



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

---



**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM GENES  
ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA  
MEDICAMENTOSA DE  
*Mycobacterium leprae***

**MATILDE DEL CARMEN CONTRERAS MEJÍA**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**MATILDE DEL CARMEN CONTRERAS MEJÍA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM GENES  
ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA  
MEDICAMENTOSA DE  
*Mycobacterium leprae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. LUCIA DE PAULA**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2013**

## **Dedicatória**

Este trabalho é para ela, “mi ángel”.  
Porque quando soube que tinha conseguido,  
foi seu rosto o primeiro que vi.  
Você é o motor da minha vida.  
Para você Lara.

Para meu esposo, pela paciência, o apoio  
e por segurar à família nestes meses,  
para minha família que mesmo longe  
continuam me apoiando e acreditando em mim.

## **Agradecimentos**

**À Deus**, por me abençoar colocando o momento e as pessoas certas no meu caminho.

A minha orientadora, **Dra. Lucia de Paula**, por me incentivar a começar esta jornada e me acompanhar nela e pelas oportunas instruções.

A **Dra. Bruna Carvalho**, ao **Dr. Rodrigo Caruso** e o **Dr. Felipe Naveca** pela confiança abrindo às portas nesta cidade, mesmo sem me conhecer.

A meus queridos amigos, **Isabella Passos**, **Maísa Porto** e **George da Silva** pela ajuda incondicional, parceria e por compartilhar os momentos bons e ruins do processo.

Aos amigos da Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta, **André**, **Daniel**, **Cynthia**, **Marlon** pelo apoio e colaboração no laboratório quando precisei.

A **Fundação Alfredo da Matta**, pela oportunidade de desenvolver o projeto e disponibilizar a infraestrutura para tal finalidade.

A **Dra. Maria da Graça Souza Cunha**, pelas sugestões, as informações e a valiosa colaboração na culminação de meu projeto.

Ao **Departamento de Epidemiologia** da Fundação Alfredo da Matta, pelo valioso auxílio na pesquisa dos prontuários, principalmente ao subgerente de informação em saúde **Jamile Lopes Junior**.

Aos professores do **Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada**, pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

A **turma 2011** do **PPGIBA**, por compartilhar a jornada.

A meus amigos, principalmente **Angélica Guzmán**, quem não me abandona nem mesmo longe e segura meus momentos de crise.

A **CAPES**, **CNPq** e **FAPEAM**, pelo apoio financeiro no projeto e na minha formação.

## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Os esforços globais no controle da hanseníase incluindo a poliquimioterapia (PQT) que consiste na combinação dos fármacos: rifampicina, dapsona e clofazimina têm levado à significativa redução na detecção de casos novos nos últimos anos. A atual estratégia para o controle da hanseníase está embasada principalmente na PQT e pretende prevenir o surgimento, a transmissão e a disseminação de cepas resistentes de *M. leprae*. Atualmente, sabe-se que mutações no gene *folp1* de *M. leprae* resultam em resistência à dapsona. Mutações no gene *rpoB* são responsáveis pela resistência à rifampicina. Mutações no gene *gyrA* são correlacionadas com resistência às fluoroquinolonas. O objetivo deste estudo foi identificar mutações nos genes *folp1*, *gyrA* e *rpoB* do *M. leprae* de pacientes com hanseníase atendidos no centro de referência de doenças dermatológicas no estado do Amazonas, Brasil. Neste trabalho foram utilizadas técnicas da Biologia Molecular incluindo Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), *Leprosy Drug Susceptibility-DNA microarray* (LSD-DA) e sequenciamento de DNA. Com o LSD-DA foram identificadas duas mutações no gene *rpoB* em dois diferentes amostras. Através do sequenciamento de DNA foram detectadas quatro mutações no gene *folp1*, cinco mutações no gene *gyrA* e seis mutações no gene *rpoB*. Nestes dados incluem-se duas amostras com mutações nos genes *gyrA* e *rpoB*, indicando multidroga resistência. Resistência primária e secundária foi confirmada usando LDS-DA e sequenciamento de DNA em amostras de raspados dérmicos de pacientes com hanseníase, mostrando a disseminação de cepas resistentes de *M. leprae* nesta área do Brasil e a importância de avaliar o tratamento nestes pacientes para prevenir a disseminação de bacilos resistentes na hanseníase.

**Palavras chave:** Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Resistência; Mutações; Poliquimioterapia.

## ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Worldwide efforts to control leprosy with multidrug therapy (MDT), which is a combination of the drugs rifampin, dapsone and clofazimine, have led to a significant reduction in the detection of new cases in recent years. The current control measure for treating leprosy based mainly in MDT is designed to prevent the emergence, transmission and spread of resistant strains of *M. leprae*. Although resistance has been reported since 1964 to dapsone, since 1976 to rifampin and since 1994 to ofloxacin, determining the prevalence of drug resistance was made possible only with the advent of molecular biology techniques. It is known that mutations in the *folp1* gene result in dapsone resistance. Mutations in the *rpoB* gene are responsible for rifampin resistance. Mutations in the *gyrA* gene are associated with fluoroquinolone resistance. The aim of this study was to identify mutations in the *folp1*, *gyrA* and *rpoB* genes of *M. leprae* from leprosy patients being treated at a reference center of dermatologic diseases in the state of Amazonas, Brazil. We utilized molecular biology techniques including conventional Polymerase Chain Reaction (PCR), Leprosy Drug Susceptibility-DNA microarray (LDS-DA) and DNA sequencing. Using the LDS-DA test two mutations in the *rpoB* gene were observed in two different samples. These mutations were confirmed by DNA sequencing. Through DNA sequencing four mutations in the *folp1* gene five mutations in the *gyrA* gene and six mutations in the *rpoB* gene were detected. This included two samples that had mutations in both the *gyrA* and *rpoB* genes, indicating multidrug resistance (MDR). Primary and secondary drug resistance was confirmed using LDS-DA analysis and DNA sequencing in slit skin smear specimens obtained from leprosy patients, showing the spread of resistant strains of *M. leprae* in this area of Brazil and the importance to vary the treatment in these leprosy patients to prevent the dissemination of resistant leprosy bacilli.

**Key words:** Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Resistant; Mutations; Multidrug therapy.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente.

BB, HBB: Hanseníase borderline.

BL, HBL: Hanseníase borderline lepromatoso.

BT, HBT: Hanseníase borderline tuberculoide.

DDS: Diaminodifenil sulfona.

DPHS: enzima diidropteroato sintase.

DRDR: Regiões determinantes de resistência às drogas.

ENH :Eritema Nodoso Hansênico .

FUAM: Fundação Alfredo da Matta.

HT, TT: Hanseníase tuberculoide.

IB: Índice bacteriológico.

LL, HL ou HV: Hanseníase lepromatosa.

LDS-DA: *Leprosy Drug Susceptibility-DNA microarray*

MB: Multibacilar.

MDR: Multidroga resistente.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PABA: Ácido Para-Aminobenzoico

PB: Paucibacilar.

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

PQT: Poliquimioterapia.

ROM: Regime rifampicina, ofloxacina e minociclina.

SLPB: Lesão única em Paucibacilar(*Single Lesion Paucibacillary*).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Nº Figura</b>	<b>Descrição</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Prevalência da hanseníase, Brasil 2011.	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	Coeficiente de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes no Brasil, no período 2001-2010.	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	Detecção de casos de hanseníase no interior do Estado do AM, período de 1989-2011.	<b>22</b>
<b>Figura 4</b>	Índice de detecção de hanseníase nas regiões do Estado do AM, 2011.	<b>23</b>
<b>Figura 5</b>	Relação de casos novos de hanseníase e grau II de incapacidade, no Estado do Amazonas, 1998-2011.	<b>25</b>
<b>Figura 6A</b>	Mutações associadas nos genes do <i>M. leprae</i> que conferem resistência medicamentosa à dapsona.	<b>41</b>
<b>Figura 6B</b>	Mutações associadas nos genes do <i>M. leprae</i> que conferem resistência medicamentosa à rifampicina.	<b>41</b>
<b>Figura 6C</b>	Mutações associadas nos genes do <i>M. leprae</i> que conferem resistência medicamentosa às quinolonas.	<b>42</b>
<b>Figura 7A</b>	Sequências de oligonucleotídeos na lâmina de microarranjos de DNA (LDS-DA) e as mutações associadas com resistência dos três genes.	<b>44</b>
<b>Figura 7B</b>	Distribuição das sequências ( <i>spots</i> ) no microarranjo de DNA (LDS-DA).	<b>45</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Nº Tabela</b>	<b>Descrição</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b>	Prevalência no primeiro trimestre de 2012 e taxa de novos casos em 2011.	<b>17</b>
<b>Tabela 2</b>	Tendência de detecção de novos casos de hanseníase fornecidos pela OMS, 2004-2011.	<b>18</b>
<b>Tabela 3</b>	Descrição dos volumes e reagentes utilizados na PCR-Kai.	<b>50</b>
<b>Tabela 4</b>	Descrição dos volumes e reagentes utilizados no <i>Nested</i> PCR.	<b>51</b>
<b>Tabela 5</b>	Descrição dos volumes e reagentes utilizados na PCR-Matsuoka.	<b>53</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 Hanseníase.....	14
2.2 Classificação da hanseníase .....	15
2.3 Prevalência da hanseníase .....	16
2.4 Diagnóstico da hanseníase .....	28
2.5 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	31
2.6 Tratamento poliquimioterápico (PQT).....	32
2.6.1 Dapsona .....	34
2.6.2 Rifampicina .....	35
2.6.3 Ofloxacina .....	35
2.6.4 Clofazimina .....	35
2.6.5 Claritromicina .....	35
2.6.6 Minociclina .....	36
2.7 Resistência medicamentosa.....	36
2.7.1 Resistência à dapsona .....	38
2.7.2 Resistência à rifampicina.....	39
2.7.3 Resistência à ofloxacina.....	40
2.8 Diagnóstico de resistência às drogas.....	42
2.8.1 Método de Shepard .....	42
2.8.2 LDS-DA Método de microarranjos de DNA .....	43
2.8.3 Sequenciamento de DNA .....	45
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 Geral: .....	47
3.2 Específicos:.....	47
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>48</b>
4.1 Modelo do estudo .....	48
4.2 Informações éticas.....	48
4.3 Universo de estudo .....	48
4.3.1 População de estudo.....	48
4.3.2 Critérios de elegibilidade .....	48
4.3.2.1 Participantes .....	48
4.3.2.2 Critérios de inclusão.....	48
4.3.2.3 Critérios de exclusão.....	49
4.3.3 Amostragem .....	49
4.4 Detalhamentos de procedimentos.....	49
4.4.1 Extração do DNA .....	49
4.4.2 Amplificação dos fragmentos gênicos .....	50
4.4.2.1 Primeira amplificação: Iniciadores Kai.....	50
4.4.2.2 <i>Nested</i> PCR.....	51
4.4.2.3 PCR Matsuoka.....	52
4.4.2.4 Eletroforese.....	53
4.4.2.5 LDS-DA, Microarranjos de DNA .....	54
4.4.2.6 Sequenciamento de DNA .....	55
4.4.2.7 Análise estatística.....	56
<b>5. FLUXOGRAMA . .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde a hanseníase ainda continua como um dos maiores problemas de saúde para alguns países da América Latina, Ásia e África, onde é considerada doença endêmica <http://www.who.int/wer/en>.

