

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EM ÁGUA E SOLO, MATO GROSSO, BRASIL**

**ÉLDERSON MARIANO DE SOUZA VALOIS**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais para obtenção do título de Mestre.

**CÁCERES  
MATO GROSSO, BRASIL  
2014**

**ÉLDERSON MARIANO DE SOUZA VALOIS**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EM  
ÁGUA E SOLO, MATO GROSSO, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Ignotti**

**CÁCERES  
MATO GROSSO, BRASIL  
2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Valois, Élderson Mariano de Souza.

Investigação molecular de *Mycobacterium leprae* em água e solo – MT./Élderson Mariano de Souza Valois – Cáceres/MT: UNEMAT, 2014.  
64 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Mato Grosso. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 2014.

Orientadora: Eliane Ignotti

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. PCR – primers específicos (R1 e R2). 4. Saneamento – ambiente domiciliar – Cáceres e Várzea Grande-MT. I. Título.

CDU: 616-002.73(817.2)

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Regional de Cáceres

**ÉLDERSON MARIANO DE SOUZA VALOIS**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EM  
ÁGUA E SOLO, MATO GROSSO, BRASIL**

Essa dissertação foi julgada e aprovada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Cáceres, 13 de junho de 2014.

**Banca examinadora**

Prof. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista  
Instituto Lauro de Souza Lima-ILSL

Prof. Dr. Rogério Alexandre Nunes Dos Santos  
Universidade do Estado de Mato Grosso-UNEMAT

Prof. Dra. Luciana Melhorança Moreira  
Universidade do Estado de Mato Grosso-UNEMAT

Prof. Dra. Eliane Ignotti  
Universidade do Estado de Mato Grosso-UNEMAT  
(Orientadora)

**CÁCERES  
MATO GROSSO, BRASIL  
2014**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitário, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A minha super orientadora Eliane Ignotti a quem eu tenho uma grande admiração, pela atenção mesmo nos momentos difíceis, pelas suas correções e incentivos. Agradeço-a por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. Confesso que em momento algum me senti desamparado de orientação, sempre motivado a superar os obstáculos.

Sou grato ao professor Dr. Cor por todo suporte técnico e laboratorial desenvolvidos para a realização dessa pesquisa. Por tanto que se dedicou a mim, não somente por ter me ensinado, mas por ter me feito aprender.

A minha querida professora e amiga Luciana Melhorança sempre disposta, que em vários momentos teve paciência para explicar um pouco desse “universo” que é a biologia molecular.

Quero agradecer a Denise pela atenção e disposição em me ajudar, foram muito boas as aulas de biologia moleculares na UFMT das quais participamos, e sem você eu talvez não tivesse assistido a todas, pois ia sempre de carona com você.

Agradeço a minha tia Deuza (mãe), heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Foi minha confidente e conselheira nos momentos de dúvidas.

Aos meus amigos de longa data Paula, Kiwi, Robson, Magalei, Bruno, Nilo e Welvis por participarem desse momento, por todo apoio que tenho recebido e por todo aprendizado que têm me proporcionado.

Agradeço a minha amiga Carla Christina, pessoa que tenho grande apreço, sempre me deu apoio moral, estando na primeira fila da torcida, valeu pelo carinho.

A minha amiga Kele por compartilhar de todos os momentos desde a elaboração do projeto desse trabalho.

Ao meu pai que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim foi muito importante.

Obrigado aos meus amigos-irmãos Rafael, Marcele, Eliane Lauxen, Eliezer, Gelson, Lú, e Conchita (mamusca) que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

Sou grato ao meu amigo César pela contribuição valiosa que foi minha estadia em sua casa, e também pelo parceríssimo nas coletas, dispondo do seu tempo de folga para me ajudar. Até aprendi a gostar de suco de uva nessa época.

A meu amigo Cristiano pela estadia enquanto fazia as análises laboratoriais, esse momento foi definitivo no meu trabalho e agradeço pela paciência.

Meus agradecimentos aos amigos Eduardo, Cleberson, Thamires, Marcia Cattini, Terezinha e Mario, companheiros do laboratório da Malária e irmãos na amizade, vocês fizeram parte da minha formação e vão continuar presentes em minha vida com certeza.

A Universidade Estadual de Mato Grosso, pela oportunidade para fazer o curso de pós graduação em Ciências Ambientais e proporcionar o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos funcionários do Hospital Bom Samaritano em Cáceres e Centro de Doenças Tropicais em Várzea Grande que me deram toda atenção e apoio para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Sem o apoio de vocês eu não chegaria onde estou”.

ÍNDICE	
LISTA DE TABELAS .....	3
LISTA DE FIGURAS.....	3
RESUMO.....	3
ABSTRACT .....	4
INTRODUÇÃO .....	5
REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
A Doença .....	9
Aspectos Epidemiológicos .....	9
Incapacidades Físicas por Hanseníase .....	11
Transmissão .....	12
O Uso de Técnicas Moleculares .....	13
O <i>M. leprae</i> no ambiente .....	14
Perfil Socioambiental dos Pacientes e Vizinhos .....	18
MATERIAL E MÉTODOS .....	19
Desenho do Estudo .....	19
Local e População do Estudo .....	19
Dados ambientais .....	20
Fonte de dados .....	20
SINAN.....	20
Questionário Semiestruturado .....	21
Água .....	21
Coleta de Água em Poços .....	22
Coleta de Água em Torneiras .....	22
Coleta de Solo .....	22
Extração de DNA da Água.....	24

Extração de DNA do Solo .....	25
RESULTADOS .....	28
Caracterização Sociodemográficas de Casos de Hanseníase e Vizinhos....	28
Análises Moleculares de Água.....	35
Análises Moleculares de Solo .....	39
DISCUSSÃO .....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
ANEXOS .....	55
FICHA DO SINAN / HANSENÍASE .....	56
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....	57
APENDICE .....	60
QUESTIONÁRIO I (Pacientes).....	61
QUESTIONÁRIO II (Vizinhos).....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

CDG - Coeficiente De Detecção Geral

CDT - Centro de Doenças Tropicais

CT - Coliformes Totais

DAE – Departamento de Água e Esgoto

DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

*M. leprae* - *Mycobacterium leprae*

MB – Multibacilares

ML Flow - Teste De Fluxo Lateral para *M. leprae*

PB - Paucibacilares

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)

PQT- Poliquimioterapia

RPM – Rotações por Minuto

RT- PCR (PCR em tempo real)

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISAGUA - Sistema de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano

SSA - Sistemas de Abastecimento de Água

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

WHO – World Health Organization

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Dados relativos ao início do tratamento dos casos novos de hanseníase e, período de coleta nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013. ....23
- Tabela 02.** Informações sociodemográficas de pacientes e vizinhos nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013. ....24
- Tabela 03.** Tipos de contatos com animais, como possíveis fontes de contaminação por *M. leprae*, entre pacientes e vizinhos nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013. ....25
- Tabela 04.** Atividades sociais e lazer desenvolvidas pelos casos novos de hanseníase e seus vizinhos em Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013.....26
- Tabela 05.** Condições de moradia, fonte de água para consumo e acúmulo de lixo doméstico de pacientes e seus vizinhos nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013. ....28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Localização dos municípios de Cáceres e Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.....	19
<b>Figura 02.</b> PCR da extração de DNA de <i>M. leprae</i> a partir de biopsia de paciente virchowiniano. ....	29
<b>Figura 03.</b> Padronização da extração de DNA de <i>M. leprae</i> . ....	29
<b>Figura 04.</b> Produto da amplificação do DNA de <i>M. leprae</i> extraído a partir de amostras de água dos casos novo. ....	33
<b>Figura 05.</b> Produto da amplificação do DNA de <i>M. leprae</i> extraído a partir de amostras de água dos vizinhos. ....	34
<b>Figura 06.</b> Reaplicação de extração de DNA de <i>M. leprae</i> a partir de amostras de água que apresentaram bandas inespecíficas. ....	35
<b>Figura 07.</b> Padronização da extração de DNA do <i>M. leprae</i> em solo.....	39
<b>Figura 08-A.</b> Eletroforese da extração de DNA de solo dos casos novos de hanseníase.....	40
<b>Figura 08-B.</b> Eletroforese da extração de DNA de solo dos casos novos de hanseníase.....	40
<b>Figura 09-A.</b> Eletroforese da extração de DNA de solo dos vizinhos dos casos novos de hanseníase.....	41
<b>Figura 09-B.</b> Eletroforese da extração de DNA de solo dos vizinhos dos casos novos de hanseníase.....	41

## RESUMO

VALOIS, Élderson Mariano de Souza. **Investigação Molecular de *Mycobacterium leprae* em Água e Solo, Mato Grosso, Brasil**. Cáceres: UNEMAT, 2014. 66 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais)<sup>1</sup>.

As características socioambientais da hanseníase estão intimamente associadas a aglomerados, falta de saneamento, e outras condições desfavoráveis relacionadas à pobreza. Os fatores ambientais podem desempenhar um papel importante na ocorrência de casos novos de hanseníase. O solo e a água à temperatura ambiente em regiões endêmicas tem sido descritos como potenciais fontes de transmissão da doença. Nos últimos anos as pesquisas do *Mycobacterium leprae* no ambiente têm sido apoiadas por ferramentas da biologia molecular. Este estudo teve por objetivo analisar a presença do *M. leprae* em amostras de água e solo das residências de casos novos de hanseníase e vizinhos nos municípios de Cáceres e Várzea Grande, Estado de Mato Grosso. Foram coletadas amostras de água (torneiras e poços) e solo de residências de 36 casos novos de hanseníase e 31 vizinhos para análise, totalizando 67 amostras. Concomitante às coletas, foi aplicado questionário estruturado sobre dados socioambientais. Para a identificação do *M. leprae* na água e solo coletados, foi utilizada a técnica de PCR com *primers* específicos (R1 e R2). Para o controle positivo do *M. leprae* utilizou-se material de biópsia de paciente com hanseníase e como controle negativo utilizou-se água estéril. Foram então realizadas eletroforese e submissão ao revelador UV para visualização da amplificação do DNA. As características verificadas por meio do questionário sobre os grupos estudados foram similares, destacando-se alguns resultados socioambientais, para pacientes e vizinhos, respectivamente: adultos 86,8% e 77,3%; gênero masculino 63,9% e 51,6%; níveis de escolaridade fundamental incompleto 58,3% e 74,2%; raça/cor parda 61,1% e 77,4%; meio de subsistência através de serviços braçais 19,6% e 19,3%; que consomem carne de caça 41,7% e 25,8%. Após a aplicação da PCR não foram verificadas amplificação do DNA de *M. leprae* nas amostras de água da rede e de solo coletados nas residências. No entanto, duas amostras de água de poços artesanais apresentaram bandas específicas. Tais achados sugerem maior atenção no uso dessas fontes frente ao tratamento da água de abastecimento, ainda que não tenha sido realizado sequenciamento genético. Conclui-se que a água de poço artesanal com a presença de bandas específicas para o *M. leprae* pode representar uma potencial fonte de transmissão do bacilo.

**Palavras-chave:** Ambiente Domiciliar, Hanseníase, Endemias, Biologia Molecular, Meio Ambiente.

---

<sup>1</sup> Comitê orientador: Orientadora - Eliane Ignotti, UNEMAT.

## ABSTRACT

VALOIS, Élderson Mariano de Souza. **Molecular Investigation of *Mycobacterium leprae* in Water and Soil, Mato Grosso, Brazil.** Cáceres: UNEMAT, 2014. 66 p. (Dissertation – Master in Environment Science)<sup>2</sup>

The environmental characteristics of leprosy are closely associated with clusters, lack of sanitation, and other unfavorable conditions related to poverty. Environmental factors may play an important role in the occurrence of new cases of leprosy. In recent years, molecular biology tools have supported studies researches on *Mycobacterium leprae* in the environment. The room-temperature water in endemic regions has been described as a potential source of disease transmission. This study aimed to analyze the presence of *Mycobacterium leprae* in samples of water and soil from the residences of new leprosy cases and their neighboring in the municipalities of Cáceres and Várzea Grande, State of Mato Grosso. Water (taps and wells) and soil samples from 36 residences where there were new leprosy cases and 31 neighbors for analysis, totaling 67 samples. Concomitant with the sampling, it was applied a structured questionnaire of socio-environmental data. To identify of *M. leprae* in water and soil it was used the PCR technique with specific primers (R1 and R2). For the positive control of *Mycobacterium leprae* was used biopsy material of a patient with leprosy and as the negative control was used sterile water. Electrophoresis and submission to revealing UV were performed for visualization of DNA amplification. The characteristics determined through the questionnaire about the groups studied were similar, highlighting some socio-environmental results, from patients and neighbors, respectively: adults 86.8% and 77.3%; males 63.9% and 51.6%; levels of incomplete primary education 58.3% and 74.2%; race/color mulatto 61.1% and 77.4%; livelihood through labor services 19.6% and 19.3%; consuming bushmeat 41.7% and 25.8%. After application of PCR, *Mycobacterium leprae* DNA amplification was not observed in samples of tap water and soil collected in the residences. However, two samples of wells showed specific bands. These findings suggest that greater attention to the use of these sources to the treatment of the water supply. We conclude that water well with the presence of specific bands for M leprae may represent a potential source of transmission of the bacillus.

**Key Works:** Household Environment, Leprosy, Endemic Disease, Molecular Biology, Environment.

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Major Professor: Eliane Ignotti, UNEMAT.

## INTRODUÇÃO

A hanseníase é definida como uma doença infecciosa crônica, cujo principal agente etiológico é o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Trata-se de um bacilo álcool-ácido resistente e parasita intracelular com predileção pelas células de *Schwann*, macrófagos e tecido epitelial. A doença apresenta um espectro de sintomas que se manifesta como formas clínicas distintas, de acordo com o tipo de resposta imunitária que o hospedeiro apresenta frente ao microrganismo (WHO, 2010).

O diagnóstico clínico da hanseníase é baseado num dos três sinais definidos por: lesão (ões) e/ou área (s) da pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervos (s) periféricos (s), com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; baciloscopia positiva de esfregaço intradérmico (BRASIL, 2010).

Segundo WHO (2012), os principais países endêmicos são Índia, Brasil e Indonésia, que juntamente com outros 15 países são responsáveis por 94% dos casos de hanseníase no mundo. Apesar de ter registrado decréscimos contínuos de detecção de casos novos nesses países, é notável as diferenças existentes entre os países e suas regiões.

Ainda que o Brasil siga a tendência mundial de redução dos coeficientes de prevalência e detecção de casos novos, em 2012 ainda apresentou número elevado de casos detectados chegando a 33.303 casos novos, o que corresponde a um coeficiente de detecção geral (CDG) de 17,2 por 100 mil habitantes (BRASIL, 2013).

O número de casos novos de hanseníase em menores de 15 anos foi de 2.246 em 2012, sendo 7% dos casos novos diagnosticados. As crianças de até 15 anos compõem uma faixa etária que indica a qualidade do monitoramento da hanseníase, pois se pressupõem que crianças doentes adquirem a hanseníase a partir de contatos intradomiciliares e vizinhos (BRASIL, 2013).

A intensificação e fortalecimento da vigilância em hanseníase no Brasil é uma extensão das estratégias anteriores definida pela World Health Organization (WHO). No entanto, as medidas ora em vigor foram definidas no

Plano Global para redução da Hanseníase 2011-2015 (WHO, 2010) e reafirmados no Plano Integrado de Ações Estratégicas de Eliminação da Hanseníase como Problema de Saúde Pública (BRASIL, 2012).

As regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste no Brasil mantêm as taxas mais altas de incidência de casos e a maior prevalência da doença, o que evidencia uma evolução regional desigual da endemia no país (IGNOTTI e PAULA, 2011; BRASIL, 2012).

Houve a intensificação das ações para redução da hanseníase, razão pela qual o Estado de Mato Grosso teve 27 dos 141 municípios priorizados pelo Plano Integrado de Ações Estratégicas de Eliminação da Hanseníase (BRASIL, 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde em 2012, o estado de Mato Grosso apresentou o coeficiente de detecção geral de 80,34 sendo o mais elevado entre as Unidades da Federação (BRASIL, 2013).

No município de Cáceres em 2011 foram diagnosticados 33 casos novos, apresentando um coeficiente de detecção geral de 37,3 por 100 mil habitantes, o que de acordo com os parâmetros nacionais indica prevalência média. O município de Várzea Grande teve 180 casos novos no mesmo ano, e coeficiente de detecção geral de 70,4 por 100 mil habitantes, sendo classificado com taxa de prevalência alta pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

Os municípios encontram-se atualmente no grupo daqueles prioritários para vigilância em hanseníase de acordo com a Portaria nº 2556/11/MS, onde estão inclusos 253 municípios e as 27 capitais (BRASIL, 2012).

A partir da década de 1960 o uso de rifampicina, clofazimina e dapsona foram fundamentais na redução do número de doentes de hanseníase no mundo (WHO, 2004). No entanto, essa medida só foi adotada no Brasil em 1986, sendo oficializada pelo Ministério da Saúde em 1991 como protocolo nacional a ser instituído em todos os serviços de saúde que atendem casos de hanseníase. Desde então a prevalência caiu de 4,7 casos em tratamento por 10 mil habitantes em 2000 para 1,5 em 2011 (BRASIL, 2012).

