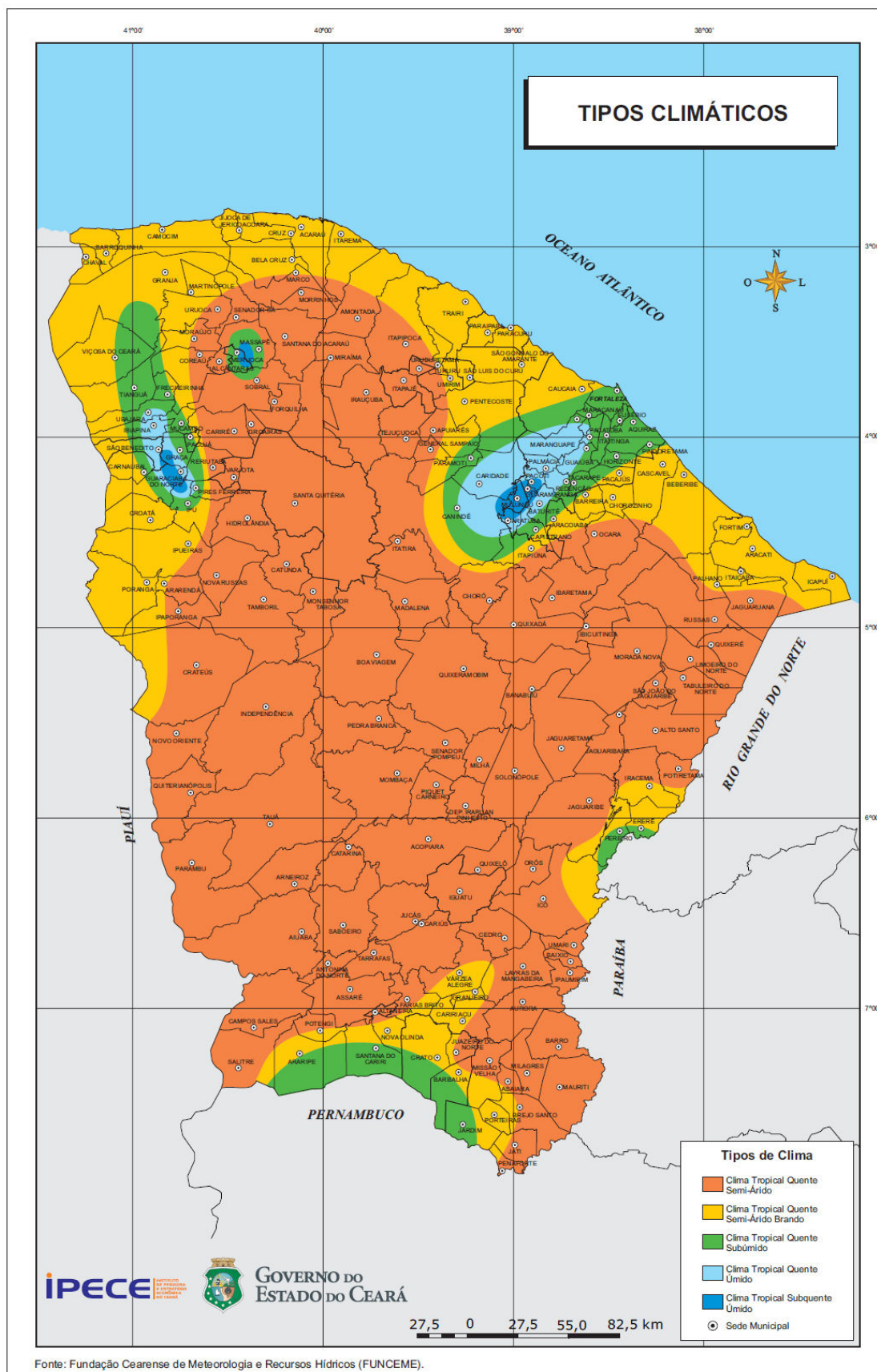
continua

**ANEXO A - INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE HANSENÍASE POR
MUNICÍPIO NO CEARÁ, 2011**

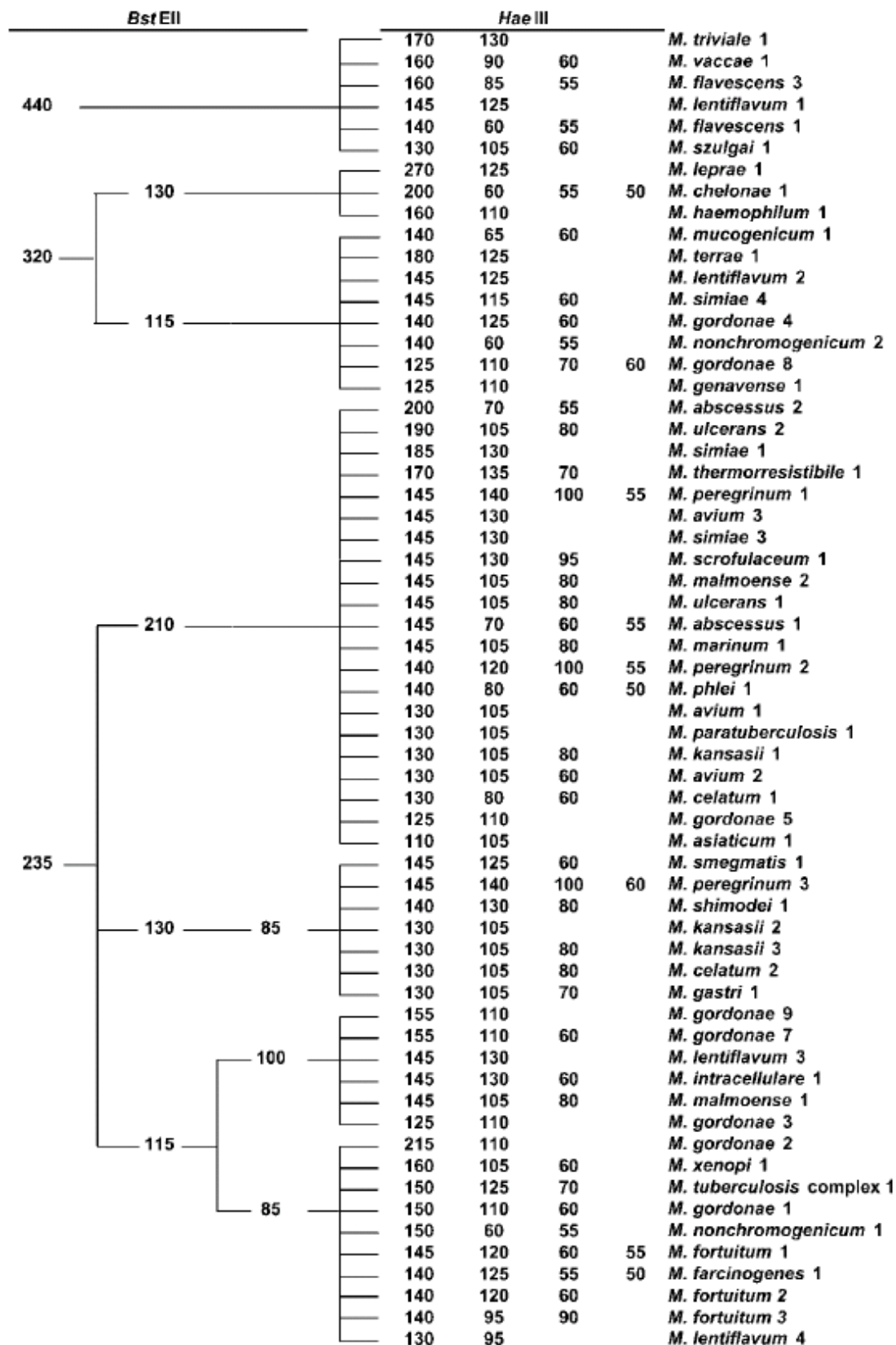
CRES	Municípios	CASOS NOVOS		CONTATOS			Situação
		Casos	Deteção	Registrados	Examinados	%	
15	Ararendá	2	19,1	5	0	0,0	Silencioso
	Crateús	11	15,1	45	31	69,0	Regular
	Independência	7	27,4	27	26	96,0	Bom
	Ipaporanga	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Ipueiras	7	18,5	22	2	9,0	Precário
	Monsenhor Tabosa	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Nova Russas	16	51,7	78	9	12,0	Precário
	Novo Oriente	2	7,3	4	0	0,0	Silencioso
	Poranga	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Quiterianópolis	0	0	0	0	0,0	Silencioso
16	Tamboril	10	39,3	31	31	100,0	Bom
	Barroquinha	3	20,7	20	20	100,0	Bom
	Camocim	12	19,9	53	53	100,0	Bom
	Chaval	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Granja	3	5,7	8	8	100,0	Bom
17	Martinópole	7	68,5	31	25	81,0	Bom
	Baixio	1	16,6	15	15	100,0	Bom