Desde a introdução da dapsona (1940), a primeira droga usada no tratamento contra a hanseníase surgiram os primeiros relatos de *Mycobacterium leprae* resistentes a esse fármaco. Em 1984 iniciou-se o uso de uma nova terapia com vários medicamentos, denominada poliquimioterapia (PQT)(WHO, 1982), que atualmente constitui a base da estratégia para o controle da hanseníase. Este regime desempenha um papel fundamental no tratamento da doença (MATSUOKA et al., 2008; MATSUOKA et al., 2010; KAI, MASANORI et al., 2011). A PQT é baseada na combinação dos antibióticos rifampicina, clofazimina e dapsona para os pacientes com hanseníase multibacilar (MB), enquanto que os casos de hanseníase paucibacilar (PB) são tratados somente com rifampicina e dapsona. Já os pacientes suspeitos de ser portadores de bacilos de resistência às drogas ou pacientes que apresentam reações adversas aos fármacos da PQT são tratados com drogas alternativas como a ofloxacina que desempenha um papel chave no tratamento destes casos (MATSUOKA et al., 2010; CUNHA et al., 2012).

A taxa de casos de resistência medicamentosa na hanseníase é ainda considerada baixa, no entanto o número de pacientes com *M. leprae* resistentes ao tratamento tem aumentado nos últimos anos devido principalmente ao tratamento inadequado ou ao abandono do mesmo por parte dos pacientes (MATSUOKA et al., 2010).

O conhecimento de cepas resistentes de *M. leprae* é fundamental para garantir o sucesso da PQT e dos programas de vigilância da hanseníase (SINGH et al., 2011). Os testes de susceptibilidade às drogas fornecem importante informação sobre a efetividade do tratamento nos pacientes com hanseníase, contudo, não são realizados como métodos de rotina em países endêmicos para a doença devido a seus altos custos (MATSUOKA et al., 2010). A técnica *in vivo* comumente usada para o diagnóstico de susceptibilidade às

drogas foi descrita por Shepard (SHEPARD, 1960) e compreende a inoculação de *M. leprae* em patas de camundongos *BALB/c* tratados ou não com os medicamentos da PQT. Entre as dificuldades que o teste possui estão o longo período de incubação do bacilo no modelo murino, sendo necessários ao menos de 6 a 12 meses para a obtenção de resultado, assim como também, é necessária a inoculação de grande quantidade de bacilos viáveis, nem sempre obtidos principalmente em pacientes paucibacilares (PB). O estudo da Biologia Molecular do *M. leprae* desvendou a lacuna entre o conhecimento do genoma da bactéria e a resistência medicamentosa associada às mutações em genes específicos deste micro-organismo, assim com o uso das técnicas moleculares têm se esclarecido alguns padrões genéticos que definem a resistência medicamentosa para alguns fármacos utilizados na PQT (MAEDA et al., 2001).

Atualmente, já foi descrita a relação entre os fármacos como a dapsona, rifampicina e ofloxacina e alterações na sequência de aminoácidos do DNA do *M. leprae* (MATSUOKA et al., 2010).

Pelos motivos acima expostos, visando contribuir para a eficácia da poliquimioterapia, prevenção da disseminação e surgimento de cepas resistentes, neste estudo foram identificadas mutações em genes envolvidos na resistência medicamentosa de *M. leprae*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Para o Ministério da Saúde um caso de hanseníase para tratamento é definido quando o paciente apresenta lesões de pele com alteração de sensibilidade, espessamento de tronco nervoso ou baciloscopia positiva na pele (ARAUJO, 2003).

Esta doença afeta principalmente a pele, os nervos periféricos e a mucosa do trato respiratório superior. Uma manifestação da doença é a perda de sensibilidade nas áreas afetadas. A perda ou diminuição da capacidade sensorial é devida ao tropismo que o bacilo apresenta pelo sistema nervoso periférico o que conduz a uma neuropatia com alterações das funções motoras, atrofia do tecido afetado e deformidades a longo prazo (<http://www.who.int/lep/leprosy/en/index.html>).

A hanseníase tem afetado o homem desde a antiguidade, sendo identificada nas antigas civilizações da China, do Egito e da Índia, onde deixou um legado de mutilação, rejeição e exclusão social. Nesses tempos era considerada um “mal” contagioso e incurável pela comunidade (SINGH; COLE, 2011).

Acredita-se que a principal via de transmissão da hanseníase ocorre através do trato respiratório superior que funciona como porta de entrada e saída do bacilo de Hansen. Ainda hoje, o homem é reconhecido como o único reservatório natural do *M. leprae*, embora tatus e macacos selvagens já tenham sido descritos como reservatórios naturais desta bactéria (ARAUJO, 2003).

A transmissão da hanseníase ocorre através do contato direto com portadores do bacilo *M. leprae*, por tal razão é altamente infecciosa, porém é considerada uma doença com baixa patogenicidade devido ao fato que poucas pessoas a desenvolvem (PEREIRA et al., 2011). A evolução da doença está diretamente determinada à imunidade de cada indivíduo (PENNA et al., 2002). Consideram-se os pacientes multibacilares (MB) a principal fonte de infecção, porém a transmissão da doença já foi também demonstrada através do contato com pacientes PB (ARAUJO, 2003).

Contudo, a disseminação da hanseníase depende de vários fatores, por exemplo, aspectos nutricionais, condições socioeconômicas, medidas higiênicas e sanitárias deficientes e aos próprios aspectos imunológicos e genéticos dos pacientes (PEREIRA et al., 2011).

## **2.2 Classificação da hanseníase**

A classificação da hanseníase é altamente complexa devido às grandes variações em suas características histopatológicas e clínicas.

No Brasil adotam-se as classificações de Madri (1953) e de Ridley e Jopling (1966). Na primeira, são considerados dois pólos estáveis e opostos da doença: o pólo virchowiano e o tuberculoide e também dois grupos instáveis: grupo indeterminado e grupo dimorfo (ARAUJO, 2003). Já na classificação proposta por Ridley e Jopling, a hanseníase é classificada de acordo com traços clínicos e bacteriológicos, enfatizando-se os aspectos imunológicos e histopatológicos. De acordo com esta classificação a hanseníase é dividida em cinco grupos: tuberculoide (TT ou HT), borderline tuberculoide (BT ou HBT), borderline (BB ou HBB), borderline lepromatoso (BL ou HBL) e lepromatoso (LL ou HL ou HV).

Além das formas descritas, existe também a hanseníase neural primária, cuja única manifestação é o comprometimento dos nervos periféricos. Estes pacientes não apresentam lesões de pele no exame clínico e apresentam a forma PB da doença o que dificulta seu diagnóstico na rotina. A prevalência deste tipo de hanseníase é baixa (ANTUNES et al., 2011).

Geralmente, utilizam-se dois parâmetros na classificação da hanseníase, um com base nos sinais clínicos e outro de acordo com o resultado da baciloscopia das lesões de pele.

Em 1982, a OMS introduziu uma nova classificação operacional relativa ao número de lesões e à carga bacilar que visa definir o esquema de tratamento com a PQT. De acordo com esta categorização os pacientes são agrupados dentro de dois tipos de casos: multibacilares (MB) e paucibacilares (PB) ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125\\_07\\_10\\_2010.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125_07_10_2010.html)).