A principal fonte de infecção pelo bacilo são os doentes sem tratamento (BRASIL, 2012). Por esta razão o diagnóstico oportuno seguido de tratamento são medidas fundamentais na vigilância em hanseníase. Por outro

lado, embora o *Mycobacterium leprae* não possa ser cultivado em meios artificiais (DAVIS *et al.*, 2013), a literatura mostra características ambientais como potencial dispersor ou mantenedor dessa bactéria, sendo importante a realização de estudos mais aprofundados.

No lago Aleixo próximo a um antigo hospital colônia em Manaus-AM foram encontradas globias de micobactérias na água, sugeriu-se então a existência de fontes externas de *M. leprae* (SALEM e FONSECA, 1982). Mais recentemente, os achados de estudo em área endêmica no Estado do Ceará, nordeste brasileiro, supõem que a infecção se dê a partir de contato com fontes de água contaminados (KERR-PONTES *et al.*, 2006).

Os estudos feitos na Indonésia mostraram que a água utilizada por grupos clínicos de hanseníase apresentava presença do bacilo. Os grupos livres da doença ao fazer uso de água contaminada mostraram-se mais susceptíveis a hanseníase, o que leva alguns autores a sugerir provável associação da presença do *M. leprae* na água e transmissão da doença (ADRIATY *et al.*, 2010; WAHYUNI *et al.*, 2010). Sendo assim, casos de hanseníase em indivíduos sem histórico de exposição a outros casos conhecidos poderiam ser explicados pela contaminação pelo *M. leprae* por meio da água (TURANKAR *et al.*, 2011).

As condições climáticas poderiam contribuir para a viabilidade do *M. leprae* no ambiente. Pesquisas mostraram que o bacilo pode permanecer viável em temperaturas abaixo de 37°C (LAHIRI *et al.*, 2005).

A temperatura ambiente associada ao solo úmido possibilita a viabilidade do patógeno por mais de 45 dias (DESIKAN, 1995). Este achado foi evidenciado por Lavania *et al.* (2006) nos estudos genéticos em Ghatampur, área endêmica de hanseníase na Índia, em que mais de 33,3% das amostras de solo amplificaram DNA de *M. leprae* na PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).

No Estado de Mato Grosso, região Centro-Oeste do Brasil, a temperatura média varia de 24°C e 26°C, ocorrendo um aumento térmico médio anual de 27°C, explicado pelo decréscimo altimétrico em direção ao Pantanal. No período do verão as temperaturas permanecem elevadas com muita chuva. Setembro é, em geral, o mês mais quente, apresenta temperatura média entre 26°C e 28°C ao Norte, e 24°C e 26°C ao Sul. Chegando o inverno, junho e julho

caracterizam-se pelos meses com temperaturas mais baixas (FIGUEROA e NOBRE, 1990).

A temperatura média em Cáceres é de 24° e 26°C, com duas estações bem definidas. As temperaturas mais elevadas ocorrem no período úmido e as mais baixas no período seco, em que as médias anuais de temperatura atingem cerca de 32°C (NEVES *et al.*, 2011). O município de Várzea Grande, assim como Cáceres, tem o clima tropical quente úmido com amplitude térmica entre 12°C à 32°C (IBGE, 2010).

Os municípios de Cáceres e Várzea Grande em Mato Grosso contam com abastecimento de água feito pela rede geral de tratamento, poços ou nascentes (BRASIL, 2010). Entretanto, os bairros mais periféricos em Cáceres têm deficiências no abastecimento pela rede geral, sendo comum o uso de poços para a manutenção doméstica (BARELLI, 2012). Quanto a Várzea Grande, de acordo com o DAE- Departamento de Água do município, 88% do município recebe água tratada e 13% possui coleta de esgoto seletivo (DAE-VG, 2013). A má distribuição da água tratada distribuída pela rede caracteriza os dois municípios em estudo, particularmente nas áreas mais periféricas, com população de baixa renda.

Os estudos que abordam a presença do *M. leprae* no ambiente doméstico são recentes e pouco aprofundados como a água de uso doméstico e o solo das residências dos pacientes. Sabendo-se da potencial associação da transmissão da hanseníase por meio de fontes ambientais, a investigação do DNA do *M leprae* torna-se pertinente.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### A Doença

O principal agente etiológico da hanseníase é o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Este bacilo traz sérios danos aos indivíduos acometidos pela hanseníase, em decorrência das limitações de atividades físicas com potenciais incapacitantes, razão pela qual, mostra-se de grande importância para saúde pública (WHO, 2010, BRASIL, 2012).

Os casos com suspeita diagnóstica de hanseníase são avaliados por meio de exame clínico e investigação epidemiológica, sendo levado em consideração o histórico familiar da doença e as condições de vida do paciente. O exame consiste em identificar lesões ou áreas de pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento dos nervos periféricos. A presença de lesões desempenha um papel importante no diagnóstico da hanseníase, muitas vezes apoiado por baciloscopia e teste histopatológico (BRASIL, 2011).

A WHO (2010) classifica operacionalmente os casos diagnosticados em paucibacilares (PB) ou em multibacilares (MB). Os casos de hanseníase paucibacilares são representados por manifestação brandas caracterizadas por poucas lesões hipopigmentadas (até cinco), e lesões cutâneas anestésicas (pálidas ou avermelhadas).

Os casos multibacilares são associados às lesões cutâneas múltiplas (mais de cinco), nódulos, espessamento da pele e, em alguns casos, o envolvimento da mucosa nasal. Na maioria dos casos da doença, tanto paucibacilares quanto multibacilares, o diagnóstico é simples, mas em uma pequena proporção dos casos, os suspeitos sem manchas anestésicas requerem exames mais específicos incluindo teste laboratorial positivo (WHO, 2012).

### Aspectos Epidemiológicos

Em alguns países em desenvolvimento a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública em razão de não terem alcançado

menos de 1 caso para cada 10 mil habitantes em nível nacional. Encontram-se nesse grupo: Angola, Bangladesh, Brasil, China, Costa do Marfim, República Democrática do Congo, Etiópia, Índia, Indonésia, Madagascar, Moçambique, Myanmar, Nepal, Nigéria, Filipinas, Sri Lanka, Sudão e Tanzânia (WHO, 2010).

O Brasil junto a outros países membros da OMS em 1991, aprovou a proposta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública no mundo até o ano 2000. Porém, a agenda prevista para a eliminação da hanseníase não alcançou o objetivo. Atualmente o Plano Integrado de Ações Estratégicas de Eliminação da Hanseníase é uma meta do governo brasileiro para que haja menos de um caso da doença para cada 10 mil habitantes até 2015 (BRASIL, 2012). De acordo com o Ministério da Saúde foram priorizados 253 municípios no plano de ação para redução da hanseníase. Estes municípios são estimulados a trabalhar mais intensamente com a busca ativa para aumento do diagnóstico oportuno de novos casos (MS, 2012).

O desaparecimento de casos de hanseníase na Noruega entre 1856 e 1920 possibilitou a análise de modelos epidemiológicos que tentam explicar a tendência de detecção de casos novos, assim como a mudança nas faixas etárias de pacientes afetados. Ainda que exista tratamento poliquimioterápico (PQT) para tratar os doentes e reduzir as fontes de infecção, o tratamento tornou-se disponível muito tempo após a hanseníase ter sido erradicada da Noruega. A detecção precoce de casos seguida por PQT constitui atualmente o principal meio de controle da hanseníase (MEIMA *et al.*, 2002).

A estratégia global de eliminação da hanseníase enfatiza melhorar a vigilância e ampliar a cobertura de atendimento com a quimioterapia, porém a detecção dos novos casos é limitada pela dificuldade de os serviços de saúde realizar o diagnóstico oportuno desses pacientes (WHO, 2012). Essas medidas foram aprovadas pelos países membros da OMS em outubro de 2010, definidas como estratégia global de enfrentamento da hanseníase para o período 2011-2015, e ainda estão vigentes para países que não alcançaram a meta em nível nacional, como o Brasil (WHO, 2010).

O Brasil em 2010 contava com 93% dos casos novos de hanseníase do Continente Americano (WHO, 2010). Apesar da importante redução do

coeficiente de prevalência de hanseníase entre 2000 e 2010, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste ainda apresentam os coeficientes de detecção da doença mais elevados (BRASIL, 2013).

Mato Grosso é considerado entre as Unidades da Federação aquela que apresentou maior incidência da doença, representada pelo coeficiente de detecção de 80,34 casos novos por 100 mil habitantes, no qual atualmente tem um coeficiente de prevalência alto (entre 5 e 9,9 casos em tratamento por 10 mil habitantes) (BRASIL, 2013).

### **Incapacidades Físicas por Hanseníase**

O Ministério da Saúde (2008) publicou uma atualização da ficha de avaliação neurológica no Manual de Prevenção de Incapacidades. A avaliação neurológica de incapacidade dos olhos, mãos e pés é expressa em números entre 0 a 2, sendo: 0 – ausência de comprometimento neural; 1 – redução ou perda de sensibilidade; 2 – presença de incapacidades e deformidades. Por meio do incentivo à detecção precoce de casos novos e de assistência com qualidade ao paciente, busca-se reduzir o número de casos com grau 2 de incapacidades, redução do estigma e discriminação relacionados à hanseníase (WHO, 2010).

A hanseníase, quando não diagnosticada oportunamente ou tratada inadequadamente pode evoluir para incapacidades e deformidades físicas, limitando o paciente em sua capacidade para o trabalho (GONÇALVES *et al.*, 2009; WHO, 2010). O diagnóstico precoce e o tratamento dos casos novos são o meio mais eficaz para prevenir incapacidades. O monitoramento neural frequente, incluindo reações e neurites, pode prevenir ou minimizar o desenvolvimento de incapacidades posteriores (RODINI *et al.*, 2010).

O uso da poliquimioterapia vem reduzindo o número de incapacitados pela hanseníase, porém as ações de prevenção das incapacidades dependem da qualificação dos profissionais de saúde para determinar o diagnóstico e orientar o tratamento (VIETH e VIRMOND, 1997; OPROMOLLA e LAURENTI, 2011).

A partir dos dados recebidos dos países membros da OMS em 2010, pode-se observar uma tendência decrescente de casos novos com grau 2 de

incapacidade, visto que no Brasil era de 15,2/100 mil habitantes em 2000 e atualmente está em 11,3 por 100 mil (BRASIL, 2012)

A proporção de casos avaliados quanto ao grau 2 de incapacidade no momento do diagnóstico tem sido considerada regular no Brasil, chegando a 89,4% dos casos, ainda que a avaliação do grau de incapacidade na cura tenha sido de 72,9% (BRASIL, 2012). A estratégia global proposta pela OMS (WHO, 2010) propõe como indicador complementar ao monitoramento da tendência de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública o coeficiente de detecção de casos com grau 2 de incapacidade. Este coeficiente deve ser analisado em conjunto com o coeficiente geral de detecção em séries históricas, no entanto a construção do mesmo é recente e de difícil utilização para comparações entre outros países, porque ainda não há publicações sobre o assunto.

## **Transmissão**

A forma de transmissão mais frequente da hanseníase ocorre através do trato respiratório, por inalação, por meio de ingestão, e por contato com a pele de indivíduos multibacilares sem tratamento. Os pacientes multibacilares podem lançar um grande número de bacilos em seu ambiente através de secreções corporais, quando tosse, espirram ou conversam (REES e MCDUGALL, 1977). Os contatos intradomiciliares constituem o principal grupo de risco (LOCKWOOD e SUNEETHA, 2005).

Apesar dos contatos de casos paucibacilares serem menos bacilíferos, é possível com as técnicas de PCR-específico provar que eles também apresentam o bacilo, porém essa técnica não determina que o indivíduo/contato infectado adoecerá, mas indica que as chances de adoecer são maiores se comparados a aqueles que não apresentam o bacilo (PONTES *et al.*, 2008).

As medidas de controle da hanseníase tornam-se cada vez mais propensas ao uso da quimioprofilaxia, especialmente para os grupos de alto risco que vivem em regiões endêmicas. Apesar disso, os resultados desse tratamento até o momento não têm tido o efeito esperado (FEENSTRA *et al.*, 2011)

Os reservatórios ambientais poderiam explicar aspectos ainda pouco conhecidos sobre a doença, como a distribuição geográfica irregular, flutuação de risco para contatos familiares e ausência de casos secundários entre imigrantes em países livres da doença (MARTELLI *et al.*, 2002; KERR-PONTES *et al.*, 2006; TRUMAN e FINE, 2010). O fato de haver registros de novos casos com ausência de fontes conhecidas sugere que, a transmissão possa ter ocorrido de forma indireta, dado que, em regiões hiperendêmicas já tenha sido constatada a viabilidade de *M. leprae* fora do corpo humano, sob condições climáticas favoráveis e por períodos variados.

### **O Uso de Técnicas Moleculares**

O *M. leprae* mostra-se incapaz de replicar-se em meio artificial devido a uma deficiência molecular no transporte de ferro (Fe), que é responsável pela divisão celular (HALL *et al.*, 1983; KATO, 1994). Os autores Levy e Ji (2006) destacam que o cultivo do organismo *in vitro* pode não ser possível, devido a menos da metade do genoma conter genes funcionais, enquanto os pseudogenes são abundantes, e apesar de várias tentativas, *M. leprae* nunca pode ser cultivado em meio artificial.

Para a detecção de *M. leprae* no ambiente são necessários métodos moleculares que avaliem a viabilidade das micobactérias. As técnicas de amplificação do DNA são utilizadas para identificar *M. leprae* por meio de PCR específico, esse método tem sido empregado na detecção de *M. leprae* em áreas endêmicas a partir das amostras de solo (LAVANIA *et al.*, 2008; TURANKAR *et al.*, 2011) e água (ADRIATY *et al.*, 2010; WAHYUNI *et al.* 2010).

O PCR possui sensibilidade na identificação de DNA de *M. leprae* em uma quantidade pequena de amostra, o que facilita inclusive o uso em investigações paleontológicas (DONOGHUE *et al.*, 2001). Porém, o método de identificação de DNA possui uma limitação importante em sua utilização, em razão da impossibilidade de distinção entre organismos viáveis e não viáveis (MARTINEZ *et al.*, 2009).

Para que seja possível distinguir bacilos viáveis dos inviáveis, outras técnicas têm sido aplicadas, entre elas o RT-PCR (PCR em tempo real) (LAVANIA *et al.*, 2008), que pode ser aplicada na quantificação da presença desses bacilos em amostras de solo, água.

A técnica consiste na recuperação de sequências de rRNA a partir de um molde utilizando RT-PCR e baseia-se na premissa de que os organismos estavam vivos no momento da coleta de amostra, e que tais bacilos poderiam ter um papel na transmissão contínua da doença (LAVANIA *et al.*, 2008). Os resultados demonstram que o RT-PCR pode ser usado com sucesso para detecção de *M. leprae* viável no ambiente (KURABACHEW *et al.*, 2003), e pode ser usado como ferramenta para o estudo da dinâmica de transmissão da doença (LAVANIA *et al.*, 2006).

### **O *M. leprae* no ambiente**

Durante os últimos 50 anos, a técnica de cultivo na pata de camundongo tem sido extensivamente estudada, contribuindo para o desenvolvimento de drogas mais eficientes contra o *M. leprae* mesmo havendo limitações biológicas presentes (KATOCH, 2009).

Evidências científicas descritas na literatura reforçam os estudos do *M. leprae* no meio ambiente, visto que, o bacilo foi encontrado em diferentes substratos abióticos e bióticos. Foram encontrados *M. leprae* na água (WAHYUNI *et al.*, 2010) próximo a grupos clínicos com hanseníase e no solo (LAVANIA *et al.*, 2008). O *M. leprae* também foi encontrado em musgo (KAZDA *et al.*, 1980), e em algumas espécies de animais que vão desde protozoários (LAHIRI e KRAHENBUHL, 2008), aos mais complexos organismos como alguns mamíferos (DEPS *et al.*, 2008; TRUMAN e FINE, 2010).

A possibilidade de o *M. leprae* ser encontrado em água sugere que o bacilo associe-se a protozoários ou hospedeiros invertebrados, assim como, tem algumas micobactérias de vida livre (CIRILLO *et al.*, 1997; WHAN *et al.*, 2006).

Devido à busca por modelos animais para infecção, os investigadores têm procurado cultivar *M. leprae* em laboratório. Para tanto examinaram uma longa

lista de modelos experimentais e encontraram hospedeiros muito limitados (SCOLLARD *et al.*, 2006). Algumas espécies de macacos podem desenvolver a hanseníase em cativeiro, mostrando serem suscetíveis à infecção experimental. No entanto, a infecção entre primatas selvagens não foi relatada (GORMUS *et al.*, 1987). Além de infecções nos primatas, os únicos modelos animais de infecção conhecidos para replicar o bacilo *in vivo* são camundongos (LEVY e JI, 2006; KATOCH, 2009) e tatus (DEPS *et al.*, 2008).

A reprodução do *M. leprae* no coxim plantar da pata de camundongo teve grande importância na história da pesquisa em hanseníase a partir da década de 1960. Mas nunca houve qualquer evidência de bacilos fora dos limites artificiais do laboratório, visto que, os camundongos comuns são resistentes ao *M. leprae* e eliminam os bacilos após a infecção (LEVY e JI, 2006; LAHIRI *et al.*, 2011).

A história de manifestações de hanseníase em tatus selvagens caracterização o adoecimento dos mesmos, é recente. Há relatos de casos de animais infectados, apresentando inclusive hansenomas, desde o Sul dos Estados Unidos (TRUMAN, 2005), ao Brasil (DEPS *et al.*, 2008). Como demonstrado em estudos realizados em laboratórios, o *M. leprae* pode desenvolver-se em tatus (*Dasypus novemcinctus*), manifestando a forma *vichorwiana*, que é a forma mais agressiva da doença (TRUMAN, 2005).