	Cedro	21	85,6	63	61	97,0	Bom
	Icó	25	38,2	123	119	97,0	Bom
	Ipaumirim	9	74,9	23	23	100,0	Bom
	Lavras da Mangabeira	13	41,8	43	39	91,0	Bom
	Orós	8	37,4	26	26	100,0	Bom
18	Umari	1	13,3	3	3	100,0	Bom
	Acopiara	14	27,4	44	42	95,0	Bom
	Cariús	10	53,9	28	28	100,0	Bom
	Catarina	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Deputado Irapuan Pinheiro	1	11	3	3	100,0	Bom
	Iguatu	56	58	235	235	100,0	Bom
	Jucás	18	75,6	66	63	95,0	Bom
	Mombaça	4	9,4	18	18	100,0	Bom
	Piquet Carneiro	3	19,4	3	3	100,0	Bom
	Quixelô	1	6,7	6	6	100,0	Bom
19	Saboeiro	6	38,1	17	17	100,0	Bom
	Abaiera	1	9,5	1	0	0,0	Silencioso
	Aurora	12	48,8	30	30	100,0	Bom
	Barro	15	69,7	52	52	100,0	Bom
	Brejo Santo	17	37,6	64	54	84,0	Bom
	Jati	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Mauriti	15	33,9	35	14	40,0	Precário
	Milagres	4	14,1	8	8	100,0	Bom
	Penaforte	2	24,3	5	5	100,0	Bom
Porteiras	2	13,3	14	14	100,0	Bom	
20	Altaneira	2	29,2	5	4	80,0	Bom
	Antonina do Norte	4	57,3	7	0	0,0	Silencioso
	Araripe	12	58	43	43	100,0	Bom
	Assaré	4	17,8	20	16	80,0	Bom