A categoria PB compreende pacientes com hanseníase com bacilos comumente não detectáveis e lesões escassas ou raras (casos até cinco

lesões de pele). Os pacientes que apresentam várias lesões de pele e bacilos abundantes são incluídos como MB (mais de cinco lesões de pele).

Na prática, os programas de saúde utilizam principalmente critérios clínicos para a classificação e o início do tratamento adequado para cada paciente.

### **2.3 Prevalência da hanseníase**

Historicamente a distribuição geográfica da hanseníase tem apresentado variações extremas enquanto à diversidade de regiões e climas. As áreas consideradas como altamente endêmicas se caracterizam por clima tropical, com fortes chuvas e temperaturas elevadas. Entretanto, a doença já foi também identificada em países com clima temperado e frio (PEREIRA et al., 2011). Um exemplo é a Noruega, onde a hanseníase já existiu como problema endêmico de saúde, porém mudanças socioeconômicas contribuíram à erradicação da doença (TALHARI; NEVES, 1989).

Atualmente a maioria dos casos novos (80%) localiza-se nas regiões intertropicais do planeta (PEREIRA et al., 2011). Define-se como caso novo de hanseníase aquele paciente que o serviço de saúde relatou apresentando sinais ativos e sintomas da doença, porém sem história de tratamento (WILLIAMS; GILLIS, 2004). Muitos países da Ásia, África e América Latina ainda são afetados com número consideravelmente alto de pacientes com hanseníase. Acredita-se que existam no mundo ao redor de um a dois milhões de pessoas afetadas visivelmente e irreversivelmente pelas sequelas da doença, segundo dados da OMS. Nesse contexto, o Brasil continua sem atingir a meta proposta pela OMS em 1991 de diminuir os pacientes de hanseníase em menos de um caso por 10 mil habitantes e ainda se posiciona como o país mais endêmico das Américas e como segundo país com maior prevalência de hanseníase no mundo.

Até o início de 2012, um total de 105 países submeteu seus relatórios de hanseníase para a OMS, sendo 28 localizados na região africana, 28 na região das Américas, 11 na região sudoeste da Ásia, 22 na região leste do Mediterrâneo e 16 da região do Pacífico ocidental (<http://www.who.int/wer/en>).

A Tabela 1 mostra os casos novos de hanseníase a nível global no primeiro trimestre de 2012 e a prevalência durante o ano de 2011. O número total de casos novos para esse ano foi de 219.075 e a prevalência mundial no primeiro trimestre de 2012 foi de 181.941 casos.

Tabela 1. Prevalência no primeiro trimestre de 2012 e taxa de novos casos em 2011.

Região OMS*	Nº de casos registrados (prevalência por 10.000 habitantes) no primeiro trimestre de 2012	Nº de casos novos detectados (taxa de detecção de novos casos por 100.000 habitantes), no ano de 2011
África	15.006 (0,37)	12.673 (3,14)
Américas	34.801 (0,40)	36.832 (4,18)
Sudeste da Ásia	117.147 (0,64)	160.132 (8,75)
Leste do Mediterrâneo	7.368 (0,12)	4.346 (0,71)
Pacífico ocidental	7.619 (0,05)	5.092 (0,30)
<b>Total</b>	<b>181.941 (0,34)</b>	<b>219.075 (4,06)</b>

\*Dados da Região Europeia não foram disponibilizados.

Fonte: (<http://www.who.int/wer/en>), adaptado.

Na Tabela 2 são apresentadas as taxas de detecção de casos novos nas diferentes regiões durante o período de 2004 a 2011. Pode-se observar que o número de casos detectados na região do Leste do Mediterrâneo aumenta devido ao incremento da cobertura dos serviços de controle da doença juntamente com a prestação de melhores serviços no Sudão e a Somália (<http://www.who.int/wer/en>).

Tabela 2. Tendência na detecção de novos casos de hanseníase fornecidos pela OMS, 2004-2011.

Região OMS*	N° de casos novos detectados							
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<b>África</b>	46.918	45.179	34.480	34.468	28.814	28.935	25.345	12.673
<b>Américas</b>	52.662	41.952	47.612	42.135	41.891	40.474	37.740	36.832
<b>Sudeste da Ásia</b>	298.603	201.635	174.118	171.576	167.505	166.115	156.254	160.132
<b>Leste do Mediterrâneo</b>	3.392	3.133	3.261	4.091	3.938	4.029	4.080	4.346
<b>Pacífico Ocidental</b>	6.216	7.137	6.190	5.863	5.859	5.243	5.055	5.092
<b>Total</b>	<b>407.791</b>	<b>299.036</b>	<b>265.661</b>	<b>258.133</b>	<b>249.007</b>	<b>244.796</b>	<b>228.474</b>	<b>219.075</b>

\*Dados da Região Europeia não foram disponibilizados.

Fonte: (<http://www.who.int/wer/en>), adaptado.

De acordo com o número de casos novos detectados por 100 mil habitantes, uma área geográfica pode ser classificada como hiperendêmica quando apresenta um número igual ou maior a 40 casos por 100 mil habitantes; muito alto entre 20 e 39,99 casos por 100 mil habitantes; alto entre 10 e 19,99 casos por 100 mil habitantes; médio de 2 a 9,99 casos por 100 mil habitantes e de baixa endemicidade quando o valor é menor que 2 casos por 100 mil habitantes (PEREIRA et al., 2011).

No ano de 2011, 18 países reportaram uma quantidade maior ou igual a 1.000 casos detectados no ano, totalizando 94% dos casos novos detectados ao redor do mundo. A Índia, o Brasil e a Indonésia contribuíram com o 83% dos casos novos detectados em 2011, com 58%, 16% e 9%, respectivamente. Entre esses países a Índia ocupa o primeiro lugar com um total de 127.295 casos novos, seguida pelo Brasil com um total de 33.955 casos novos (<http://www.who.int/wer/en>).

Como já mencionado, a OMS traçou em 1991 a meta de atingir o número inferior a um caso por 10 mil habitantes com o intuito de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública. Essa meta teve impacto na redução da prevalência em mais de 90% a nível mundial no final de 2000 (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

Nos anos anteriores a 2003, o Brasil era considerado o país mais afetado a nível mundial, devido à escassa informação epidemiológica coletada

nesse período, assim como também, na mudança dos parâmetros adotados pela OMS para realizar o cálculo do coeficiente de prevalência que era composto apenas pelos pacientes com tratamento em curso.

Esses fatores dificultavam o conhecimento real do número de casos existentes no período anterior a esse ano (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011, SILVA SOBRINHO; MATHIAS, 2008; IGNOTTI; DE PAULA, 2010). Com a correção do cálculo da prevalência o Brasil passou de 4,5 para 1,7 casos por 10 mil habitantes em 2003 para 2004 (Ministério da Saúde, Brasil. 2005).

O Brasil apresenta uma prevalência altamente variada que depende da região geográfica do país analisada (SILVA SOBRINHO; MATHIAS, 2008).

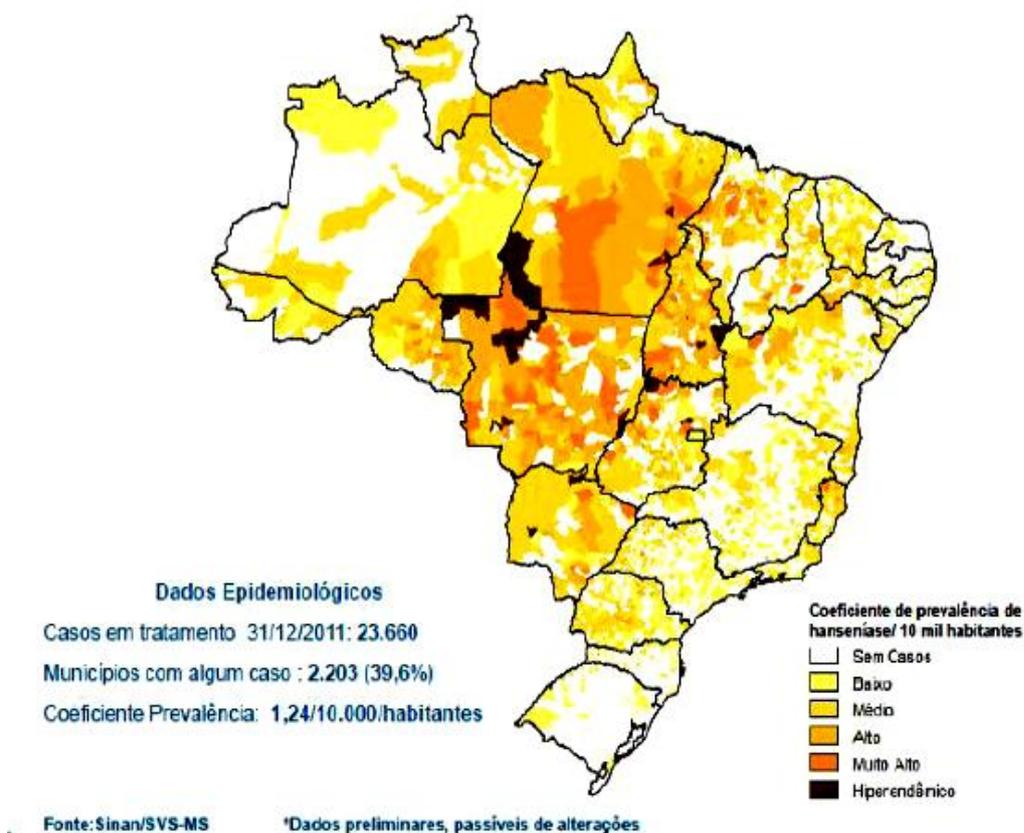
Em 2011, a prevalência da hanseníase no Brasil foi calculada em 1,54 casos por 10 mil habitantes (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011). O coeficiente de detecção (calculado ao dividir o total de casos novos detectados para determinado ano e região geográfica, pela população da mesma região e ano), no mesmo período foi de 17,65 por 100 mil habitantes considerado um valor médio. Contudo, alguns Estados foram considerados hiperendêmicos com base no número de pacientes em tratamento e no número de casos diagnosticados com lesões incapacitantes. Entre esses Estados encontram-se Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Pará e Maranhão, apresentando mais de 40 novos casos por 100 mil habitantes. No Amazonas o coeficiente de detecção foi de 16,59 por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

Infelizmente, ainda hoje a detecção de casos novos é elevada devido à alta transmissão da doença ou ao diagnóstico tardio (SILVA SOBRINHO; MATHIAS, 2008).