Os casos de hanseníase em tatus selvagens são reforçados por apresentar lesões típicas, reatividade ao teste de Mitsuda, análise positivas ao teste sorológico e PCR específico, transmissão de bacilos para animais sadios e as associações de contato humano (DEPS *et al.*, 2008; LOUGHRY *et al.*, 2009)

Foram publicados estudos relatando provas de testes sorológico *ML flow* e PCR específicos para *M. leprae* em tatus no Estado do Espírito Santo, Brasil (DEPS *et al.*, 2007), bem como, em tatus coletados na região dos Andes da Colômbia (CARDONA-CASTRO *et al.*, 2009).

Nas pesquisas feitas com diversas espécies de tatus selvagens na América do Sul têm sido confirmadas infecções por *M. leprae*. No entanto, não foram verificadas evidências de infecção em outros animais selvagens (PEDRINI *et al.*, 2010).

São necessários estudos ecológicos para compreender a dinâmica do *M. leprae* no ambiente, e os diferentes reservatórios, visto que, no solo há uma flora bacteriana bem diversificada, influenciada por fatores como tipo de clima e solo, e pela vegetação local, além de outros insumos bióticos (SALEM e FONSECA, 1982; PARASHAR *et al*, 2007).

Algumas espécies de micobactérias são comuns no ambiente sendo “bactérias de vida livre”, em contraste, com outras micobactérias, como *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. bovis* que são parasitas intracelulares e agentes patogênicos de humanos e animais (CHILIMA *et al.*, 2006).

A investigação mais precisa de *M. leprae* em amostras clínicas é limitada pela falta de métodos mais acessíveis, em razão de os protocolos laboratoriais apresentarem geralmente alto custo.

A extração de DNA a partir de amostras de solo e água requer um processo de descontaminação para eliminação de inibidores de PCR, visto que, existem outros microorganismos e oligoelementos tão resistentes ao processo quanto a maioria das micobactérias (CHILIMA *et al.*, 2006).

As amostras clínicas de solo têm faixa de pH mais amplo e são menos previsíveis. Tais amostras contêm quantidades variáveis de materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo enzimas de células livres, metais pesados, e outros microorganismos. Podem suportar a descontaminação seletiva inibindo a detecção por PCR (FALKINHAM *et al.*, 2001; CHILIMA *et al.*, 2006).

A demonstração de que o *M. leprae* pode sobreviver à ingestão por amebas sugere que protozoários poderiam aumentar a probabilidade de sobrevivência do *M. leprae* no solo e, portanto, pode ser uma via de transmissão da hanseníase (LAHIRI e KRAHENBUHL, 2008). Todavia, são necessários estudos para confirmar a associação entre a manutenção e a capacidade de reprodução no interior de protozoários (LAHIRI e KRAHENBUHL, 2008; WAHYUNI *et al.*, 2010).

A água foi considerada uma possível fonte de infecção de *M. leprae* devido a detecção de seu DNA na água usada por pacientes. Esse fato mostrou-se significativo pela comparação com indivíduos que não faziam uso destas

águas contaminadas, pressupondo que, pessoas que utilizam água contaminada tem maiores chances de adoecer de hanseníase (ADRIATY *et al.*, 2010).

O Mato Grosso, na região Centro-Oeste do Brasil, tem o tratamento da água como uma exigência da legislação, e é reconhecido como uma das ações de promoção da saúde e prevenção dos agravos transmitidos pela água (BRASIL, 2012).

Os dados do Sistema de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), mostram que, na região Centro-Oeste cerca de 13% dos Sistemas de Abastecimento de Água (SAA) não realizam tratamento, enquanto em Mato Grosso esse percentual é mais elevado chegando a 29% dos Sistemas de Abastecimento de Água (SAA) sem tratamento (BRASIL, 2011). Em municípios sem tratamento da água de abastecimento público, a qualidade da água para consumo é avaliada por meio de indicadores de turbidez, coliformes totais (CT), presença de e *Escherichia coli*, dentre outros, que podem indicar a contaminação por micro-organismos patogênicos (BRASIL, 2011).

Os trabalhos de Falkinham *et al.* (2001) com micobactérias de “vida livre” mostram associação com a água consumida pela população, e em alguns casos na água tratada. Assim como as micobactérias de crescimento rápido, também foram encontrados micobactérias mais representativas e de crescimento lento em biofilmes de água.

Acredita-se que, os reservatórios ambientais do *M. leprae* não possam ser excluídos em virtude da existência de um considerado número de observações epidemiológicas e microbiológicas que indicam essas fontes ambientais, além dos seres humanos infectados, que podem desempenhar um importante papel na transmissão da doença (ADRYATI *et al.* 2010; WAHYUNI *et al.*, 2010).

As técnicas genômicas utilizadas para a investigação do *M. leprae* em água no domicílio e peridomicílio são de suma importância, uma vez que, havendo indícios de bacilos viáveis nesse ambiente poderiam representar uma nova fonte de infecção.

## **Perfil Socioambiental dos Pacientes e Vizinhos**

Os autores Lockwood e Suneetha (2005) relatam em estudos no Brasil que a hanseníase está associada à pobreza. De acordo com Magalhães e Rojas (2005), as más condições moradia, baixo nível educacional e desnutrição consistem em fatores que estão relacionados aos casos novos de hanseníase.

Uma grande parcela de casos novos reside em domicílios inadequados, adensados e sem infraestrutura. Da mesma forma, o baixo nível educacional está presente em estudos sócio demográficos (AQUINO *et al.*, 2003). Quanto à alimentação, as deficiências nutricionais podem comprometer o sistema imunológico (KERR-PONTES, 2006). A importância desses fatores na propagação da doença pode estar relacionada basicamente à susceptibilidade genética versus fatores externos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Desenho do Estudo** - Estudo epidemiológico ambiental descritivo de investigação da presença do *M. leprae* no solo e na água de consumo humano do domicílio e peridomicílio dos casos novos de hanseníase diagnosticados no primeiro semestre de 2013 e dos contatos de vizinhança nos municípios de Cáceres e Várzea Grande, Estado de Mato Grosso.

**Local e População do Estudo** – O estudo foi desenvolvido na região Centro-Sul do Estado de Mato Grosso, dentro do perímetro urbano dos municípios de Cáceres e Várzea Grande, situados no Alto Pantanal mato-grossense, próximo à fronteira do Brasil com a Bolívia (15°00'S e 55°00'W, Figura 1) (IBGE, 2010).

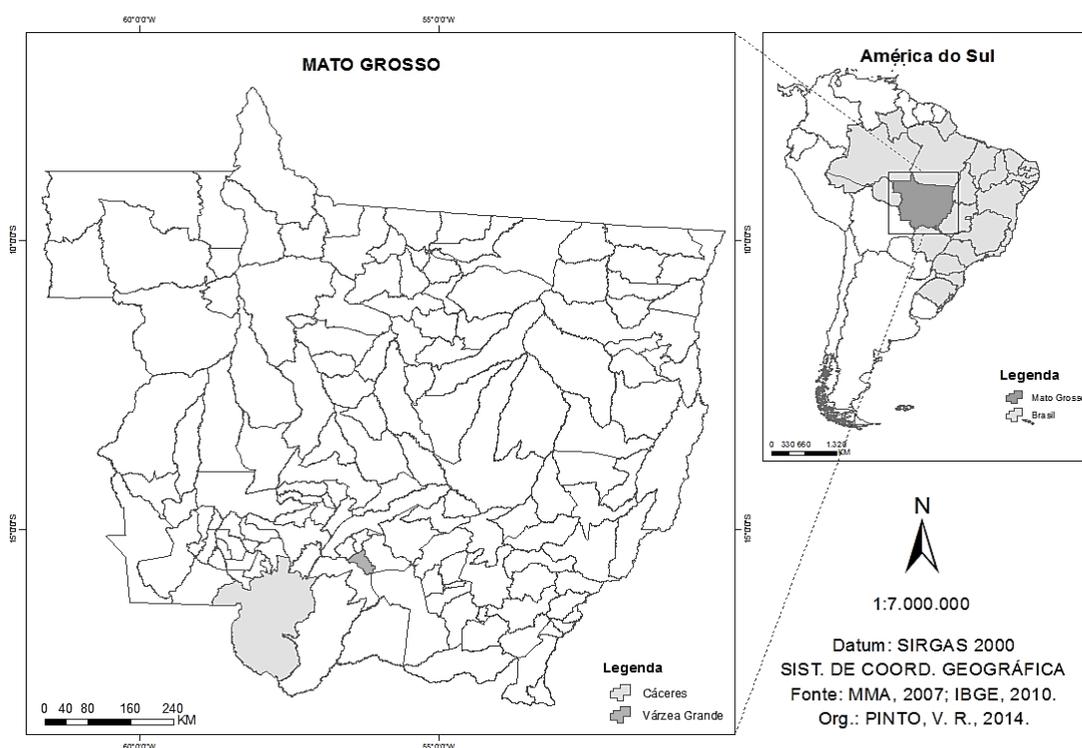


Figura 1 – Localização dos municípios de Cáceres e Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.

Foram incluídos no estudo 02 casos novos de hanseníase residentes em Cáceres diagnosticados no Hospital Bom Samaritano até o período de coleta. Para Várzea Grande foram selecionados 34 casos novos diagnosticados no Centro de Doenças Tropicais (CDT). Todas as amostras de água e solo das residências dos casos de hanseníase foram comparadas com amostras de água e solo das residências dos respectivos vizinhos no que se refere aos mesmos parâmetros.

**Dados ambientais** – A precipitação total de chuvas no ano entre os meses de outubro a abril é de 86%, e nos meses restantes a ocorrência é menos frequente (ALMEIDA *et al.*, 2011). Considerando-se que as condições climáticas da região dos municípios de Cáceres e Várzea Grande são tipicamente tropicais, assim como outras regiões endêmicas de hanseníase.

**Fonte de dados** - Os dados de ocorrência de hanseníase foram obtidos na Secretaria Municipal de Saúde/Setor de Vigilância Epidemiológica/ Centro de Doenças Tropicais-CDT, por meio da ficha de notificação e investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. O SINAN foi consultado semanalmente para identificação dos casos novos. Através das fichas de notificações foi possível localizar as residências dos casos diagnosticados no período de coleta de dados. O indivíduo que aceitou participar da pesquisa, após ser informado sobre o questionário e aos aspectos do domicílio e da doença, bem como sobre os procedimentos de coleta de água e solo em sua residência, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE. Aqueles incluídos no estudo foram informados sobre o caráter epidemiológico da pesquisa, sendo expresso o sigilo dos dados. Aos vizinhos não foi informado sobre a ocorrência de casos da doença nas proximidades.

**SINAN** – Por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN (Anexo I) foram filtrados os dados relativos ao nível municipal como: data do diagnóstico, classificação operacional, resultados de baciloscopia, ocupação e endereço do paciente. A partir destes dados foi realizado contato pessoal ou

telefônico com os pacientes para aplicação de questionário e coleta de amostras de água e solo.

**Questionário Semiestruturado** – Foram elaborados questionários estruturados com variáveis relacionados às condições de moradia, alimentação e atividades sociais para os casos novos (Questionário I) e para os vizinhos (Questionário II). Os casos novos e vizinhos incluídos no estudo assinavam uma autorização para que ocorresse visita ao domicílio. Por esta razão, nem todos os casos diagnosticados nos dois municípios puderam ser incluídos no estudo. Foram aplicadas questões a respeito de características sociodemográficas, que incluíram o nível de escolaridade, tipo de lazer, acesso a água potável e sobre as condições gerais do domicílio e vizinhança. Foram entrevistadas 70 pessoas, sendo 36 casos novos de hanseníase em início de tratamento, entre os meses de março e setembro de 2013, e 34 vizinhos no mesmo período. A data da realização da entrevista do paciente e coleta de amostras de água e solo foram as mesmas para pacientes e para respectivos vizinhos. A sequência de aplicação do questionário na vizinhança, bem como da coleta de água e solo ocorreram de modo independente de indícios de casos da doença na residência vizinha. Foram selecionados os vizinhos da residência à direita da residência do paciente. Não havendo moradia à direita, buscou-se o vizinho da esquerda, e não havendo vizinhos em ambos os lados, escolheu-se o vizinho dos fundos. Para facilitar o acesso à moradia junto ao paciente, foram feitas visitas nos finais de semana e feriados.

**Água** – As coletas da água seguiram à normatização apresentada na “Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância Ambiental em Saúde Relacionada à Qualidade da Água para Consumo Humano” – VIGIAGUA (BRASIL, 2005). Foram coletadas amostras de água nas residências e peridomicílios dos casos novos diagnosticados e dos contatos de vizinhança. As amostras foram coletadas em torneiras de cozinha, torneiras e reservatórios localizados nos quintais. Nenhum paciente ou vizinho residia em apartamentos.

**Coleta de Água em Poços** - Foram usadas vasilhas de alumínio previamente esterilizadas por combustão de pequena quantidade de álcool dentro das mesmas. Estas foram descidas lentamente pelo cordão, sem permitir que o recipiente tocasse nas bordas laterais do poço. O recipiente foi submergido, permitindo que se obtivesse amostra mais profunda de água. O volume da água coleta deveria ser suficiente para preencher o recipiente esterilizado. Ao transferir a água para o interior do recipiente, teve-se o cuidado de colocá-lo no centro do coletor para que o mesmo não entrasse em contato com as bordas do poço. Depois de fechados, os recipientes (tubos) do tipo Falcon 50 ml foram identificados, acondicionados e levados para análise (BRASIL, 2006).

**Coleta de Água em Torneiras** – A água foi coletada de torneiras que fornecem água para o preparo dos alimentos, estivesse a mesma localizada na cozinha ou em outra parte do domicílio/peridomicílio. A torneira foi totalmente aberta. Após deixada a água escoar por alguns segundos, foram limpas as partes interna e externa da torneira com gaze ou algodão embebido em álcool 70%, e então, a torneira foi novamente aberta para que a água escoasse por mais alguns segundos. O recipiente esterilizado foi manuseado para que não houvesse contaminação do interior ou da tampa. A água foi coletada até o nível de 50ml, em seguida fechado e identificado (BRASIL, 2006).

**Coleta de Solo** – As amostras de solo foram coletadas no entorno da casa do "paciente" (por volta de 5m) e um número idêntico de amostras foram coletadas das áreas das casas dos vizinhos (não paciente). Os pontos escolhidos estavam localizados próximos a banheiros, entrada da casa, e debaixo de árvores onde segundo relato do morador, ele costumava descansar. Foi escavado (4cm de profundidade), recolhido 10g em recipientes de plástico esterilizados (Tubo Falcon de 50ml), e posteriormente rotulados. As amostras coletadas foram transportadas para análise em temperatura ambiente por até 02 (dois) dias e subsequentemente armazenadas a 4°C até o processamento (LAVANIA *et al.*, 2008).

### **Extração de fragmento de tecido e biópsia para *Mycobacterium leprae***

A amostra de biópsia foi obtida no Centro de Doenças Tropicais (CDT) de Várzea Grande-MT. O material foi extraído de um portador de hanseníase multibacilar, da forma clínica virchowiana. Optou-se por um caso com tais características em razão da maior carga bacilar se comparada às outras formas clínicas da hanseníase. O tecido de biópsia foi preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a utilização posterior. As amostras de tecido foram maceradas com bisturi sobre lâmina de vidro e colocadas em tubo *ependorf* de 1,5mL. Foram adicionados 500 $\mu\text{L}$  de tampão *Cell Lysis* 0.2M NaOH (Hidróxido de sódio), 1% SDS (Dodecil sulfato de sódio) e 20 $\mu\text{L}$  de proteinase K (Proteinase K em 20mg/mL) para degradar qualquer proteína presente nas amostras. Na sequência as amostras foram incubadas em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C}$  e deixada *overnight*. Após o período de *overnight*, as amostras foram incubadas por 10min a  $95^{\circ}\text{C}$  para inativação da proteinase K, centrifugada e retirado o sobrenadante. Foi então adicionado 300 $\mu\text{L}$  de *Nucleo Lysis Solution* (Tris-HCL 2-Amino-2-hydroxymethyl -1,3-propanediol). A segunda incubação foi realizada por 30min, para que esta solução rompesse as paredes do núcleo das células para liberação do conteúdo gênico. Foram adicionados 150 $\mu\text{L}$  de *Protein Precipitation Solution* (Acetato de amônia) e agitadas por 20 segundos. As amostras foram deixadas no gelo por 5 minutos, e então centrifugadas a 8000 RPM por 5 minutos. Após formar uma massa no fundo do tubo, foi removido o sobrenadante contendo o DNA e este foi transferido para um tubo contendo 600 $\mu\text{L}$  de Isopropanol. Após este processo, o tubo foi invertido até a formação de uma massa visível de DNA, então foi realizada nova centrifugação por 90 segundos a 13.000 RPM. O DNA pôde ser visto como um pequeno *pellet* branco no fundo do tubo. Aos *pellets* foram adicionados 300 $\mu\text{L}$  de Etanol 70% para lavagem e novamente centrifugado a 13.000 RPM por 90 segundos. Após esse processo o sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos em papel absorvente limpo e deixado secar o Etanol por 3horas. Ao final do tempo de secagem dos *pellets* foi adicionado 50 $\mu\text{L}$  de solução de reidratação. Uma nova incubação foi realizada por 1hora a  $65^{\circ}\text{C}$  e posterior conservação em temperatura entre 2 e  $8^{\circ}\text{C}$  até o devido uso.