	Campos Sales	8	30,2	31	21	68,0	Regular
	Crato	39	32,1	126	59	47,0	Precário
	Farias Brito	8	42,1	20	20	100,0	Bom
	Nova Olinda	7	49,1	26	14	54,0	Regular
	Potengi	2	19,5	1	0	0,0	Silencioso
	Salitre	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Santana do Cariri	2	11,6	10	8	80,0	Bom
21	Tarrafas	0	0	0	0	0,0	Silencioso
	Várzea Alegre	12	31,2	34	34	100,0	Bom
	Barbalha	11	19,9	35	28	80,0	Bom
	Caririaçu	3	11,4	8	8	100,0	Bom
	Granjeiro	1	21,6	5	0	0,0	Silencioso
	Jardim	3	11,2	10	10	100,0	Bom
	Juazeiro do Norte	95	38	347	109	31,0	Precário
Missão Velha	15	43,8	43	21	49,0	Precário	
TOTAL	2003	23,7	7398	4482	61,0	Regular	

Fonte: Informe Epidemiológico (Governo do estado do Ceará, 2012).

ANEXO B – MAPA DOS TIPOS DE CLIMAS DO ESTADO DO CEARÁ



**ANEXO C – ALGORITMO DE IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES DE PRA
(AMPLIFICATION-RESTRICTION ANALYSIS)**



Fonte: Leão *et al.* (2004)

ANEXO D – LOCALIZAÇÃO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE E OS SÍTIOS DE COLETAS DO MUNICÍPIO DE SOBRAL