Na Figura 1 é apresentada a prevalência da hanseníase no Brasil, com destaque para a maior concentração de casos na região da Amazônia brasileira (Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Maranhão e sudoeste do Pará).

Figura 1. Prevalência da hanseníase, Brasil 2011.

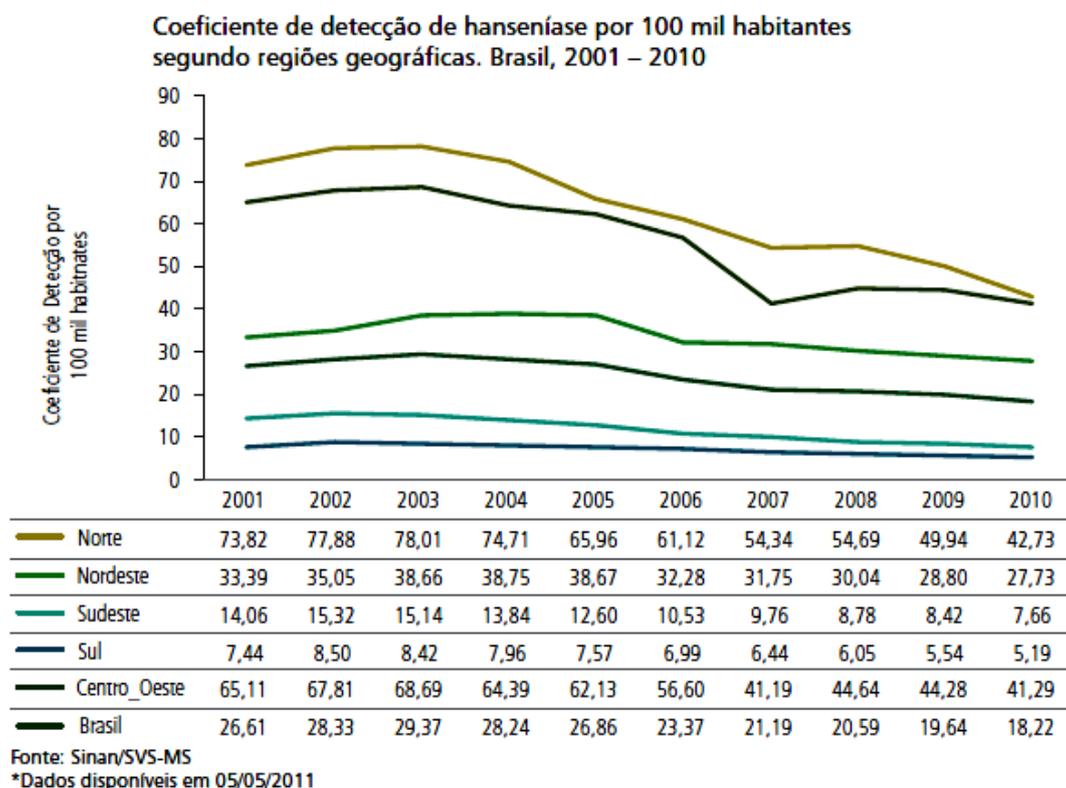
### Coeficiente de prevalência de Hanseníase por municípios, Brasil – 2011\*



Fonte: (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011), adaptado.

A Figura 2 mostra o coeficiente de detecção de hanseníase para o Brasil e entre as regiões no período 2001-2010, onde se observa que a região Norte apresenta uma tendência à redução, porém a taxa de casos novos detectados é ainda considerada alta.

Figura 2. Coeficiente de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes no Brasil, no período 2001-2010.

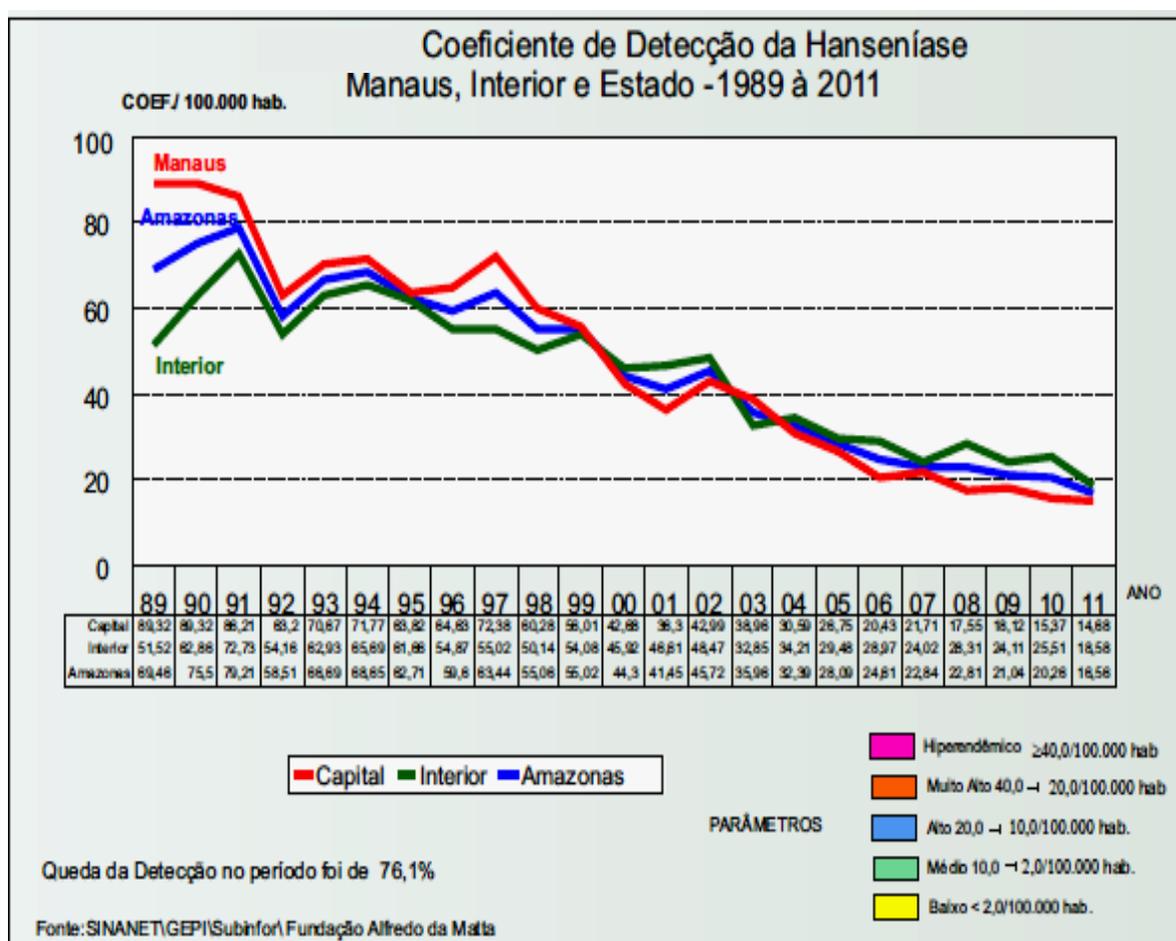


Fonte: (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011), adaptado.

Em 2011, no Estado do Amazonas foram totalizados 694 casos de hanseníase, sendo 586 casos novos, 66 recidivas, 34 outros reingressos e 08 transferências de outros Estados. O coeficiente de detecção entre as regiões do Estado foi de 3,8 a 70,9 por 100 mil habitantes, oscilando entre uma endemicidade média e hiperendêmica. Na Fundação Alfredo da Matta (FUAM), centro de referência em hanseníase da região Norte do Brasil foram registrados 329 casos de hanseníase para o mesmo ano. Destes 256 foram casos novos, 41 casos de recidiva, 23 outros reingressos e 09 pacientes transferidos. O número de casos novos constituiu 43,7% do total de casos registrados no Estado do Amazonas e representa 79,5% dos casos notificados em Manaus. Observa-se ainda uma maior concentração destes casos novos na zona Norte (28,9%), a zona Leste de Manaus com 28%. A zona Sul da cidade totalizou 21,8% (Boletim epidemiológico FUAM, 2011).