## Extração de DNA da Água com *Kit da PROMEGA*

Referência: adaptado de Chilima *et al* (2006).

**Primeira Etapa:** As amostras de água coletadas foram mantidas em temperatura -20°C. Os tubos contendo 50 ml de água foram centrifugados a 13.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e então a massa do fundo foi transferida para tubos *ependorf* de 1,5 ml devidamente etiquetados. Após esse processo as amostras foram acondicionadas em *freezer* a -20°C até a data de extração.

**Segunda Etapa:** As amostras foram centrifugadas a 7.000 RPM por 2 minutos. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados 300 µl de *Cell Lysis* (0.2M NaOH (Hidróxido de sódio), 1% SDS (Dodecil sulfato de sódio)) e deixadas por 10 minutos no agitador. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13.000 RPM por 20 segundos, retirado o sobrenadante, adicionado 100 µl de *Nuclei Lysis* (Tris-HCL (2-Amino-2- (hydroxymethyl) -1 ,3-propanediol)) e colocadas em banho-maria por 1 hora a 37°C. As amostras foram retiradas do banho-maria, adicionados 50 µl de *Protein Precipitation Solution* (Acetato de amônia) e levadas ao agitador por mais 20 segundos. As amostras foram centrifugadas a 7.000 RPM por 5 minutos até formarem um *pellet* marrom. Os sobrenadantes foram passados para outros tubos contendo 300 µl de álcool isopropanol e descartados os *pellets*. Foram centrifugadas a 13.000 RPM por 90 segundos, decantados os sobrenadantes e adicionados 300 µl de etanol 70%. As amostras foram invertidas várias vezes para lavar o *pellet* de DNA e centrifugadas por 90 segundos a 13.000 RPM. Após a retirada do etanol, as amostras permaneceram em secagem por 2 horas com os tubos virados para baixo. Após o tempo de secagem foram adicionados 50 µl de *DNA Rehydration Solution* (10mM Tris-HCL (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)), 1mM EDTA (Ácido etilenodiaminatetraacético)) e colocadas em banho-maria por 1 hora a 56°C. Terminado o processo de reidratação as amostras com DNA extraído foram mantidas a -20 °C.

## Extração de DNA do Solo com Kit da PROMEGA

Referência: adaptado de Ravindra P. Turankar, 2011.

O procedimento para extração de DNA de *M. leprae* seguiu a sequência: coleta de 100mg de solo seco em tubo *ependorf* de 1.5mL. Para cada tubo foi adicionado 500µL de solução de etanol puro, passado no agitador, centrifugado a 10.000 RPM e retirado o sobrenadante. Foram adicionados 300µL de *Cell Lysis* (0.2M NaOH (Hidróxido de sódio), 1% SDS (Dodecil sulfato de sódio)) e incubado a 60°C overnight em banho maria. Logo após foi desprezado o sobrenadante e adicionados 300µL de *Nuclei Lysis* (Tris-HCL (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)) e 30µL de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10%. O material foi agitado e incubado por 1 hora a 60°C. As amostras foram retiradas do banho-maria, adicionados 150 µl de *Protein Precipitation Solution* (Acetato de amônia). Depois de levadas ao agitador por 20 segundos as amostras foram colocadas no *freezer* por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 8.000 RPM por 5 minutos até formarem um *pellet* marrom. O sobrenadante foi passado por uma coluna de sepharose 4B (4-5 cm preparadas em seringas de 1 mL) para retirar os inibidores de PCR. O DNA foi precipitado com Isopropanol e incubado overnight a -20° C. Por conseguinte o material foi centrifugado a 13.000 RPM por 5 minutos, descartado o sobrenadante e adicionado etanol 70%. Após a retirada do etanol com uma pipeta, as amostras permaneceram em secagem por 2 horas com os tubos virados para baixo sobre papel absorvente. Após o tempo de secagem, foram adicionados 50µl de DNA *Rehydration Solution* (10mM Tris-HCL 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), 1mM EDTA (Ácido etilenodiaminatetraacético) e colocadas em banho-maria por 1 hora a 56° C. Terminado o processo de reidratação, as amostras com DNA extraídos foram mantidas a -20° C.

**PCR para *M. leprae*****Referência: Kieng-Han Yoon (1993)**

Utilizou-se o *primer* específico R1 (5' - CGGCCGGATCCTCGATGCAC - 3') e R2 (5' - GCACGTAAGCTTGTCGGTGG - 3') para detectar o DNA do *M. leprae* por meio dos procedimentos a seguir:

**Diluição dos *Primers*:** Os 100nm de *primer* obtidos equivalem a 1000 reações com 0,5µM de *primer* por amostra. Os 100nm foram diluídos em 4000µL de água que equivalem a 25µM de *primer*/microlitro. Portanto, 1µL desta última diluição em 50µL de mistura é igual a 0,5µM de *primer*. Para cada reação foi usada a concentração de 1µL de cada *primer* na reação para 6µL de DNA (amostra) em 43µL de *Master Mix*.

**Amplificação:** A amplificação foi realizada em um termociclador sob as seguintes condições: 95°C durante 5 minutos para a desnaturação inicial seguido de 35 ciclos; 94°C durante 60 segundo para a desnaturação do DNA; 60°C durante 2 minutos para o anelamento do *primer*; 72°C durante 3 minutos para a extensão; e 72°C durante 10 minutos para a extensão final. Para a validação do teste foram aplicados 1µL de DNA de *M. leprae* em água estéril e então seguido o protocolo de extração de DNA adaptado do kit *PROMEGA*.

**Eletroforese:** Foram extraídos 3µL da amostra de DNA de *M. leprae* homogeneizados com 1µL de tampão de corrida concentrado 5 vezes (Azul de bromofenol) e aplicadas as amostras nos poços. Foram reservados 2 poços para utilização de um padrão de corrida (*Ladder*-1Kb) com 75 volts de tensão a 400mA constantes por 75 minutos. Os resultados obtidos foram fotografados. O material escolhido para controle positivo foi o DNA de *M. leprae* extraído de biopsia de paciente com hanseníase e para controle negativo foi utilizada água estéril. Os produtos de PCR foram caracterizados como positivas para *M. leprae* quando visualizadas no gel com faixa de 372 pares de base no *ladder*.

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Malária do Hospital Universitário Julio Müller, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) em Cuiabá-MT.

### **Considerações Éticas**

As coletas de amostras de água e solo foram iniciadas mediante a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP, UNEMAT, sob o número 13632213.0.0000.5166. Após a concordância dos gestores de saúde dos municípios de Cáceres e de Várzea Grande para os trabalhos na pesquisa, foram identificados os pacientes recém-diagnosticados com hanseníase e contatados por telefone para o agendamento da visita.

## RESULTADOS

### Caracterização Sociodemográficas de Casos de Hanseníase e Vizinhos

Na **Tabela 01** são apresentados os casos novos multibacilares e paucibacilares, tempo entre o início de tratamento após o diagnóstico e o de aplicação do questionário e coleta das amostras de água e solo nos municípios estudados. No município de Cáceres não houve notificação de casos novos para hanseníase multibacilar. No município de Várzea Grande foram diagnosticados casos para hanseníase multibacilar e paucibacilar, com início de coleta variando entre 4 a 44 dias após o diagnóstico.

**Tabela 01: Casos novos de hanseníase, início de tratamento e período de coleta nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013.**

Classificação operacional	Cáceres		Várzea Grande	
	CNH	IT/C	CNH	IT/C
Paucibacilar	2	10 dias	15	4 a 30 dias
Multibacilar	0		19	4 a 44 dias

\* Casos novos de hanseníase (CNH); Média entre Início de tratamento/ Coleta (IT/C)

A **Tabela 02** apresenta os dados socioambientais, e mostra o predomínio de indivíduos do sexo masculino, com variação de idade entre 19 e 75 anos. A maioria dos pacientes e seus vizinhos se autodeclararam da raça parda. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes e de vizinhos quanto à raça/cor ( $\chi^2$  2,16;  $p > 0,139$ ).

Para o nível de escolaridade, verificou-se maior proporção de pacientes e vizinhos com nível fundamental (incompleto ou em curso) quando comparados ao nível médio e superior. Em relação à ocupação, 64% das mulheres dos dois grupos declararam atividades do lar ou trabalhadoras domésticas, e 19,6% dos homens como trabalhadores de serviços gerais.

**Tabela 02: Informações sociodemográficas de pacientes e vizinhos nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013.**

Variáveis	Pacientes		Vizinhos		X <sup>2</sup>	Valor de p
	N	%	N	%		
<b>Sexo</b>						
Feminino	13	36,1	15	48,4	0,62	0,431
Masculino	23	63,9	16	51,6	0,90	0,342
<b>Faixa Etária</b>						
Adultos	31	86,8	25	77,3	1,26	0,261
Idosos	5	13,2	6	22,7	-	-
<b>Raça</b>						
Branca	9	25,0	6	19,4	0,16	0,963
Preta	5	13,9	1	3,2	-	-
Parda	22	61,1	24	77,4	2,19	0,139
<b>Escolaridade</b>						
Analfabeto	2	5,6	3	9,6	-	-
Ensino Fundamental	21	58,3	23	74,2	1,37	0,241
Ensino Médio	10	27,8	5	16,2	0,04	0,836
Ensino Superior	3	8,3	0	0	-	-
<b>Trabalho</b>						
Aposentado	6	16,7	7	22,6	0,02	0,878
Doméstica	5	2,8	4	12,9	-	-
Estudante	4	11,1	1	3,2	-	-
Do Lar	1	13,9	6	19,4	-	-
Ser. Gerais	7	19,6	6	19,3	-	-
Outros <sup>1</sup>	12	28,0	7	22,6	0,14	0,712
<b>Trabalho Anterior</b>						
Do Lar	7	19,4	12	38,7	0,53	0,467
Ser. Gerais	11	30,6	3	9,7	-	-
Estudante	5	13,9	5	16,1	-	-
Outros <sup>2</sup>	13	36,2	11	35,6	0,10	0,751

1 Corresponde as profissões de cozeiro, motorista, cabeleireiro, manicure, pastor, marceneiro, metalúrgico, técnico administrativo, segurança e vendedor.

2 Corresponde as profissões de lavrador, motorista, mecânico, missionário e segurança.

No que se refere ao consumo de carne de caça, ainda que raro para ambos os grupos, inclui preferencialmente: tatu-galinha, veado, paca, queixada, capivara e anta. O pequeno consumo de carne de caça justifica-se pelo local de moradia dos entrevistados, dado que todos os entrevistados são residentes no perímetro urbano dos dois municípios incluídos no estudo, e as carnes de caça vinham de área rural dos municípios vizinhos. Tal fato, segundo os entrevistados, dificulta a frequência e acesso a esse tipo de alimento.

Quanto aos animais domésticos que frequentavam os quintais, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre pacientes e vizinhos ( $\chi^2$  0,07;  $p > 0,795$ ), assim como, para o histórico de acidentes por mordidas de cães ( $\chi^2$  0,01;  $p > 0,909$ ), ou arranhões de gatos ( $\chi^2$  0,65;  $p > 0,419$ ). Não houve diferença estatística entre os residentes que criavam algum tipo de animal doméstico ( $\chi^2$  0,34;  $p > 0,561$ ), o que corresponde a mais de 70% das residências (Tabela 3).

**Tabela 03: Tipos de contatos com animais, como possíveis fontes de contaminação por *M. leprae*, entre pacientes e vizinhos nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013.**

Variáveis	Pacientes		Vizinhos		X <sup>2</sup>	Valor de p
	N	%	N	%		
<b>Consumo de carne de caça</b>						
Sim	15	41,7	8	25,8	0,07	0,795
Não	21	58,3	23	74,2	1,37	0,241
<b>Cães e gatos frequentadores dos quintais</b>						
Sim	17	47,2	15	48,4	0,00	0,989
Não	19	52,8	16	51,6	0,02	0,877
<b>Histórico de mordida por Cão</b>						
Sim	5	13,9	5	16,1	-	-
Não	31	86,1	26	83,9	0,01	0,909
<b>Histórico de arranhado por gato</b>						
Sim	3	8,3	6	19,4	-	-
Não	33	91,7	25	80,7	0,65	0,419
<b>Criação de animais domésticos</b>						
Sim	30	83,3	22	71,0	0,34	0,561
Não	4	11,1	7	22,6	-	-
Já Teve <sup>1</sup>	2	5,6	2	6,5	-	-

1 Cão, gato, periquito, hamister, papagaio e coelho.

A **Tabela 04** apresenta os dados sobre as atividades de lazer e relacionamentos sociais dos pacientes de hanseníase e seus vizinhos. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as variáveis relativas aos pacientes e vizinhos. A atividade social mais frequente entre os pacientes e vizinhos foram os cultos religiosos com 66,7% e 67,7% respectivamente. Quanto às atividades de lazer na água, 54,8% dos vizinhos relataram frequentar lagoas, enquanto apenas 2,8% dos casos novos declararam tomar banho nesses locais. Para tais variáveis o “n” foi reduzido não possibilitando comparações estatísticas. Apesar de haver frequência em locais com água a prática da “Pesca” não mostrou resultados significativos.

**Tabela 04: Atividades sociais e de lazer desenvolvidas pelos casos novos de hanseníase e seus vizinhos nos municípios Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013.**

Variáveis	Pacientes		Vizinhos		X <sup>2</sup>	Valor de p
	N	%	N	%		
<b>Atividades sociais</b>						
Esporte	3	8,3	3	9,7	-	-
Religião	26	66,7	22	67,7	0,00	1,000
Bar	2	5,6	6	19,4	-	-
<b>Lazer na água</b>						
Piscina	4	11,1	4	12,9	-	-
Córrego	3	8,3	3	9,7	-	-
Rio	5	13,9	7	22,6	-	-
Lagoa	1	2,8	17	54,8	-	-
Represa	2	5,6	4	12,9	-	-
<b>Pesca</b>						
Sim	3	8,3	12	38,7	-	-
Não	25	69,4	13	41,9	3,60	0,080
<b>Visita vizinho</b>						
Sempre	9	25,0	9	29,0	0,00	1,000
As vezes	11	30,6	12	38,7	0,08	0,775
Raramente	10	27,8	6	19,4	0,00	1,000
Nunca	6	16,7	4	12,9	-	-
<b>Toma tereré em grupo</b>						
Sim	14	38,9	11	35,5	0,15	0,699
Não	22	61,1	20	64,5	0,16	0,694

\*Tereré é uma bebida feita com a infusão da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), de origem guaraní.

Para as variáveis relativas às condições de moradia, fonte de água para consumo e acúmulo de lixo doméstico não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e vizinhos (Tabela 5).

Os entrevistados residiam em casas de alvenaria, a maioria murada ou em fase de acabamento. As casas eram de programas habitacionais, loteamentos, ou mesmo fruto de invasões de áreas públicas. Nas visitas às residências para coletas constatou-se que mais de 90% das residências dos entrevistados eram casas próprias.

A água utilizada por 72,2% dos pacientes e 74,2% dos vizinhos provinha da rede pública, e em decorrência da falta desse atendimento encontrava-se casas

com poços artesanais sendo 27,8% para os pacientes e 16,1% para os vizinhos, além disso 9,7% vizinhos utilizavam-se de ambos tipos de abastecimento rede/poço.

O sistema de esgoto comum aos grupos foi do tipo fossa séptica, a rede de esgoto pública é quase inexistente nos bairros periféricos. Metade dos grupos entrevistados disse utilizar água para beber tirada da torneira, tendo a água mineral e água de poço como fontes secundárias. A água residual da máquina de lavar roupas costuma ser aproveitada para molhar o quintal.

O consumo de frutas produzidas no quintal é comum para os dois grupos entrevistados, destacando-se frutas como manga, caju, seriguela, acerola, abacate, tamarindo, jaca e banana. Da mesma forma, o cultivo de outras plantas no quintal sendo: verduras (cebolinha, coentro, alface e rúcula), legumes (quiabo e abóbora), raízes (mandioca e batata doce).

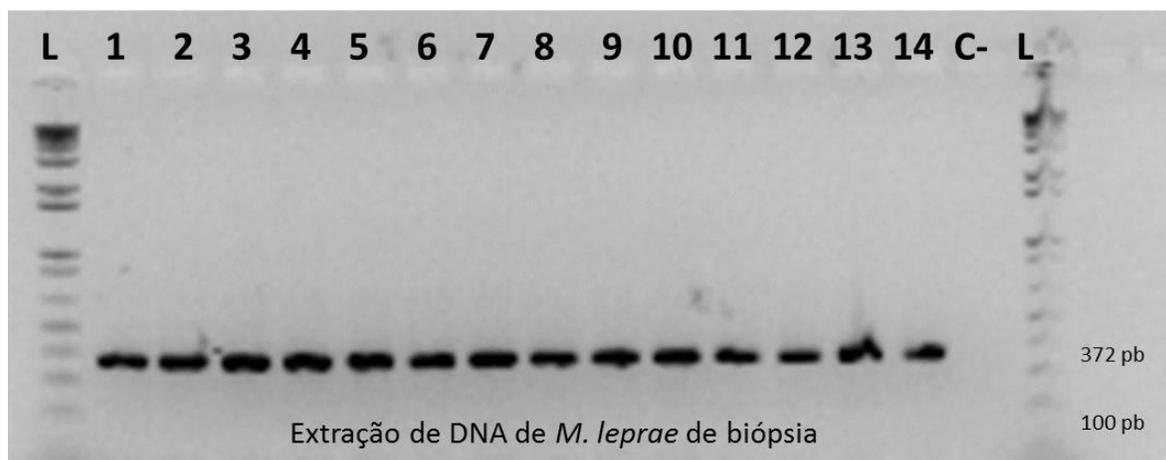
Quanto ao lixo doméstico, o serviço de coleta da prefeitura era eficiente em todas as residências visitadas, não havendo a necessidade de acúmulo de lixo no quintal. No entanto, as casas visitadas situavam-se próximos a terrenos baldios e áreas de mata que funcionavam como lixões, foi observado que os moradores jogavam restos de materiais para construção, pneus, móveis, eletrodomésticos e lixo orgânico.