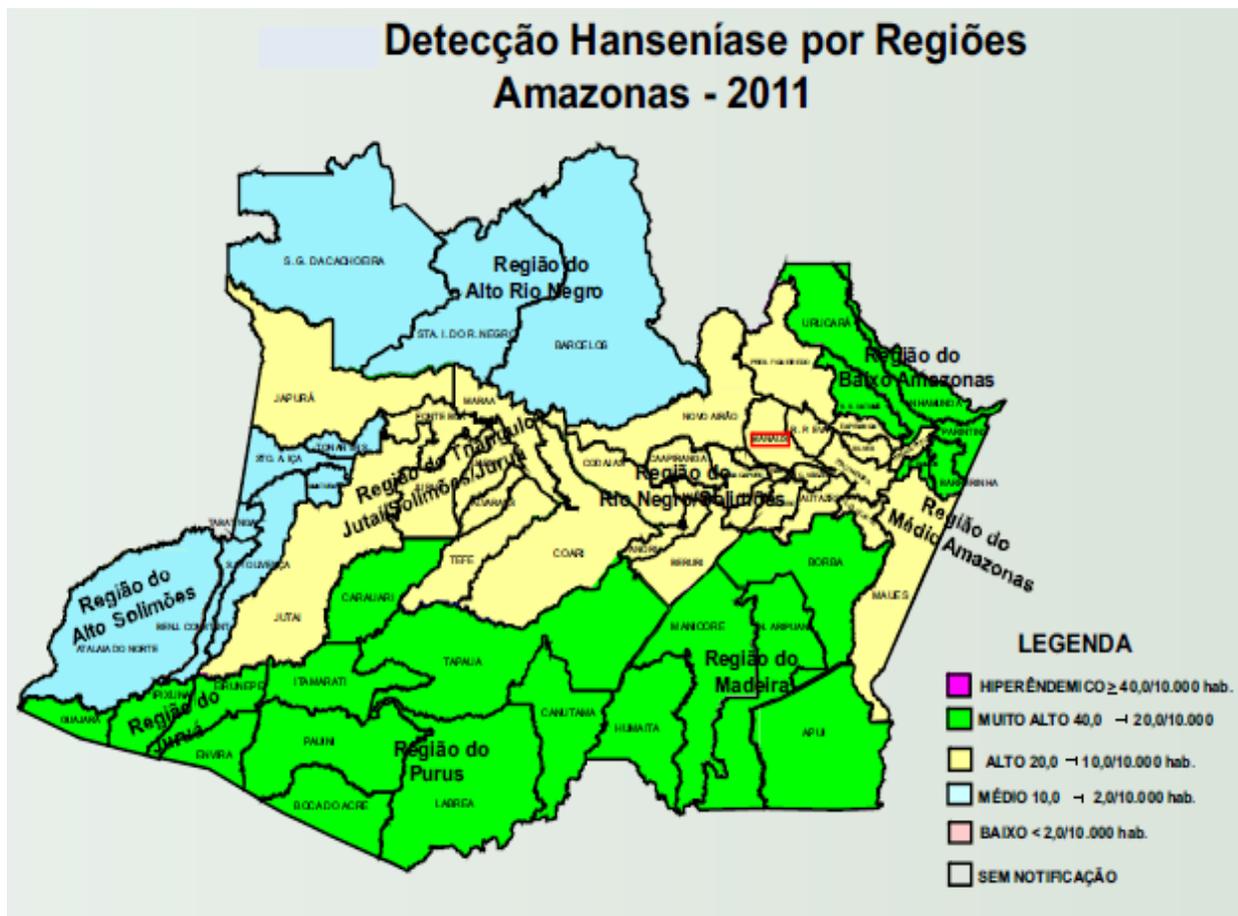
Segundo dados do Boletim epidemiológico da FUAM (2011), houve declínio no coeficiente de detecção de casos de hanseníase observados no Estado do Amazonas, no período de 1989-2011 (Figura 3). A cidade de Manaus acompanha essa tendência, já nos municípios do interior observa-se um comportamento instável, com aumento no coeficiente de detecção de casos de hanseníase no ano de 2011 (Figura 4).

Figura 3. Detecção de casos de hanseníase no interior do Estado do AM, período de 1989-2011.



Fonte: Boletim epidemiológico FUAM, 2011.

Figura 4. Índice de detecção de hanseníase nas regiões do Estado do AM, 2011.



Fonte: Boletim epidemiológico FUAM, 2011.

Entre algumas das metas definidas pela OMS destacam-se a detecção precoce dos casos de hanseníase e a garantia do tratamento dos pacientes com a PQT.

A OMS considera que um país conseguiu controlar uma doença quando foram reduzidas a incidência, a prevalência e a morbidade da mesma a níveis aceitáveis para tal região. Neste contexto foi criado no Brasil um programa de ampliação e descentralização dos serviços de saúde com o intuito de melhorar o atendimento à população, tentando assim eliminar a hanseníase como problema de saúde pública no país (SILVA SOBRINHO; MATHIAS, 2008).

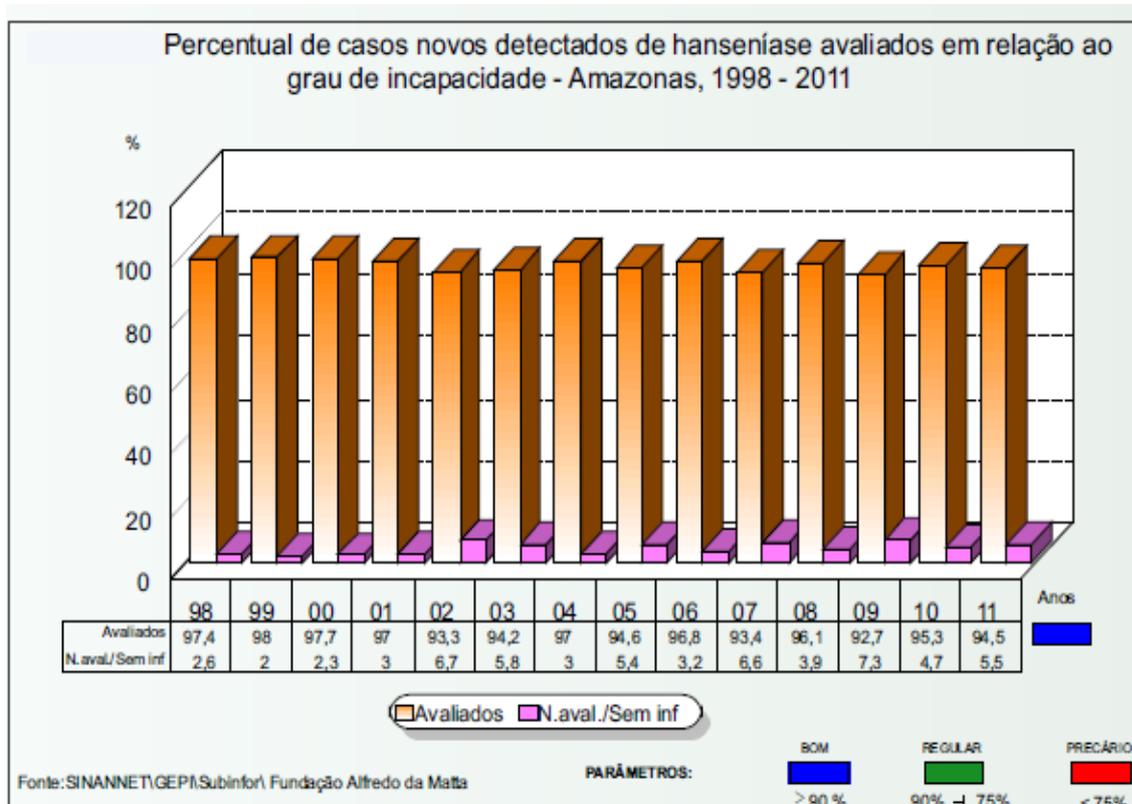
Outro objetivo proposto pela OMS foi a melhora da qualidade na assistência aos pacientes, buscando reduzir as incapacidades físicas que estes poderiam adquirir ao longo prazo pela progressão da hanseníase. Esse programa é conhecido como “Estratégia global aprimorada para redução

adicional da carga da hanseníase para o quinquênio 2011-2015” (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

No Brasil, para o ano de 2011 a média de detecção de casos novos com grau de incapacidade II foi de 1,13 por 100 mil habitantes. Já a região Norte do país apresentou 2,53 por 100 mil habitantes, enquanto que no Estado do Amazonas foram detectados 1,75 casos novos com grau de incapacidade II por 100 mil habitantes. Até o momento, não existem publicações internacionais desse índice que possam ser comparadas com os dados obtidos no Brasil (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

Entre os 586 casos novos de hanseníase detectados no AM em 2011, 554 pacientes foram avaliados na procura de incapacidades. Desse grupo, 61 pacientes apresentaram grau II de incapacidade. O número de pacientes com grau de incapacidade I totalizou 121 casos. Este dado é considerado alto segundo os parâmetros do Ministério da Saúde ( $\geq 10$ ) e demonstra a existência de diagnóstico tardio na hanseníase, que poderia ser o resultado de pouco acesso aos serviços básicos de saúde ou pouca informação dos pacientes sobre a doença (Boletim epidemiológico FUAM, 2011).

Figura 5. Relação de casos novos de hanseníase e grau II de incapacidade, no Estado do Amazonas, 1998-2011.



Fonte: Boletim epidemiológico FUAM, 2011.

Em adição a esse cenário, outro fator que dificulta a redução no número de casos de hanseníase é o aparecimento de casos de recidiva. Segundo a OMS um paciente com hanseníase é considerado como caso de recidiva quando este completou o tratamento da PQT, porém desenvolveu posteriormente novos sinais e sintomas da doença, mesmo durante o período de vigilância considerado dois anos para os pacientes PB e cinco anos para MB.