**Tabela 05: Condições de moradia, fonte de água para consumo e acúmulo de lixo doméstico de pacientes e seus vizinhos nos municípios de Cáceres e Várzea Grande-MT, 2013.**

Variáveis	Pacientes		Vizinhos		X <sup>2</sup>	Valor de p
	N	%	N	%		
<b>Moradia Atual</b>						
Alugada	1	2,8	2	6,5	-	-
Própria	34	94,4	28	90,3	0,05	0,821
Cedida	1	2,8	1	3,2	-	-
<b>Cerca Quintal</b>						
Madeira	5	13,9	2	6,5	-	-
Tijolo	24	61,1	21	67,7	0,26	0,607
Arame	3	8,3	5	16,1	-	-
Sem Cercado	4	11,1	3	9,7	-	-
<b>Abastecimento d'água</b>						
Rede	26	72,2	23	74,2	0,00	0,947
Poço	10	27,8	5	16,1	0,04	0,836
Poço e Rede	0	0	3	9,7	-	-
<b>Esgoto</b>						
Fossa Séptica	28	77,8	25	80,6	0,02	0,898
Fossa Rudimentar	2	5,6	2	6,5	-	-
Céu aberto	1	2,8	0	0	-	-
Rede Pública	5	13,9	4	12,9	-	-
<b>Água para beber</b>						
Torneira	16	44,4	16	51,6	0,13	0,723
Poço	9	25,0	2	6,5	-	-
Mineral	11	30,6	13	41,9	0,02	0,885
<b>Molha quintal</b>						
Sim	23	63,9	20	64,5	0,00	0,988
Não	13	36,1	11	35,5	0,10	0,751
<b>Cultivo de fruta do quintal</b>						
Sim	21	58,3	19	51,6	0,19	1,000
Não	15	27,8	12	29,0	0,11	0,735
<b>Cultivo Jardim Horta</b>						
Sim	13	36,1	16	51,6	0,39	0,534
Não	23	63,9	15	48,6	1,27	0,257
<b>Lixo Doméstico</b>						
Sim	6	16,7	6	19,4	0,60	0,438
Não	30	83,3	25	80,6	0,00	0,974

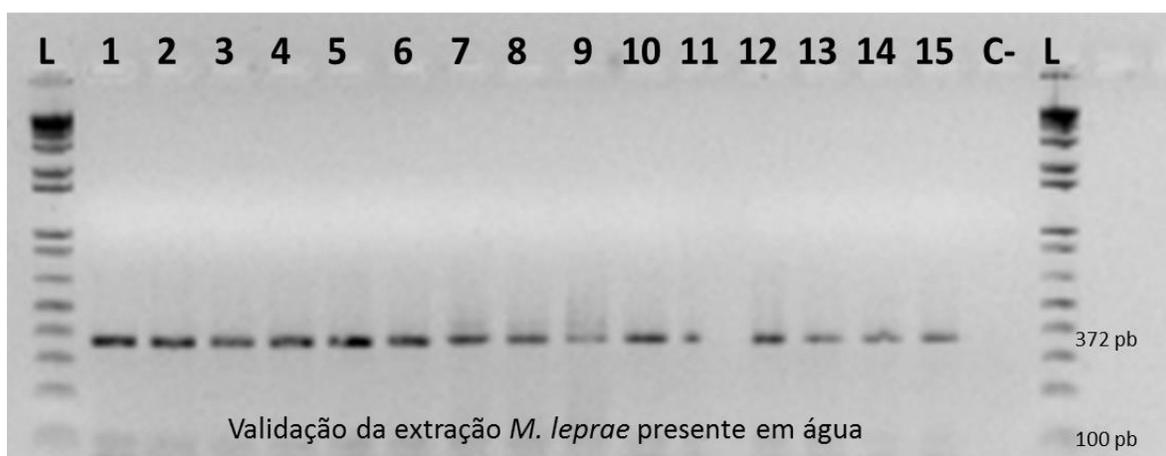
## Análises Moleculares de Água

Para a detecção do *M. leprae* por PCR na água, a **figura 02**, apresenta o bandejamento do controle positivo, com bandas no tamanho de 372 pares de base. Esse teste mostrou que o método adaptado para extração de DNA de *M. leprae* em biópsia de paciente com hanseníase foi eficaz.



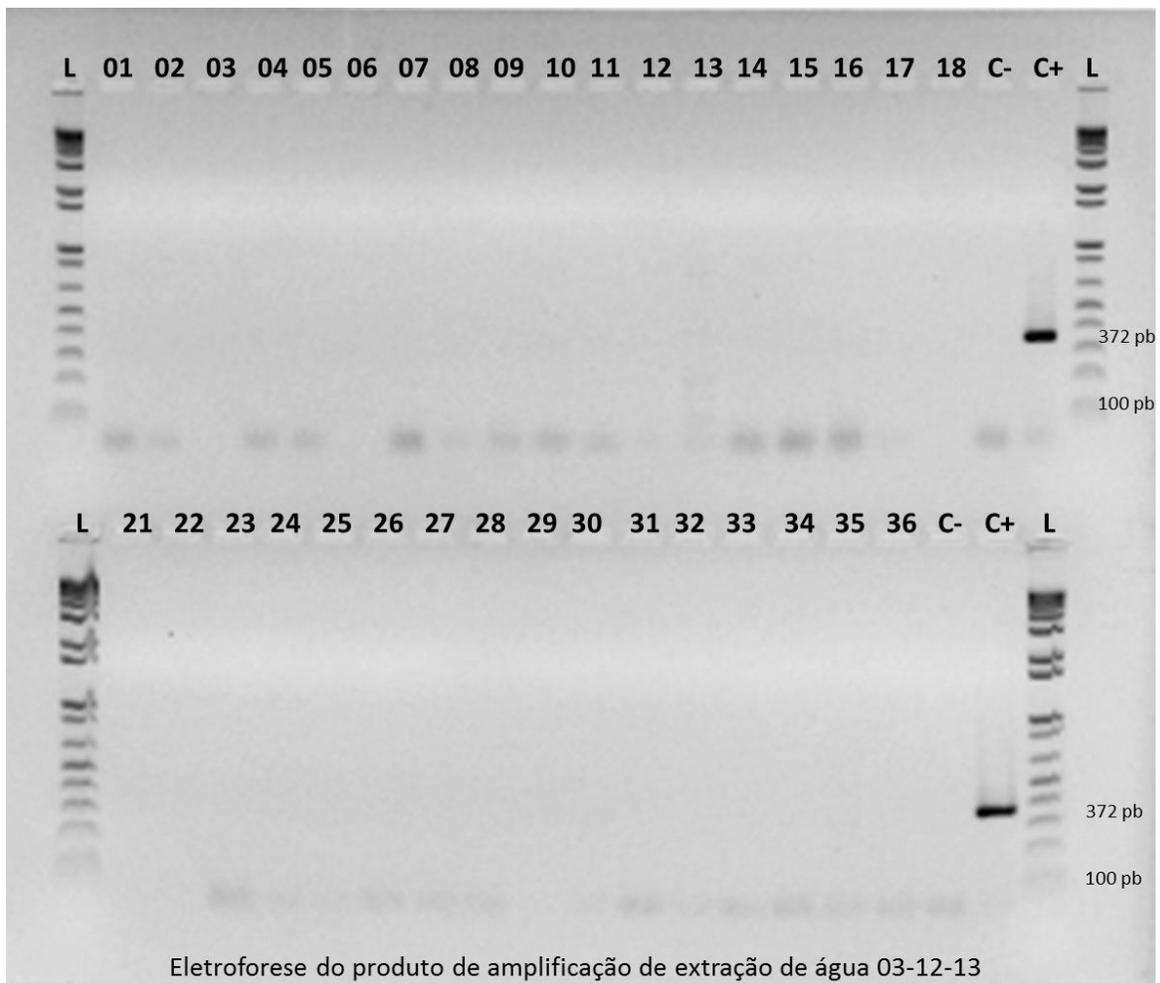
**Figura 02.** Produto da amplificação do DNA de *M. leprae* extraído de biópsia de paciente vichorwiano.

A **figura 03** mostra o resultado da padronização da técnica de extração de 1µl do DNA de *M. leprae* da água, apresentando as bandas com 372pb demonstrando o sucesso do método de extração.



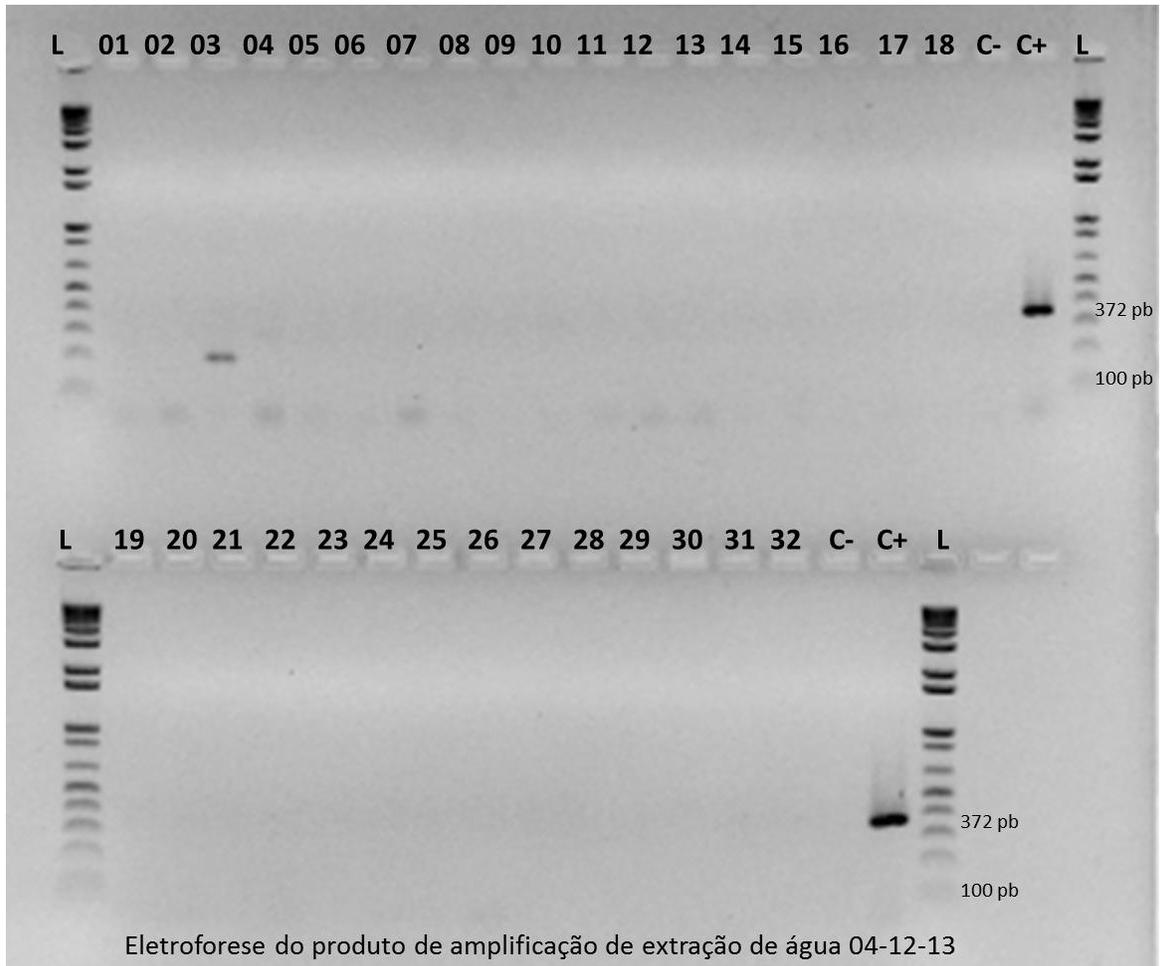
**Figura 03.** Padronização da extração de DNA de *M. leprae* na água.

A **figura 04** mostra o resultado da PCR da extração de DNA de *M. leprae* a partir de amostras de água de casos novos. O resultado foi negativo, visto que não houve bandas com 372pb junto ao *ladder*.



**Figura 04:** Produto da amplificação do DNA de *M. leprae* extraído a partir de amostras de água de casos novos de hanseníase.

A **figura 05** mostra o resultado negativo da PCR para extração de DNA de *M. leprae* a partir de amostras de água dos vizinhos.



**Figura 05.** Produto da amplificação do DNA de *M. leprae* extraído a partir de amostras de água dos vizinhos.

A **figura 06** mostra a reaplicação do teste para extração de DNA de *M. leprae* a partir de amostras de água que não apresentaram bandas específicas.

**Dados das amostras de solo**

01: 50 µL de DNA (Extraído de Sangue Humano)

02: 5 µL de DNA (Extraído de Sangue Humano)

03: 200 µL de Sangue humano

04: 80 µL de Sangue humano

05: 10 µL de Sangue humano

06: Controle positivo para o sangue ( $\beta$ -globina)

07: 50 µL de DNA de *M. leprae* (Extraído de biopsia)

08: 5 µL de DNA de *M. leprae* (Extraído de biopsia)

09: 50 µL de DNA de *M. leprae* (Amplificação 1/2000)

10: 20 µL de DNA de *M. leprae* (Amplificação 1/2000)

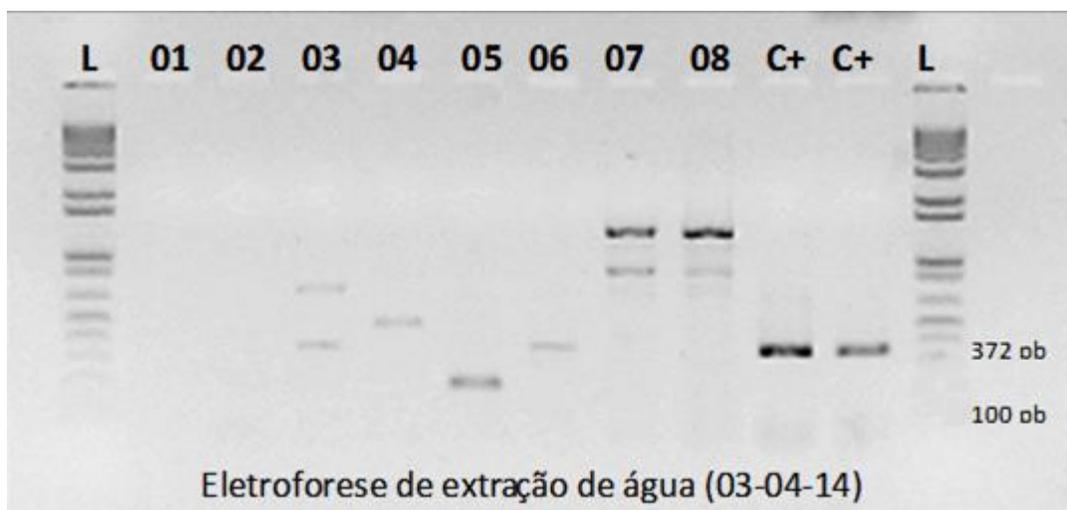
11: 2 µL de DNA de *M. leprae* (Amplificação 1/2000)

C-: Controle negativo (Solo esterilizado)

C+: Controle positivo para *M. leprae* (Extraído de biopsia)

L: Ladder (Marcador de banda)

Obs: controles positivos não foram passados pelo processo de extração junto ao solo.



**Figura 06.** Produto de nova amplificação de DNA de *M. leprae* a partir de amostras de água que apresentaram bandas inespecíficas

## Análises Moleculares de Solo

Para a padronização da extração de DNA do *M. leprae* em solo aplicou-se DNA de sangue humano (01 e 02), sangue humano (03 a 05), biopsia de paciente vichorwiano (07 e 08), e amplificação do DNA do bacilo diluída em 1/2000 (09 a 11) (figura 07). Obteve-se o bandejamento específico com 100pb para  $\beta$ -globina do sangue humano e 372pb para *M. leprae*, além de ambos os controles positivos das amostras.