Acredita-se que as recidivas são ocasionadas por vários fatores, tais como a presença de *M. leprae* íntegros, o uso prolongado de drogas monoterápicas ou mesmo a terapia inapropriada (KAIMAL; THAPPA, 2009). Com tudo as recidivas são raras (ARAUJO, 2003). Pesquisas epidemiológicas demonstram também, que usualmente, os relatórios de altos índices de recidivas são devidos ao reconhecimento inadequado por parte de alguns profissionais

da saúde pouco capacitados na doença. Outra causa poderia ser a inclusão incorreta de alguns pacientes que completaram um ano de tratamento PQT e ainda requerem mais 12 meses de medicação como recidivas. Além disso, o registro de informações insuficientes nos prontuários que não permitem saber se o paciente terminou ou abandonou o tratamento, também dificulta o conhecimento real do número de casos de recidiva (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

É importante também diferenciar os surtos reacionais das recidivas por serem clinicamente muito semelhantes (Quadro 1).

Os surtos reacionais ou reações hansênicas (tipo 1 e 2) são alterações do sistema imunológico que se manifestam como quadros inflamatórios que se intercalam na fase crônica da doença, são desencadeados por fatores como vacinação, gravidez, estresse físico e emocional entre outros e podem surgir durante o tratamento ou após a alta do paciente e se apresentam com mais frequência nos pacientes MB.

Nas reações tipo 1 também conhecidas de Reação Reversa (RR) aparecem novas lesões dermatológicas que podem ser tipo manchas ou placas, infiltrados, com alteração de cor na área afetada e edema nas lesões antigas. O espessamento e dor de nervos periféricos (neurite) podem ou não estar presente.

Nas reações tipo 2 a manifestação mais frequente é o Eritema Nodoso Hansênico (ENH) onde ocorre o aparecimento de nódulos subcutâneos dolorosos com ou sem febre, dor nas articulações e mal-estar generalizado, da mesma forma que nas reações tipo 1 a neurite pode ou não se manifestar.

Para realizar o diagnóstico dos estados reacionais se faz necessário que submeter ao paciente a exame físico geral e a avaliação dermato-neurológica. Os estados reacionais podem acontecer antes, durante ou depois do uso da PQT (Araujo, 2003; Ministerio da Saúde, 2009).

Foi observado que pacientes que apresentaram estes episódios reacionais durante a hanseníase tiveram triplicadas suas chances de desenvolver recidiva (DE MEDEIROS BRITO et al., 2005). A dificuldade de realizar o diagnóstico diferencial correto entre recidiva e os episódios reacionais faz que existam dados controversos sobre o diagnóstico das duas situações, fato que contribui à transmissão da hanseníase (ROCHA et al., 2012).

Quadro 1. Diferenças entre reação reversa e recidiva.

<b>Reação reversa</b>	<b>Recidiva</b>
Geralmente durante a quimioterapia ou dentro de 6 meses após o tratamento.	Normalmente muito depois do término da quimioterapia, acima de um ano de intervalo de tratamento.
Início súbito e inesperado.	Início lento e insidioso.
Pode vir acompanhado de febre e malestar.	Em geral sem sintomatologia geral.
Lesões antigas se tornam eritematosas brilhantes, infiltradas.	Lesões antigas podem apresentar bordas eritematosas.
Em geral varias lesões novas.	Poucas lesões novas.
Pode haver ulceração das lesões.	Ulceração é rara.
Regressão com descamação.	Não há descamação.
Pode acometer vários troncos nervosos rapidamente, com dor, alteração da sensibilidade e função motora.	Pode acometer um único nervo e as alterações motoras ocorrem muito lentamente.
Excelente resposta a corticoterapia.	Não responde bem a corticoterapia.

Fonte: (ARAÚJO, 2003)

Outro agravante desta situação é a dificuldade em distinguir se os sinais e sintomas são resultantes de uma nova infecção ou da ineficácia do tratamento PTQ, possivelmente devido aos bacilos resistentes. Por tal razão, o diagnóstico das recidivas é extremamente complexo e requer o contínuo acompanhamento do paciente até registrar sua cura (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011), além de qualificação dos profissionais de saúde responsáveis por estes pacientes.

No ano de 2010 o número global de casos de recidiva teve aparente diminuição quando comparado com 2009; porém este dado não reflete a realidade, pois o Brasil não apresentou os dados do número de recidivas a OMS nesse ano (<http://www.who.int/wer/en>). No ano de 2011 foram registrados 1498 casos de recidiva no Brasil (<http://www.who.int/wer/en>), valor que é considerado alto quando comparado com outros países (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

Os pacientes que receberam o tratamento com a PQT apresentam risco

dez vezes mais baixo de desenvolver recidiva, que os tratados com monoterapia de dapsona (KAIMAL; THAPPA, 2009).

Atualmente, a OMS introduziu o programa de vigilância de recidivas com o intuito de diminuir o impacto deste fenômeno da hanseníase. Após a implementação deste programa, vários países endêmicos da doença passaram a relatar seus casos de recidivas (ROCHA et al., 2012).

Com os esforços realizados pelos programas nacionais dos países endêmicos e a colaboração de entidades internacionais, tem sido observada diminuição do número de casos de hanseníase a nível mundial (<http://www.who.int/wer/en>). Contudo, esta grave doença não desaparecerá em breve visto que ainda hoje o número de casos novos continua alto.

Em países com alta endemicidade, principalmente na área da periferia das grandes cidades, os serviços de saúde não oferecem a cobertura necessária para o tratamento dos pacientes com hanseníase, o que leva ao aumento do risco de uma reinfecção (DA SILVA ROCHA et al., 2011).

Acredita-se que a diminuição na detecção de números de casos de hanseníase no Brasil se deve a uma série de fatores entre os quais se incluem a PQT, os esforços dos profissionais da saúde da rede básica e dos centros de referência, assim como também às melhorias no âmbito econômico-social do país (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

No entanto, essa aparente diminuição poderia ser também um reflexo de passividade na procura de casos novos por parte dos serviços de saúde (SILVA SOBRINHO; MATHIAS, 2008).

A detecção precoce e o tratamento com a PQT na hanseníase são alternativas que a OMS pretende manter a longo prazo. A justificativa é que não existem mudanças tecnológicas nem novos conhecimentos para tentar qualquer alteração no modo de controlar a doença.

#### **2.4 Diagnóstico da hanseníase**

O diagnóstico desta doença comumente é baseado nos sinais e sintomas clínicos e inclui várias etapas: anamnese, avaliação dermatológica, avaliação neurológica, procura por episódios reacionais e o diagnóstico diferencial com outras dermatoses (PENNA et al., 2002).

A detecção precoce da hanseníase ajuda no controle da doença, assim

como na eleição do tratamento mais adequado para cada paciente (<http://www.who.int/lep/diagnosis/en/index.html>).

O paciente suspeito de hanseníase geralmente apresenta lesões de pele única ou múltiplas, usualmente menos pigmentadas que a região adjacente. Dependendo da forma clínica as lesões podem ser avermelhadas ou acobreadas, máculas (planas), pápulas (elevadas) ou nódulos.

Outra característica típica da doença é a perda da função sensorial definitiva da área afetada, com ou sem comprometimento nervoso (<http://www.who.int/lep/diagnosis/en/index.html>).

O *M. leprae* é um bacilo álcool ácido resistente não cultivável *in vitro*. Em 1973 utilizavam-se tatus (*Dasypus novemcinctus*) como modelo experimental para o desenvolvimento de uma vacina contra a hanseníase, este ensaio foi importante para demonstrar que estes animais são hospedeiros naturais para o *M. leprae*. Os tatus apresentam uma temperatura corporal média entre 30-35°C que favorece o crescimento do bacilo hansênico, já que esta bactéria exibe tropismo por regiões frias do corpo (DEPS et al., 2007; SINGH; COLE, 2011). Contudo, ainda hoje, não foi possível o desenvolvimento de uma vacina eficaz para esta doença (MATSUOKA, 2010). Através do estudo com esse modelo animal foi possível extrair o DNA do *M. leprae* para realizar o sequenciamento do genoma completo da cepa TN isolada de um paciente de Tamil Nadu, na Índia (SINGH; COLE, 2011).

Através dos ensaios com tatus e camundongos foi possível conhecer informações das bases genéticas, metabólicas e antigênicas do bacilo da hanseníase (SCOLLARD et al., 2006) bem como investigar a resistência de *M. leprae* aos fármacos.

O exame mais utilizado para o diagnóstico da hanseníase é a biópsia de pele das lesões ativas. Outro recurso laboratorial utilizado principalmente nos casos MB é a baciloscopia das lesões de pele, usada como técnica semiquantitativa para a contagem dos bacilos e no seguimento dos pacientes durante e após o tratamento com os medicamentos (SINGH; COLE, 2011). Na forma clínica BT a biópsia constitui a ferramenta mais adequada para o diagnóstico da hanseníase, pois nestes casos o *M. leprae* encontra-se no interior dos ramos nervosos dérmicos, já na baciloscopia dos raspados dérmicos os bacilos não estão bem representados (BARRETO et al., 2008).

A baciloscopia também é usada para a avaliação dos quadros de recidiva (PENNA et al., 2002). Devido à preferência do bacilo *M. leprae* pelos locais frios do corpo, as amostras de baciloscopia são comumente coletadas de lóbulos das orelhas e cotovelos dos indivíduos com suspeita de hanseníase (SINGH; COLE, 2011).

A coleta da amostra de baciloscopia se realiza a partir de um corte na lesão de pele suspeita de conter *M. leprae*. A linfa obtida é espalhada sobre uma lâmina de vidro e em seguida realizada a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. Posteriormente é feita a descoloração com álcool-ácido 1%. O índice baciloscópico (IB) obtido da contagem das lamina de baciloscopia é expresso numa escala logarítmica (<http://www.who.int/lep/microbiology/en/index.html>).

Nas baciloscopias positivas das lesões de pele, quando observados sob o microscópio, os bacilos do *M. leprae* são corados em vermelho (Ziehl-Neelsen). O resultado da microscopia é expresso sob a forma de IB que varia entre 0 a 6+, onde 0 (zero) representa a ausência de bacilos e 6+ a presença de mais de 1000 bacilos por campo microscópico. Para as formas tuberculoide e indeterminada o resultado da baciloscopia é negativo, já para as formas virchowianas o resultado é positivo. A forma dimorfa tem um resultado variável (ARAUJO, 2003). Na microscopia o *M. leprae* se apresenta como bacilo em forma de bastonete com os lados paralelos e as extremidades arredondadas ou podem também ser visualizados em forma de haste (em menor proporção). Nas lesões da hanseníase de pacientes LL encontram-se grande número de bacilos, comumente agrupados, formando globias, mas nunca formando cadeias (<http://www.who.int/lep/diagnosis/en/index.html>).

Ainda hoje, não estão disponíveis testes sorológicos para a identificação do *M. leprae* nos laboratórios de rotina (SCOLLARD et al., 2006), apesar de existir o teste ML Flow desde 2003, empregado em projetos de pesquisa para pacientes MB. Através deste ensaio imunocromatográfico são detectados anticorpos IgM contra o antígeno glicolípido fenólico 1 (PGL-I) do *M. leprae*, utilizando como amostras sangue total ou soro (GROSSI et al., 2008). Contudo, o emprego tem demonstrado ser altamente sensível somente no caso de pacientes MB (BARRETO et al., 2008). Os anticorpos contra o PGL-I apresentam especificidade para o *M. leprae* e não conferem proteção, somente são indicativos de infecção pelo bacilo (CONTIN et al., 2011a), porém pessoas

expostas ao bacilo podem apresentar baixos títulos deste anticorpo (CONTIN et al., 2011)

## **2.5 *Mycobacterium leprae***

O agente etiológico da hanseníase, o *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), intracelular obrigatório, imóvel, com características microaerofílicas, de crescimento lento, que não forma esporos e com período de incubação que oscila entre dois a cinco anos (SCOLLARD et al., 2006). Este bacilo, descoberto por Gerhard Armauer Hansen em 1873, em Berger, na Noruega, foi a primeira bactéria patogênica associada com doença no ser humano (SINGH; COLE, 2011).

Em adição, o genoma do *M. leprae* foi um dos primeiros a ser sequenciado de forma completa (SCOLLARD et al., 2006). Entre as micobactérias, o *M. leprae* apresenta o genoma de menor tamanho e é o mais rico em conteúdo de adenina-timina (A+T). Atualmente sabe-se que a sequência genômica da cepa TN do *M. leprae* contém 3.268.210 bp, possuindo média aproximada de 57,8% da combinação de aminoácidos guanina-citosina (G+C). Também já foram descobertos 1614 genes que codificam proteínas e mais de 50 genes que codificam cadeias de RNA estáveis (SINGH; COLE, 2011).

O *M. leprae* sofreu evolução reductiva, perdendo muitos genes e funções a eles associadas, possivelmente por mudanças drásticas em seu estilo de vida, que passou da forma livre a viver associado obrigatoriamente a um hospedeiro (SINGH; COLE, 2011).

Ao analisar a sequência gênica do bacilo de Hansen, observa-se a presença de muitos pseudogenes que são sugestivos da alta diversidade genética entre as cepas do *M. leprae*. Contudo, a comparação entre as diferentes cepas desta bactéria revelou que a existência de variações entre elas é rara. Por exemplo, a comparação entre a cepa Br4923 de um paciente brasileiro, com o genoma da cepa TN da Índia (3.268.071 bp), somente mostrou uma diferença de 141 bp, diferindo somente no locus 185 (SINGH; COLE, 2011).

Para esclarecer se existiam modificações entre cepas de lugares geográficos diferentes foram analisadas as cepas Thai53 (Tailândia) e NHDP63 (USA) e comparadas com as cepas padrões TN e Br4923. Essa comparação

revelou que existia mais de 99.995% de identidade na sequência entre elas, concluindo-se assim, que o conteúdo gênico é essencialmente idêntico entre os quatro isolados (SINGH; COLE, 2011).

O *M. leprae* possui uma taxa de deleção de pseudogenes lenta, contrário ao observado na maioria das bactérias, e deste modo, a retenção de aproximadamente 89% dos nucleotídeos de pseudogenes no *M. leprae* (GÓMEZ-VALERO et al., 2007). Esses dados sugerem que essas sequências poderiam prover funções de “backup” ou ativação em eventos tais como a conversão de genes em situações não convencionais, ou também poderiam atuar como reservatório de diversidade genética (SINGH; COLE, 2011).

Com a descoberta do genoma do *M. leprae* foi possível aprimorar as técnicas diagnósticas, entender as bases genéticas, a fisiologia e a patogenicidade da bactéria. Além disso, foram descritas as bases genéticas da resistência medicamentosa do *M. leprae* através do uso das técnicas moleculares que testam a susceptibilidade do bacilo às diferentes drogas usadas na hanseníase (SINGH; COLE, 2011).

## **2.6 Tratamento poliquimioterápico**

O primeiro tratamento para a hanseníase apareceu nos anos finais de 1940, utilizando a dapsona e seus derivados. A monoterapia com qualquer fármaco usado no combate à hanseníase poderia facilitar o desenvolvimento de resistência medicamentosa à droga e sua utilização atualmente é considerada prática antiética (<http://www.who.int/lep/mdt/en/index.html>).

A meta de diminuir a taxa de hanseníase em menos de um caso por 10 mil habitantes foi traçada em 1991 pela OMS, introduzindo para tal finalidade a PQT e incentivando os sistemas de saúde a realizar a detecção precoce da doença.

Assim a OMS estabeleceu através da PQT (Quadro 3) a utilização de uma combinação de rifampicina (uma vez por mês), clofazimina e dapsona (doses diárias por 12 meses) nos casos MB de hanseníase e rifampicina e dapsona nos PB (somente por seis meses). A principal droga neste tipo de terapia é a rifampicina, pois é usada para os dois tipos de hanseníase. Outros antibióticos também são utilizados, como a estreptomicina, a claritromicina, as fluoroquinolonas e a etionamida, os quais têm mostrando eficácia para o

tratamento da hanseníase. Consideram-se tratamentos alternativos, sendo substitutos de algum componente utilizado na PQT que cause efeito secundário no paciente ou em casos de resistência medicamentosa (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância, 2010).

Desde 1995 a OMS fornece os medicamentos da PQT utilizados na hanseníase de forma gratuita aos países considerados endêmicos para a doença. (<http://www.who.int/lep/microbiology/en/index.html>).

Quadro 2. Regime terapêutico para casos Paucibacilares de hanseníase.

Adulto	Rifampicina: 600 mg/mês (administração supervisionada).
	Dapsona: 100 mg/mês supervisionada e 100 mg/diária autoadministrada.
Criança	Rifampicina: 450 mg/mês (com administração supervisionada).
	Dapsona: 50 mg/mês (supervisionada) e diária de 50 mg/diária autoadministrada.
Duração: 6 doses	

Fonte: (Ministério da Saúde, 2010), adaptado.

Quadro 3. Regime terapêutico para casos Multibacilares de hanseníase.

Adulto	Rifampicina: dose mensal de 600 mg (supervisionada).
	Dapsona: dose mensal de 100 mg (supervisionada) e uma dose diária de 100 mg (autoadministrada).
	Clofazimina: dose mensal de 300 mg (supervisionada) e uma dose diária de 50 mg (autoadministrada).
Criança	Rifampicina: dose mensal de 450 mg (supervisionada).
	Dapsona: dose mensal de 50 mg (supervisionada) e 50 mg (autoadministrada).
	Clofazimina: dose mensal de 150 mg (supervisionada) e 50 mg em dias alternados. (autoadministrada)
Duração: 12 doses	

Fonte: (Ministério da Saúde, 2010), adaptado.

Outro fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos usados na hanseníase são os tratamentos prolongados, pois os pacientes geralmente abandonam o regime terapêutico ou fazem interrupções do mesmo, tendo em ocasiões dosagens inadequadas da droga (OPROMOLLA et al., 1993).

A PQT é considerada um tratamento efetivo, pois reduziu a prevalência de casos de hanseníase em muitas áreas. Contudo, existem relatos de *M. leprae* resistente a alguns componentes da PQT (MATSUOKA, 2010; KAI, MASANORI et al., 2011).