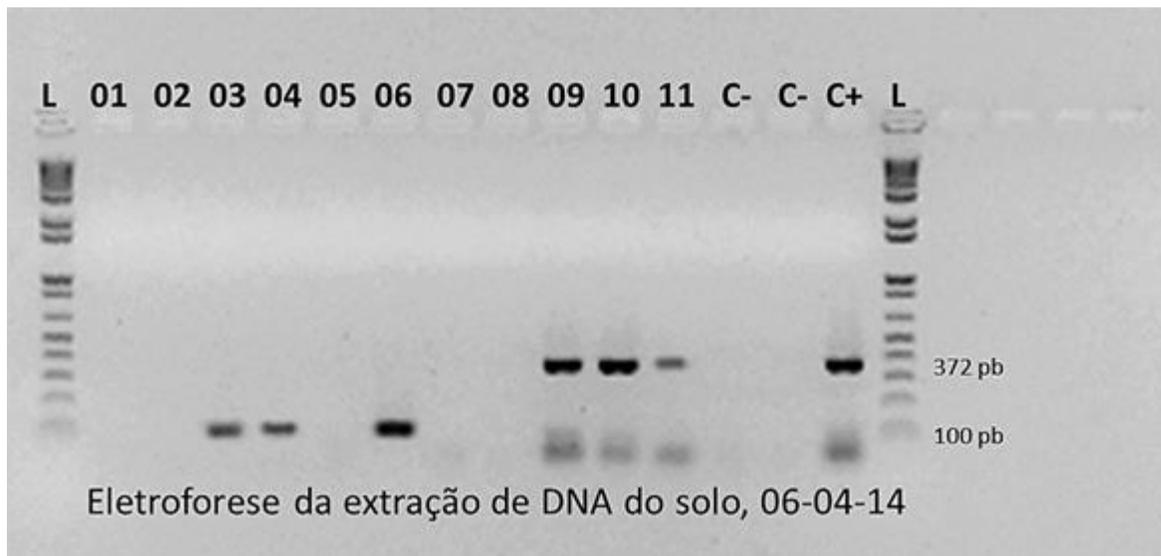
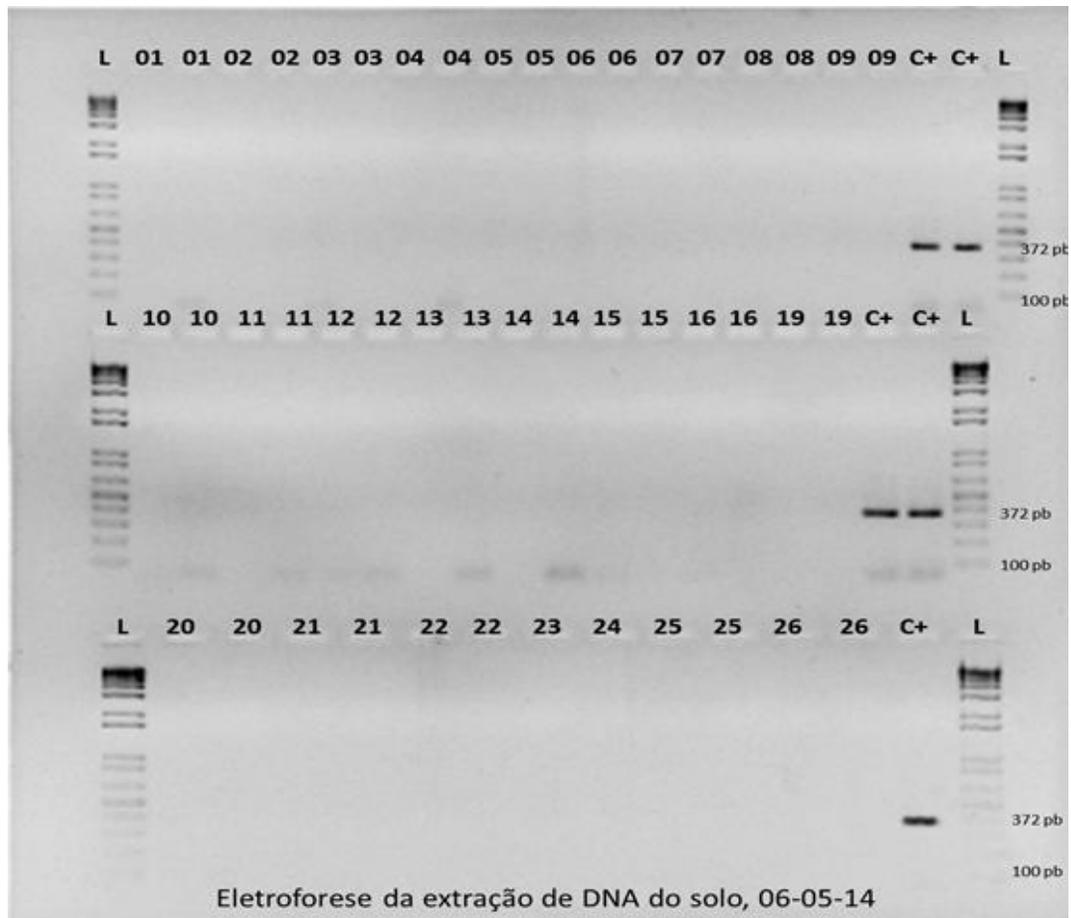
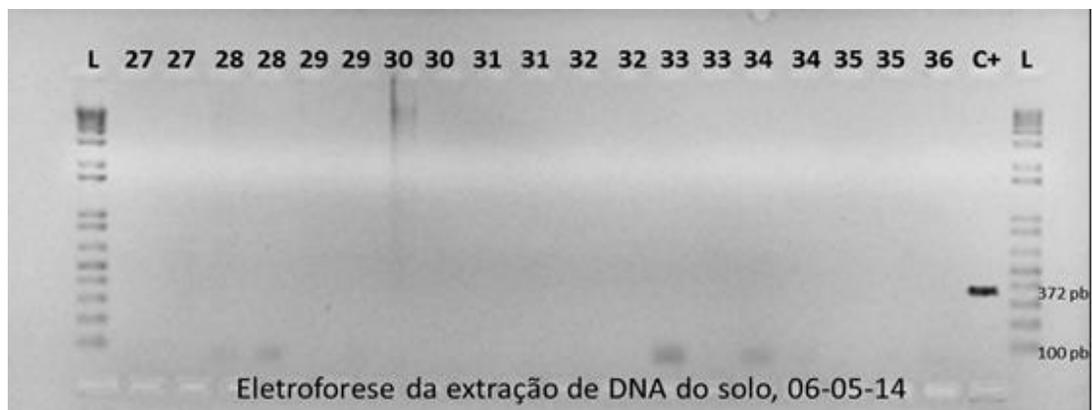


Figura 07. Padronização da extração de DNA do *M. leprae* em solo.

As figuras **08-A** e **08-B** referem-se às amostras de solo dos casos novos de hanseníase. Nestas amostras não apareceram bandas específicas para *M. leprae*.

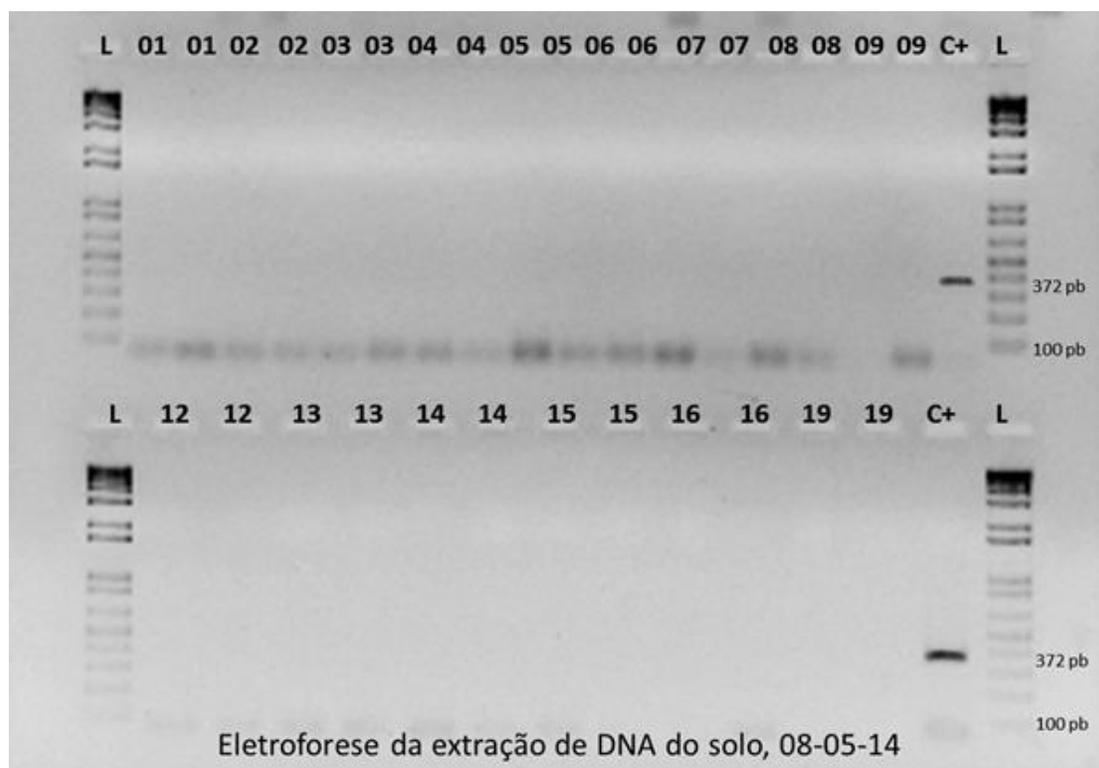


**Figura 08-A.** Produto da amplificação do DNA de *M. leprae* extraído a partir de amostras de solo dos casos novos de hanseníase.

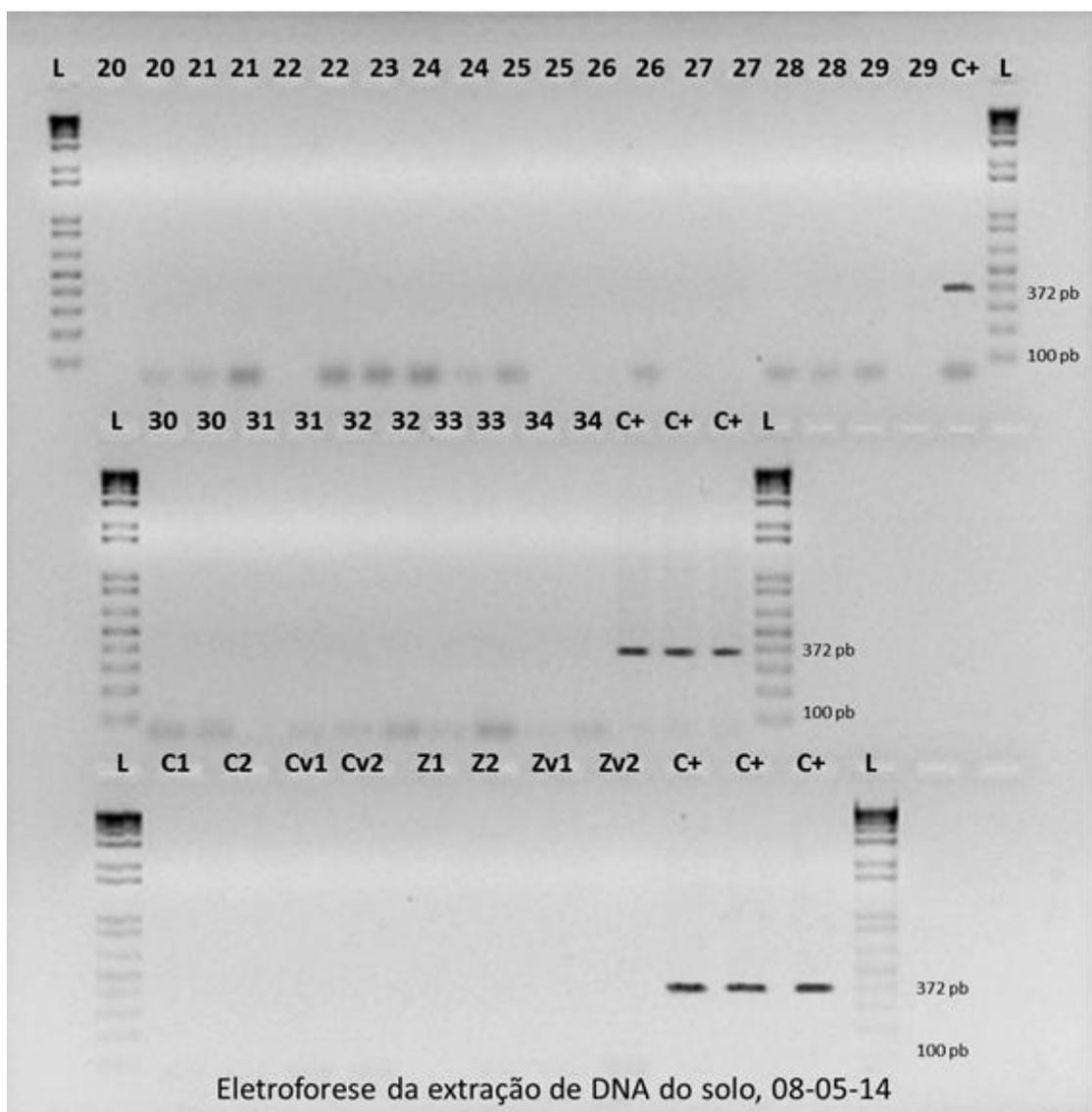


**Figura 08-B.** Produto da amplificação do DNA de *M. leprae* extraído a partir de amostras de solo dos casos novos de hanseníase

As **figuras 09-A e 09-B** referem-se às amostras de solo dos vizinhos dos casos novos de hanseníase. Nestas amostras não são visualizadas bandas específicas para *M. leprae*.



**Figura 09-A.** Produto da amplificação do DNA de *M. leprae* extraído a partir de amostras de solo dos vizinhos de casos novos de hanseníase



**Figura 09-B.** Produto da amplificação do DNA de *M. leprae* extraído a partir de amostras de solo dos vizinhos de casos novos de hanseníase

## DISCUSSÃO

Atualmente existem vários estudos sobre o *Mycobacterium leprae*, porém ainda faltam respostas em relação aos aspectos epidemiológicos da hanseníase, em especial sua transmissão. O contato pessoa-pessoa é o único meio conhecido para a contaminação pelo bacilo, visto que, não há outra forma de contaminação comprovada (WHO, 2012). O ambiente doméstico mostra-se como provável fonte de infecção, visto que, a poliquimioterapia torna o caso não infeccioso em poucas semanas (WHO, 2012).

Truman e Fine (2010) estudaram o ambiente dos pacientes com hanseníase, e dentro de um conjunto de observações sugerem que o bacilo possa ser transmitido de forma indireta. Em conformidade com estudos mais atuais, o presente trabalho teve como foco principal fontes de água e solo nos domicílios de casos novos e vizinhos.

Os autores Cole *et al* (2001) e Davis *et al* (2013) relatam que, o *M. leprae* não pode simplesmente manter-se em reservatórios externos, pois o bacilo mostra-se incapaz de qualquer desenvolvimento fora do hospedeiro.

As condições climáticas dos municípios de Cáceres e Várzea Grande no em Mato Grosso mostram-se ideais para a permanência do *M. leprae* fora do corpo humano, estando entre 26 e 28°C, e umidade relativa do ar em 60%. Estudos de Desikan (1995), Lahiri *et al.* (2005) mostram que temperaturas entre 4°C e 37°C podem manter o bacilo no ambiente por até 45 dias.

Os casos novos de hanseníase residem principalmente nas áreas mais periféricas e de ocupação mais recente dos municípios estudados, usualmente às margens de córregos e rios. Tal fato reforça a hipótese de que os domicílios possam ser marcadores da situação social e econômica dos grupos estudados, conforme descrito por Fine *et al* (1997) na região de Malawi.

Para os municípios estudados, as áreas recentemente habitadas eram casas de programas habitacionais e apropriações de terras devolutas, sendo comum a presença de comunidades de baixa renda. Esta situação também foi descrita por Magalhães e Rojas (2005) ao destacarem que em muitas

comunidades mais carentes, os domicílios, apesar de serem construídos em alvenaria, muitas vezes, estavam em processo de acabamento.

A migração de pessoas vindas de bairros e distritos menos favorecidos era comum, também havendo pessoas de áreas de risco e desapropriações. Os programas habitacionais facilitaram a alocação dessas famílias, ao mesmo tempo cria um estereótipo comum aos casos novos. Em relação à migração, esses grupos populacionais parecem contribuir de modo considerável à introdução do *M. leprae*, assim como relatados nos trabalhos de Kerr-Pontes *et al* (2004) e Lockwood e Suneetha (2005).

Apesar de a endemia estar presente nas áreas mais centrais dos municípios, os migrantes podem estar contribuindo de forma passiva para processo de transmissão da doença. Os autores Matsuoka *et al* (2004) e Misch *et al.* (2010) descreveram em seus achados que a susceptibilidade para adoecer depende de fatores genéticos para o desenvolvimento da doença, mas não para sua transmissão.

Por tratar-se de região mais periférica em municípios, foi relatado pelos entrevistados o aparecimento constante de animais silvestres, como exemplo: capivaras e cotias. Segundo Truman e Fine (2010), é possível que animais silvestres adquiram o bacilo assim como o homem, em especial os tatus do gênero *Dasybus*, também conhecido como “tatu galinha” (DEPS *et al*, 2008; CARDONA-CASTRO, 2009).

O consumo de carne de caça poderia explicar a incidência dos casos novos da doença, porém o baixo consumo desse item alimentar por ambos os grupos pode ser decorrente da faixa urbana em que vivem, ou em razão do acesso limitado ao campo. Baía Júnior (2006) relata em seu trabalho que o consumo de carne de caça é intensificado com o extrativismo de subsistência, contudo, os entrevistados neste trabalho atualmente não usavam essa fonte de alimento.

O modo como os domicílios são isolados do ambiente externos refletem as condições socioeconômicas dos moradores, havendo casas com muros, cercas de madeira ou arame. Havia também residências sem qualquer separação de seus vizinhos, estando passíveis de visitas de animais de outros locais. Estudo de

Kaser *et al.* (2007) mostra que caninos podem infectar-se com micobactérias ambientais, inclusive com *M. ulcerans* que também podendo contaminar humanos.

As casas mais antigas eram muradas, algo que poderia ser um fator limitante para bacilo, visto que, seus vizinhos não tinha qualquer contato com o quintal e não eram doentes. Nas residências era comum aos moradores criar algum tipo de animal doméstico, principalmente cães e gatos. Estes animais são vistos com frequência em faixas de mata nas proximidades, que muitas vezes funcionavam como lixões, mesmo havendo o serviço regular de coleta de lixo.

Os terrenos em grande parte das casas visitadas eram formados por cascalhos e entulhos, em razão de terem sido aterrados a priori para corrigir declives e/ou reduzir a umidade de terras mais baixas, que segundo os moradores ficavam encharcados antes da ocupação. Para o aterramento dos quintais foram utilizados materiais de demolição, normalmente sem procedência, que poderia estar contaminado pelo bacilo, pois não é de todo conhecido o tempo máximo de viabilidade em solo.

Ainda que os domicílios descritos estejam situados em regiões de ocupação recente, a rede de abastecimento de água tem atendimento irregular ou inexistente. Esse fato leva os moradores a buscar outras fontes de água como carros pipa, água mineral, e poços. Os resultados apontados por Barelli (2012) mostram que, o município de Cáceres possui abastecimento de água irregular. Da mesma forma, segundo o DAE-VG (2013) 12% da população de Várzea Grande não tem cobertura da rede de abastecimento.

Em condições favoráveis de altitude e relevo era possível encontrar algumas casas com poços artesanais, porém, com pouco uso de sua água para as atividades domésticas, devido ao abastecimento pela rede pública. Outra importante razão é que para usar água do poço é necessária bomba d'água, o que representa custo com energia elétrica. Os poços presentes nos quintais não eram manilhados, ou tinham qualquer tipo de vedação nas paredes que impedisse que agentes externos entrassem em contato com a água.

Observou-se que 58,3% dos casos novos e 74,2% dos vizinhos não tinham o ensino médio ou superior completo. O baixo nível de escolaridade poderia

influenciar na dispersão do bacilo, visto que, a hanseníase está relacionada à falta de higiene e/ou cuidados com o ambiente doméstico. Nos trabalhos de Feitosa (2008) e Amaral (2008), os entrevistados possuíam nível de escolaridade fundamental incompleto, nesse caso, as chances de um domicílio ter um doente seriam as mesmas para os vizinhos, por apresentar nível de escolaridade semelhante.

Os quintais de ambos os grupos tinham árvores frutíferas que os mantinha sombreados. Outros possuíam quintais totalmente cimentados e cobertos para aproveitar o espaço. As fruteiras mais comuns eram mangueiras, serigueleiras, cajueiros e bananeiras, esta última mais comumente observada às margens dos córregos e áreas mais úmidas dos terrenos, formando-se microclimas que podem potencializar a permanência do bacilo no ambiente.

O contato com fontes de água externa para o lazer teve maior importância de frequência para banho em lagoa, sendo 54,8% para os vizinhos e 2,8% aos casos novos. De acordo com Kerr-Pontes *et al.* (2006) não se tem conhecimento do tempo de exposição a determinadas fontes de água a ponto de identificar o local de contaminação, devido ao longo período para o aparecimento dos sintomas.

As amostras de água da rede pública de abastecimento não mostraram bandas positivas para a presença de *M. leprae* nos testes realizados. Esses resultados mostra a eficiência no tratamento da água a ponto de eliminar possíveis cepas desse bacilo sendo incapaz de ser extraído o DNA com integridade para a sua amplificação por PCR.

De acordo com Picard *et al.* (1992), outro fator que pode interferir na eficiência das sondas utilizadas pode ser a sensibilidade do processo, pois depende da quantidade de bacilos contidos na amostra. Segundo Lahiri *et al.* (2011), o ideal seria  $10^4$  e  $10^8$  de bacilos, podendo ser um pouco menor em amostras de água, visto que, em pesquisas com ratos, obtiveram  $10^5$  como quantidade mínima para infecção pelo bacilo, havendo desenvolvimentos do *M. leprae* em três meses.

Quanto a água dos poços analisados foi possível identificar 2 amostras com banda específicas dentre os 9 poços analisados, correspondendo assim a 22,2% do total. Nos trabalhos de Lavania *et al.* (2006), foram analisados 80 poços d'água em área endêmica de Ghatampur, na Índia, e 34% destes mostraram a presença de *M. leprae* pela técnica de PCR. Os autores concluíram que as chances de infecção pelo *M. leprae* é potencializada para os residentes com PCR positivos.

As amostras de solo de ambos os grupos estudados não apresentaram amplificação pela técnica de PCR. É provável que a ampliação da área de coleta para o interior das residências possa aumentar a probabilidade de verificação do *M. leprae* no ambiente.

Alguns autores como Truman *et al.* (2008), Turankar (2011) e Lahiri *et al.* (2011) concordam em seus trabalhos que, o uso de técnicas de PCR em tempo real torna-se indispensável em análises ambientais para investigar o *M. leprae*, pois pretende-se encontrar organismos viáveis capazes de infectar novos hospedeiros.

O conhecimento das fontes externas de *M. leprae* poderia explicar as reinfecções e os casos novos de hanseníase sem contatos conhecidos com outros doentes. Do mesmo modo, a identificação dos meios mais propícios à manutenção da viabilidade desse microrganismo fora do corpo humano, possibilitaria o planejamento de novas estratégias de enfrentamento deste problema de saúde pública por meio dos órgãos de vigilância à saúde.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O levantamento socioambiental mostrou-se satisfatório não saindo do padrão epidemiológico, visto que havia grande paridade entre os grupos estudados, os vizinhos teriam maiores chances de infectar-se com o bacilo devido ao maior grau de similaridade com hábitos socioculturais e ambientais dos casos novos.

Os resultados de PCR das amostras de água desconsideram as chances do *M. leprae* ser veiculado pela rede de abastecimento mediante ao tratamento. Contudo, algumas amostras de água de poço mostraram bandas específicas para o *Mycobacterium leprae*, que pode representar uma potencial fonte de transmissão do bacilo.

As análises de solo das residências dos casos novos e dos respectivos vizinhos não amplificaram DNA de *M. leprae*. É possível que tais achados tenham sido influenciados pelos locais de coleta, sendo relevante a averiguação do ambiente interno das residências dos pacientes.

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho torna-se necessário ampliar os cuidados da vigilância à saúde quanto ao abastecimento de água feito por poços artesanais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIATY, D. *et al.* **TTC Repeats Variation of Mycobacterium leprae Isolates for Analysis of Leprosy Transmission in Leprosy Endemic Area in East Java, INDONESIA.** Int J Lepr Other Mycobact Dis, North America, p. 65-68, 2010.

ALMEIDA, C. O. S. *et al.* **Potencial erosivo da chuva de Cuiabá, MT: Distribuição e correlação com a precipitação pluviométrica.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental- RBEAA, p. 178–184, 2011.

AMARAL, E. P. **Análise espacial da hanseníase na microrregião de Almenara – Minas Gerais: relações entre a situação epidemiológica e as condições socioeconômicas.** Belo Horizonte, p. 701-707. 2008.

AQUINO, D. M. C. *et al.* **Perfil dos pacientes com hanseníase em área hiperendêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil.** Rev Soc Bras Med Trop, v. 36, p. 57-64, 2003.

BAÍA JÚNIOR, P. C. **Caracterização do Uso Comercial e de Subsistência da Fauna Silvestre no Município de Abaetetuba, PA.** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA. Belém-PA. 2006.

BARELLI, CARLA SIMONE GIOTTO DE ALMEIDA PINA. **Análise Epidemiológica e Ambiental de Diarreias em Cáceres/Mt e a Viabilidade do Uso de Extrato de Própolis como Tratamento.** Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso. 2012.

BRASIL. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. **Manual de prevenção de incapacidades.** Brasília/DF. 2008.

BRASIL, M. D. S. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde.** Série C. Projetos, Programas e Relatórios. Brasília/DF. 2011.

BRASIL, M. D. S. **Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação.** Brasília-DF, p. 44-11. 2013.

BRASIL, M. D. S. **Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano.** Brasília, p. 284. 2006.

BRASIL, M. D. S. **Estratégias do Ministério da Saúde: Doenças negligenciadas.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF, p. 200-2. 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Plano Integrado de Ações Estratégicas de Eliminação da Hanseníase, Filariose, Esquistossomose e Oncocercose**

**como Problema de Saúde Pública, Tracoma Como Causa de Cegueira e Controle das Geohelmintíase.** Brasília-DF. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** IBGE, 15 dez 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>.

CARDONA-CASTRO, N. *et al.* **Detection of Mycobacterium leprae DNA in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Andean region of Colombia.** *Lepr Rev.*, p. 424-31, 2009.

CHILIMA, B. Z. *et al.* **Distribution of Environmental Mycobacteria in Karonga District, Northern Malawi.** *Environ. Microbiol.*, p. 72, 2006.

CIRILLO, J. D. *et al.* **Interaction Of Mycobacterium Avium With Environmental Amoebae Enhances Virulence.** *Infection and Immunity*, p. 3759–3767, 1997.

COLE S.T, *et al.* **Massive gene decay in the leprosy bacillus.** *Nature*, Paris-França, v. 1007, n. 409, p. 11, Fevereiro 2001.

DAVIS, G. L. *et al.* **Molecular assays for determining Mycobacterium leprae viability in tissues of experimentally infected mice.** *PLoS Negl Trop*, p. 7-8, 2013.

DEPARTAMENTO DE ÁGUA E ESGOTO. **Plano Plurianual 2010-2013,** Prefeitura municipal de Várzea Grande-VG. Várzea Grande. 2013.

DEPS, *et al.* **Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study.** *Dermatol Venereol Leprol*, p. 338-42, 2008.

DEPS, P. D.; ANTUNES, J. M.; TOMIMORI-YAMASHITA, J. **Detection of Mycobacterium leprae infection in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) using the rapid ML Flow test.** *Rev Soc Bras Med Trop*, p. 86-70, 2007.

DESIKAN, S. K. V. **Extended studies on the viability of Mycobacterium leprae outside the human body.** *Lepr Rev.*, p. 287-95, 1995.

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

FALKINHAM, J. O.; NORTON, C. D.; LECHEVALLIER, M. W. **Factors Influencing Numbers of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems.** *Microbiol*, p. 1225, 2001.

FEENSTRA, S. G. *et al.* **Acceptability of chemoprophylaxis for household contacts of leprosy patients in Bangladesh: a qualitative study.** *Lepr Rev*, p. 178–187, 2011.

- FEITOSA, A. M. M. **A institucionalização da hanseníase no Ceará: do leprosário de Canafístula ao Centro de Convivência Antônio Diogo.** Ceará. 2008.
- FIGUEROA, S. N.; NOBRE, C. A. **Precipitation distribution over central and Western tropical South America.** *Climanalise*, p. 36–45, 1990.
- FINE, P. E.; STERNE, J. A.; PONNIGHAUS, J. M. **Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi.** *Am J Epidemiol*, p. 91–102, 1997.
- GONÇALVES, S. D.; SAMPAIO, R. F.; ANTUNES, C. M. F. **Fatores preditivos de incapacidades em pacientes com hanseníase.** *Rev Saúde Pública*, p. 267-74, 2009.
- GORMUS, B. J. *et al.* **A Second Sooty Mangabey Monkey with naturally Acquired Leprosy: First Reported Possible Monkey-to-Monkey Transmission.** New Iberia, Louisiana. 1987.
- HALL, R. M.; WHEELER, P. R.; RATLEDGE, C. **Exochelin-mediated iron uptake into *Mycobacterium leprae*.** *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, p. 490-4, 1984.
- IGNOTTI, E.; PAULA, R. C. **Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010.** Brasília/DF. 2011.
- KASER M, RONDINI S, NAEGELI M, STINEAR T, PORTAELS F, *et al.* **Evolution of two distinct phylogenetic lineages of the emerging human pathogen *Mycobacterium ulcerans*.** *BMC Evol Biol* 7: 177. 2007.
- KATO, L. **Water soluble palmitic acid in media for cultivation of leprosy derived psychrophilic mycobacteria from *Mycobacterium leprae* infected tissues.** *Hansen. Int.* 19(1):17-27, jul. 1994.
- KATOCH, V. M. **The contemporary relevance of the mouse foot pad model for cultivating *M. leprae*.** *Lepr Rev*, p. 120–123, 2009.
- 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 Other Mycobact Dis*, p. 1–6, 1980.
- KERR-PONTES, L. R. S. *et al.* **Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study.** *Int J Epidemiol*, p. 262–69, 2004.
- KERR-PONTES, L. R. S. *et al.* **Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study.** *Int J Epidemiol*, p. 994–1000, 2006.

KURABACHEW, M. E. *et al.* **Amplified ribosomal DNA restriction analysis in the differentiation of related species of mycobacteria.** J Microbiol Meth. p. 83–90, 2003.

LAHIRI, R. *et al.* **Development of a Mouse Food Pad Model for Detection of Sub Clinical Leprosy.** Lepr Rev, p. 432–444, 2011.

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

LAHIRI, R.; RANDHAWA, B.; KRAHENBUHL, J. **Application of a viability-staining method for Mycobacterium leprae derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad.** Journal of Medical Microbiology , p. 235–242, 2005.

LAVANIA, M. *et al.* **Detection of Mycobacterium leprae DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences.** Int J Lepr Other Mycobact Dis (ICMR), J Commun Dis, p. 269-73, 2006.

LAVANIA, M. *et al.* **Detection of viable Mycobacterium leprae in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy.** Infect. Genet, p. 627–631, 2008.

LEVY, L.; JI, B. **The mouse foot-pad technique for cultivation of Mycobacterium leprae.** Lepr Rev, p. 5–24, 2006.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA,. **Hanseníase: uma doença muito complexa para um paradigma simples de eliminação.** Boletim da Organização Mundial da Saúde, p. 230, 2005.

LOUGHRY, W. J. *et al.* **Is Leprosy Spreading among Nine-banded Armadillos in the Southeastern United States?.** J Wildlife Dis, p. 144–152, 2009.

MAGALHÃES MCC, ROJAS LI. **Evolución de la endemia de la lepra en Brasil.** Rev. Bras. Epidemiol, 8(4): 342-355. 2005.

MARTELLI, C. M. T.; *et al.* **Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase.** Rev. Bras. Epidemiol, p. 3-5, 2002.

MARTINEZ, A. N. *et al.* **Molecular Determination of Mycobacterium leprae Viability by Use of Real-Time PCR.** Microbiol, p. 2124, 2009.

MATSUOKA, M. *et al.* **Genotyping of Mycobacterium leprae on the Basis of the Polymorphism.** Clin. Microbiol, p. 741–745, 2004.

MEIMA, A. *et al.* **Disappearance of leprosy from Norway: an exploration of critical factors using an epidemiological modelling approach.** Int. J. Epidemiol., p. 991-1000, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Manual de prevenção de incapacidades.** Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.

MISCH, E. A. *et al.* **Leprosy and the Human Genome.** Departments of Medicine and Dermatology. University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington, Seattle, Washington, p. 589–620, 2010.

NEVES, S. M. A.; NUNES, M. C. M.; NEVES, R. J. **Caracterização das Condições Climáticas de Cáceres/Mtbrasil, no Período de 1971 A 2009. Subsídio às Atividades Agropecuárias e Turísticas Municipais.** Goiânia: B.goiano.geogr. 2011. p. 55-68.

OPROMOLLA, P. A.; LAURENTI, R. **Controle da hanseníase no Estado de São Paulo: análise Histórica.** Rev Saude Publica, p. 195-203, 2011.

PARASHAR, D. *et al.* **Identification of environmental mycobacteria isolated from Agra, north India by conventional e molecular approaches.** Agra, India. 2007.falta pagina

PEDRINI, S. C. *et al.* **Search for Mycobacterium leprae in wild mammals.** Braz J Infect Dis, p. 47–53, 2010.

PICARD, C. *et al.* **Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction.** Environ. Microbiol, p. 2717-2722, 1992.

PONTES, A. R. B. *et al.* **Detecção do DNA de Mycobacterium leprae em secreção nasal.** Rev Bras Enferm, p. 734-7, 2008.

REES, R. J. W.; MCDUGALL, A. C. **Airborne Infection with Mycobacterium leprae in Mice.** MED. Microeil, p. 10, 1977.

RODINI F. C. B., M. GONÇALVES, A. R. S. B. BARROS *et al.* **Prevenção de incapacidade na hanseníase com apoio em um manual de autocuidado para pacientes.** Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo, v.17, n.2, p.157-66, abr/jun. 2010.

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

SCOLLARD, D. M. *et al.* **The continuing challenges of leprosy.** Clin Microbiol Rev, p. 338–381, 2006.

TRUMAN, R. **Leprosy in wild armadillos.** Lepr. Rev., p. 198–208, 2005.

TRUMAN, R. W. *et al.* **Enumeration of Mycobacterium leprae Using Real-Time PCR.** PLoS Negl. Trop Dis, p. 11, 2008.

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

TURANKAR, R. P. *et al.* **Dynamics of Mycobacterium leprae transmission in environmental context: deciphering the role of environment as a potential reservoir.** Infect Genet Evol., p. 121-6, 2011.

VIETH, H. ; VIRMOND, M. **Prevenção de Incapacidades na Hanseníase: Uma Análise Crítica. Simpósio: HANSENÍASE.** Ribeirão Preto: [s.n.]. 1997. p. 358-363.

WAHYUNI, R. *et al.* **Mycobacterium leprae in Daily Water Resources of Inhabitants Who Live in Leprosy Endemic Area of East Java.** Int J Lepr Other Mycobact Dis, v. 1, n. 2, p. 65-68., agosto 2010.

WHAN, L.; GRANT, I. R.; ROWE, M. T. **Interaction between Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and environmental protozoa.** BMC Microbiolog, Northern Ireland-UK, v. 6, p. 63, julho 2006.

YOON, K. H. *et al.* **Evaluation of polymerase chain reaction amplification of Mycobacterium leprae-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients.** J Clin Microbiol, Seoul, Korea, v. 9, n. 895, p. 31, April 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Enhanced Global Strategy for Further Reducing the Disease Burden due to Leprosy (Plan Period: 2011-2015).** New Delhi 110 002, India, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multidrug therapy against leprosy, Development and implementation over the past 25 years.** Geneva, Switzerland, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leprosy situation, 2012.** Wkly Epidemiol Rec.; 87:317-28. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Relevé épidémiologique hebdomadaire.** Wkly Epidemiol Rec. No. 34, 87, 317–328. 2012. 15 dez 2013. Disponível em <<http://www.who.int/wer>>

**ANEXOS**

## FICHA DO SINAN / HANSENÍASE

República Federativa do Brasil  
Ministério da Saúde

**SINAN**  
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO  
FICHA DE NOTIFICAÇÃO/ INVESTIGAÇÃO **HANSENÍASE**

Nº

**Caso confirmado de Hanseníase:** pessoa que apresenta uma ou mais das seguintes características e que requer poliquimioterapia:  
- lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo (s) com espessamento neural; baciloscopia positiva.

<b>Dados Gerais</b>	1	Tipo de Notificação		2 - Individual			
	2	Agravado/doença		<b>HANSENÍASE</b>			
	3	Data da Notificação		Código (CID10) A 3 0 . 9			
<b>Dados Gerais</b>	4	UF	5	Município de Notificação	Código (IBGE)		
	6	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7	Data do Diagnóstico	
<b>Notificação Individual</b>	8	Nome do Paciente			9	Data de Nascimento	
	10	(ou) Idade	11	Sexo M - Masculino <input type="checkbox"/> F - Feminino <input type="checkbox"/> 1 - Ignorado	12	Gestante	
	13	Raça/Coi				14	Escolaridade
	15	Número do Cartão SUS		16	Nome da mãe		
	17	UF	18	Município de Residência	19	Distrito	
<b>Dados de Residência</b>	20	Bairro		21	Logradouro (rua, avenida,...)		
	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)		24	Geo campo 1
	25	Geo campo 2		26	Ponto de Referência		
	27	CEP					
	28	(DDD) Telefone	29	Zona	30	País (se residente fora do Brasil)	
	31	Nº do Prontuário		32	Ocupação		
<b>Dados Clínicos</b>	33	Nº de Lesões Cutâneas		34	Forma Clínica		
	35	Classificação Operacional		36	Nº de Nervos afetados		
<b>Atendimento</b>	37	Avaliação do Grau de Incapacidade Física no Diagnóstico					
	38	Modo de Entrada					
	39	Modo de Detecção do Caso Novo					
<b>Dados Lab.</b>	40	Baciloscopia					
<b>Tratamento</b>	41	Data do Início do Tratamento		42	Esquema Terapêutico Inicial		
	43	Número de Contatos Registrados					
<b>Observações adicionais:</b>							
<b>Investigador</b>	Município/Unidade de Saúde				Código da Unid. de Saúde		
	Nome			Função		Assinatura	
	Hanseníase			Sinan NET		SVS 30/10/2007	



UNIVERSIDADE DO ESTADO  
DE MATO GROSSO - UNEMAT



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** MYCOBACTERIUM LEPRAE NA ÁGUA E SOLO EM RESIDÊNCIAS DE MUNICÍPIOS NO PANTANAL MATOGROSSENSE

**Pesquisador:** Élderson Mariano  
de Souza Valois

**Versão:** 2

**CAAE:** 13632213.0.0000.5166

**Instituição Proponente:** Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:**

353.863 **Datas da**

**Relatoria:**

08/08/2013

### **Apresentação do Projeto:**

O projeto pretende fazer um levantamento quanto a presença de Mycobacterium leprae no ambiente peridomiciliar de pacientes que apresentaram diagnóstico recente, pretende investigar mais enfaticamente a água e o solo.

### **Objetivo da Pesquisa:**

Analisar a presença do Mycobacterium leprae viável em água de consumo humano e no solo peridomiciliar em municípios no Pantanal matogrossense.

Analisar a presença do M. leprae em fontes de água para consumo na residência de casos novos de hanseníase e residências circunvizinhas; Analisar a presença

de M. leprae no solo de peridomicílio de casos novos de hanseníase e de vizinhança; Verificar o percentual de positividade de M. leprae das amostras de água e solo coletados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos de constrangimento e contaminação foram satisfatoriamente esclarecidos. Não havendo mais riscos a serem elencados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto possui revisão teórica e metodologias adequadas para atingir os objetivos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os TCLEs e Autorização da Secretaria de Saúde do Município de Cáceres foram apresentados de forma adequada. Os TCLEs foram encaminhados devidamente assinados.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há impedimentos para realização do projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não



UNIVERSIDADE DO ESTADO  
DE MATO GROSSO - UNEMAT



Continuação do Parecer: 353.863

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

CACERES, 08 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Fernando Cezar Vieira**  
**Malange (Coordenador)**

**Endereço:** Av. Tancredo Neves, 1095

**Bairro:** Cavahada II

**CEP:** 78.200-000

**UF:** MT

**Município:** CACERES

**Telefone:** (65)3221-0081

**Fax:** (65)3222-3908

**E-mail:** [cep@unemat.br](mailto:cep@unemat.br) Página 02 de 02

**APENDICE**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EM ÁGUA E SOLO,  
MATO GROSSO, BRASIL**

**QUESTIONÁRIO I (Pacientes)**

	Data da entrevista: ____/____/____	Número: _____
--	------------------------------------	---------------

Nome: _____	
Endereço para contato: _____	Fone: _____
Município: _____	CEP: _____
E-mail: _____	Fone para contato: _____
Grau de parentesco: _____	

IDENTIFICAÇÃO		
Q1	Sexo:	1. Masculino                      2. Feminino
Q2	Data de nascimento:	____/____/____                      Idade: _____
Q3	Raça:	1. Branca 2. Negra 3. Parda 4. Amarela 5. Indígena 6. Sem Informação
Q4	Situação Trabalhista atual:	Ocupação: _____ Tempo: _____
Q5	Situação Trabalhista anterior ao diagnostico:	Ocupação: _____ Tempo: _____
Q6	Escolaridade:	1. Sem escolaridade 2. Ensino Fundamental (2.1 incompleto 2.2 completo) 3. Ensino Médio (3.1 incompleto 3.2 completo) 4. Superior 5. S.I
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS GERAIS		
Q7	Nos últimos 10 anos já morou em outro endereço que não o atual?	1. Sim 2. Não 3. Não se aplica 4. Não sabe 5. S.I.
Q8	Em outra cidade?	1. Sim 2. Não 3. Não se aplica 4. Não sabe 5. S.I. 1.1 Anos: _____ Cidade: _____ UF: _____ 1.2 Anos: _____ Cidade: _____ UF: _____
Q9	Qual a situação do local onde você mora?	1. Alugado 2. Casa própria 3. Abrigo 4. Sem teto 5. Cedida 6. Não sabe 7. S.I.
Q10	Qual o tipo de abastecimento de água da sua residência?	1. Rede 2. Poço 3. Poço e Rede 4. Córrego 5. Não sabe 6. S.I. 6. Outros Quais? : _____
Q11	O esgoto da sua casa é do tipo:	1. Fossa Séptica 2. Fossa rudimentar 3. Céu aberto 4. Rede pública 5. Não sabe 6. S.I.
Q12	A casa do (a) senhor (a) tem quantos cômodos (considerar apenas quarto e sala):	1. Não se aplica 2. Não sabe 3. S.I.
Q13	Quantas pessoas moram na casa?	N: _____
Q14	Alguém na residência teve ou tem a doença que o (a) senhor (a)?	1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar 4. S.I.

Q15	Quando ele (a) foi diagnosticado (a)?	1. Ano: ____/____/____ 2. Não se aplica 3. Não sabe 4. S.I.
Q16	Ele (a) fez o tratamento completo?	1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar 4. S.I.
Q17	Qual o esquema terapêutico?	1. PQT/PB 2. PQT/MB 3. Não se aplica 4. Não sabe 5. S.I. 6. Outros especificar: _____
Q18	Nos últimos 10 anos conviveu com alguém que tinha a doença?	1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar 4. S.I.
Q19	Quem foi?	1. Filho 2. Esposo 3. Irmão 4. Avô 5. Tio 6. Pai 7. Mãe 8. Cunhado 9. Outros especificar: _____
<b>CONTATOS COM ANIMAIS DOMESTICOS E SILVESTRES</b>		
Q20	O senhor come carne de caça?	1. Sim, especificar: _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q21	Faz quanto tempo que o senhor (a) tem comido essa carne?	Tempo: _____
Q22	O senhor (a) ou alguém da residência já teve amebíase/giardíase?	1. Sim, quem: _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q23	Os cães/gatos do vizinho entra no seu quintal?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q24	O senhor (a) já foi mordido por algum cachorro?	1. Sim, a quanto tempo? _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q25	O senhor (a) já foi arranhado por algum gato?	1. Sim, a quanto tempo? _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q26	Possui animais domésticos?	1. Sim, qual/quais _____ 2. Não 3. Já teve, qual/quais _____ 4. S.I.
<b>ATIVIDADES SOCIAIS E LAZER</b>		
Q27	Qual atividade social costuma praticar?	1. Jogos esportivos 2. Cultos religiosos 3. Club/bar 4. Não se aplica 5.S.I. 6. Outros quais? _____
Q28	Para o lazer aquático costuma frequentar:	1. Piscina 2. Córrego 3. Rio 4. Lagoa 5. Represa 6. Não se aplica 7. S.I. Local: _____ Frequência: _____
Q29	O senhor (a) pratica pescaria?	1. Sim 2. Não 3 Não se aplica 4. S.I.
Q30	Costuma fazer acampamento com família/amigos?	1. Sim 2. Não 3. Não se aplica 4. S.I. Se a resposta for <b>sim</b> que local? _____
Q31	Com que frequência visita os vizinhos?	1. Sempre 2. Às vezes 3. Raramente 4. Nunca 5. Não sabe informar 6. S.I.
Q32	O senhor (a) toma	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.

	tereré/chimarrão em grupo?	
Q33	O senhor (a) costuma passar tempo sob a sombra de uma árvore?	1. Sim 2. Não 3. Não se aplica 4. S.I. Se a resposta for <b>sim</b> que árvore? _____
<b>ATIVIDADES DOMESTICAS E HIGIENE</b>		
Q34	Qual a água que utiliza para beber:	1. Torneira da cozinha 2. Poço 3. Água mineral 4. Não sabe 5. S.I. 6. Outros especificar: _____
Q35	Costuma molhar o quintal?	1. Sim 2. Não Se sim, com que água: _____
Q36	Pratica jardinagem/horticultura no quintal?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q37	Como o seu quintal é cercado?	1. Madeira 2. Tijolos 3. Arame liso/farpado 4. Tela de arame 5. Cerca viva 6. Sem cercado 7. Não se aplica
Q38	Quando chove o quintal fica alagado ou com poças d'água por mais de 01 dia?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q39	O senhor (a) anda descalço no quintal/casa?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q40	Algum lugar no quintal é acumulado lixo doméstico?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q41	Consome alguma fruta produzida no quintal?	1. Sim, qual? _____ 2. Não 3. Não se aplica 4. S.I.
Q42	Costuma lavar frutas e legumes antes de consumir?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q43	Costuma comer em restaurantes?	1. Sim 2. Não 3. Raramente 4. S.I.
Q44	Quais legumes consome com mais frequência?	1. Sim, qual/quais? _____ 2. Não 3. Não sabe informar 4. S.I.

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EM ÁGUA E SOLO,  
MATO GROSSO, BRASIL**

**QUESTIONÁRIO II (Vizinhos)**

Data da entrevista: ____/____/____	Número: _____
------------------------------------	---------------

Nome: _____	
Endereço para contato: _____	Fone: _____
Município: _____	CEP: _____
E-mail: _____	Fone para contato: _____
Grau de parentesco: _____	

IDENTIFICAÇÃO		
Q1	Sexo:	1. Masculino      2. Feminino
Q2	Data de nascimento: ____/____/____	Idade: _____
Q3	Raça:	1. Branca    2. Negra    3. Parda    4. Amarela    5. Indígena    6. Sem Informação
Q4	Situação Trabalhista atual	Ocupação: _____ Tempo: _____
Q5	Situação Trabalhista anterior	Ocupação: _____ Tempo: _____
Q6	Escolaridade:	1. Sem escolaridade    2. Ensino Fundamental (2.1 incompleto 2.2 completo) 3. Ensino Médio (3.1 incompleto 3.2 completo)    4. Superior    5. S.I
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS GERAIS		
Q7	Nos últimos 10 anos já morou em outro endereço que não o atual?	1. Sim    2. Não    3. Não se aplica    4. Não sabe    5. S.I.
Q8	Em outra cidade?	1. Sim    2. Não    3. Não se aplica    4. Não sabe    5. S.I. 1.1 Anos: _____ Cidade: _____ UF: _____ 1.2 Anos: _____ Cidade: _____ UF: _____
Q9	Qual a situação do local onde você mora?	1. Alugado    2. Casa própria    3. Abrigo    4. Sem teto    5. Cedida 6. Não sabe    7. S.I.
Q10	Qual o tipo de abastecimento de água da sua residência?	1. Rede    2. Poço    3. Poço e Rede    4. Córrego    5. Não sabe    6. S.I. 6. Outros Quais? : _____
Q11	O esgoto da sua casa é do tipo:	1. Fossa Séptica    2. Fossa rudimentar    3. Céu aberto    4. Rede pública    5. Não sabe    6. S.I.
Q12	Quantas pessoas moram na casa?	N: _____
Q13	A casa do (a) senhor (a) tem quantos cômodos (considerar apenas quarto e sala) :	1. Não se aplica    2. Não sabe    3. S.I.
CONTATOS COM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES		

Q14	O senhor come carne de caça?	1. Sim, especificar: _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q15	Faz quanto tempo que o senhor (a) tem comido essa carne?	Tempo: _____
Q16	O senhor (a) ou alguém da residência já teve amebíase/giardíase?	1. Sim, quem: _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q17	Os cães/gatos do vizinho entra no seu quintal?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q18	O senhor (a) já foi mordido por algum cachorro?	1. Sim, a quanto tempo? _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q19	O senhor (a) já foi arranhado por algum gato?	1. Sim, a quanto tempo? _____ 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q20	Possui animais domésticos?	1. Sim, qual/quais _____ 2. Não 3. Já teve 4. S.I.
<b>ATIVIDADES SOCIAIS E LAZER</b>		
Q21	Qual atividade social costuma praticar?	1. Jogos esportivos 2. Cultos religiosos 3. Club/bar 4. Não se aplica 5.S.I. 6. Outros quais? _____
Q22	Para o lazer aquático costuma frequentar:	1. Piscina 2. Córrego 3. Rio 4. Lagoa 5. Represa 6. Não se aplica 7. S.I. Local: _____ Frequência: _____
Q23	O senhor (a) pratica pescaria?	1. Sim 2. Não 3 Não se aplica 4. S.I.
Q24	Costuma fazer acampamento com família/amigos?	1. Sim 2. Não 3. Não se aplica 4. S.I. Se a resposta for <b>sim</b> que local? _____
Q25	Com que frequência visita os vizinhos?	1. Sempre 2. Às vezes 3. Raramente 4. Nunca 5. Não sabe informar 6. S.I
Q26	O senhor (a) toma tereré/chimarrão em grupo?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q27	O senhor (a) costuma passar tempo sob a sombra de uma árvore?	1. Sim 2. Não 3. Não se aplica 4. S.I. Se a resposta for <b>sim</b> que árvore? _____
<b>ATIVIDADES DOMESTICAS E HIGIENE</b>		
Q28	Qual a água que utiliza para beber:	1. Torneira da cozinha 2. Poço 3. Água mineral 4. Não sabe 5. S.I. 6. Outros especificar: _____
Q29	Costuma molhar o quintal?	1. Sim 2. Não Se sim, com que água: _____
Q30	Pratica jardinagem/horticultura no quintal?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.

Q31	Como o seu quintal é cercado?	1. Madeira 2. Tijolos 3. Arame liso/farpado 4. Tela de arame 5. Cerca viva 6. Sem cercado 7. Não se aplica
Q32	Quando chove o quintal fica alagado ou com poças d'água por mais de 01 dia?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q33	O senhor (a) anda descalço no quintal/casa?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q34	Algum lugar no quintal é acumulado lixo doméstico?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q35	Consome alguma fruta produzida no quintal?	1. Sim, qual? _____ 2. Não 3. Não se aplica 4. S.I.
Q36	Costuma lavar frutas e legumes antes de consumir?	1. Sim 2. Não 3 Não sabe informar 4. S.I.
Q37	Costuma comer em restaurantes?	1. Sim 2. Não 3. Raramente 4. S.I.
Q38	Quais legumes consome com mais frequência?	1. Sim, qual/quais? _____ 2. Não 3. Não sabe informar 4. S.I.