Nas duas últimas décadas é considerado que mais de 14 milhões de pessoas foram curadas da hanseníase através da PQT. Contudo, são detectados mais de 250.000 casos novos da doença por ano, com uma média de um caso novo documentado a cada dois minutos. Esta informação destaca a importância de realizar seguimento adequado do mecanismo da transmissão do bacilo e da utilização de métodos de diagnóstico eficazes e precoces nos indivíduos suspeitos de portar a doença (SINGH; COLE, 2011) Apesar da utilização da PQT o Brasil continua com índices de detecção de hanseníase elevados (PEREIRA et al., 2011).

### **2.6.1 Dapsona**

O primeiro fármaco aplicado com sucesso no tratamento da hanseníase foi o Promin (diamino-azobenzeno 4'-sulfonamida) em 1943 utilizado inicialmente no leprosário de Carville, na Louisiana, USA. Em 1947 foi introduzido também no Japão. Porém, seis anos mais tarde surgiu no mercado a dapsona, demonstrando-se mais efetiva que o Promin. Hoje em dia, a dapsona continua sendo um componente fundamental no tratamento da hanseníase (MATSUOKA, 2010).

A dapsona é uma sulfona análoga do ácido para-aminobenzoico (PABA), alvo da enzima diidropteroato sintase (DHPS) que atua como antimetabólito pela competição com PABA para os sítios ativos de enzima DHPS (BAUMSTARK et al., 1977). Este fármaco foi utilizado mundialmente como a droga de primeira linha para o tratamento da hanseníase (MATSUOKA, 2010; NAKATA et al., 2011). A enzima DHPS é codificada pelo gene *folp1*, envolvido na síntese de ácido fólico. O mecanismo de ação da dapsona ocorre através da inibição competitiva da síntese de ácido fólico. A dapsona é considerada um bacteriostático e, infelizmente, seu uso massivo como tratamento monoterápico entre 1960 e 1970, promoveu aumento dos casos de *M. leprae* resistentes a essa droga (MATSUOKA, 2010; NAKATA et al., 2011).

### **2.6.2 Rifampicina**

A rifampicina é um potente bactericida atualmente usado na PQT, que pode ser administrado como dose única (1.200 mg) ou mediante doses diárias (600 mg por 3 dias) (MATSUOKA, 2010). A rifampicina foi previamente usada como droga monoterápica ou em combinação com a dapsona, antes da implementação da PQT. A rifampicina é considerada o fármaco chave do regime PQT da hanseníase (ROCHA et al., 2012).

Por seu poder bactericida, a rifampicina tem demonstrado ser uma droga supressora de bacilos *M. leprae* resistentes, e deste modo os relatos de mutações no gene *rpoB* são poucos frequentes (KAI, MASANORI et al., 2011).

### **2.6.3 Ofloxacina**

A ofloxacina é um bactericida de espectro moderado. O primeiro ensaio com esta droga para verificar sua efetividade contra o *M. leprae* foi realizado em 1986 pelo método de Shepard (SAITO et al., 1986). Seu mecanismo de ação ocorre através da ligação à subunidade A da DNA girase no gene *gyrA*, inibindo a replicação do DNA da bactéria. Mutações associadas com o gene *gyrA* são comumente relatadas em micobactérias (MATSUOKA, 2010).

### **2.6.4 Clofazimina**

A clofazimina é considerada um bactericida com propriedades anti-inflamatórias. Esta droga foi utilizada como tratamento contra a hanseníase pela primeira vez em 1962 (BROWN; HORGEZEIL, 1962). Tem atividade anti-micobacteriana, porém seu mecanismo de ação é ainda hoje desconhecido. É altamente lipofílica e liga-se preferencialmente aos domínios ricos em guanina-citosina (G-C) do DNA da bactéria (SCOLLARD et al., 2006). Até agora, os mecanismos moleculares de resistência para a clofazimina são desconhecidos e mesmo sendo utilizada por mais de quatro décadas os relatos de resistência medicamentosa são raros (MATSUOKA, 2010).

### **2.6.5 Claritromicina**

Este fármaco possui significativa atividade bactericida contra o *M. leprae*. Os pacientes com hanseníase LL recebem uma dose de 500 mg da droga que é capaz de matar 99% de bacilos viáveis após 28 dias e 99.9% após 56 dias. Sua atividade antimicrobiana é similar à eritromicina, inibindo a síntese

de proteínas pela ligação ao ribossomo e a diminuição dessa ligação está relacionada com resistência à claritromicina. As mutações associadas a este fármaco encontram-se no gene rRNA 23S (SCOLLARD et al., 2006)

### **2.6.6 Minociclina**

É o único fármaco dentro do grupo de tetraciclinas usada no combate do *M. leprae* e sua atividade bactericida contra este micro-organismo foi confirmada em 1987 (GELBER, 1987). É utilizada em combinação com rifampicina e ofloxacina na PQT (régime ROM), para os casos de lesões únicas paucibacilares (SLPBS). Como qualquer tetraciclina, a minociclina inibe a síntese de proteínas através da ligação à subunidade ribossomal 30S da bactéria. Ainda hoje, não existem dados de resistência para esta droga (MATSUOKA, 2010).

Segundo Gelber as propriedades bactericidas da minociclina contra o *M. leprae* devem-se às suas características lipofílicas, que possibilitam a entrada através da parede celular da bactéria. A resistência a esta droga não tem sido estudada porque seu uso é considerado recente em pacientes PB (SCOLLARD et al., 2006).

## **2.7 Resistência medicamentosa**

Para Singh & Cole, o desenvolvimento de micro-organismos resistentes às drogas é considerado uma grave ameaça no controle de qualquer doença infecciosa. A resistência aos medicamentos para o *M. leprae* é produto de mutações nos genes que codificam regiões alvos das drogas utilizadas na PQT. Essas mutações são espontâneas devidas a erros na replicação do DNA da bactéria (SCOLLARD et al., 2006).

Na hanseníase não existe uma definição oficial de bacilos multidroga resistentes, sendo este termo usado quando se encontram *M. leprae* resistentes à rifampicina e outro fármaco utilizado no esquema PQT (ROCHA et al., 2012).

No genoma do *M. leprae* existem regiões determinantes de resistência às drogas (DRDR). A resistência às drogas utilizadas na PQT evoluiu devido às mutações nessas regiões DRDR e entre os casos novos ainda é considerada rara (MATSUOKA et al., 2008). A maioria de pacientes com bacilos *M. leprae* resistentes aos fármacos da PQT são casos de recidiva (MAEDA et al., 2001;

MATSUOKA, 2010; KAI, M. et al., 2011; SINGH et al., 2011; SINGH; COLE, 2011).

A ocorrência de resistência às drogas na hanseníase manteve níveis baixos depois da introdução da PQT (KAI, MASANORI et al., 2011). Apesar da PQT visar a prevenção da disseminação de cepas de *M. leprae* resistentes às drogas, existem relatos de resistência aos componentes da PQT (MAEDA et al., 2001; MATSUOKA et al., 2008; KAI, MASANORI et al., 2011).

Ainda neste contexto, no ano de 1993 foi identificado um isolado apresentando resistência à dapsona e à rifampicina em Cuba (GONZÁLEZ et al., 1993). Estudos realizados na cidade de Bamako, Mali usando o método de Shepard identificaram bacilos *M. leprae* multidroga resistentes (MDR) em 1997. Para determinar a resistência à rifampicina e ofloxacina a amostra que apresentava bacilos MDR foi submetida a sequenciamento de DNA (CAMBAU et al., 1997). Nesta época, não foram realizados os testes de sequenciamento no gene *folp1*, não sendo possível a identificação do códon onde acontecera a mutação associada à resistência à dapsona. Recentemente foram identificados bacilos *M. leprae* resistentes em casos novos de hanseníase caracterizando uma resistência primária nas Filipinas, Indonésia e em algumas regiões do Vietnã, usando o sequenciamento de DNA (MAEDA et al., 2001; ASIA, 2009; KAI, MASANORI et al., 2011).

Bacilos *M. leprae* resistentes aos fármacos são capazes de disseminar-se desde um sítio de lesão específica para outros lugares do corpo num mesmo indivíduo. Deste modo, faz-se necessário avaliar vários locais de lesão no momento da coleta da amostra para verificar se existem diferenças entre os locais (MATSUOKA et al., 2010; KAI, MASANORI et al., 2011). Além disso, esses bacilos resistentes aos fármacos podem propagar-se para outros indivíduos levando ao surgimento de casos novos com resistência primária. Deste modo, a estratégia para prevenir o surgimento e a transmissão da hanseníase MDR requer o monitoramento e a rápida detecção de cepas resistentes de *M. leprae* (MAEDA et al., 2001; MATSUOKA et al., 2008).

A análise das regiões DRDR por técnicas de Biologia Molecular é simples, confiável e pretende substituir o método de Shepard (MATSUOKA et al., 2010). As técnicas moleculares são consideradas rápidas e de baixo custo em relação aos métodos fenotípicos. Ultimamente muitos laboratórios utilizam

o sequenciamento direto de DNA de produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos genes *folp1*, *gyrA* e *rpoB* do *M. leprae*, onde são encontradas as mutações associadas com resistência às drogas usadas no tratamento da hanseníase. Existem também métodos como a PCR Real Time e os microarranjos de DNA (SINGH; COLE, 2011).

### **2.7.1 Resistência à dapsona**

Inicialmente a dapsona foi usada em esquema monoterápico para o tratamento da hanseníase. Acredita-se que por possuir somente poder bacteriostático tenha sido possível com seu uso, a sobrevivência de bacilos *M. leprae* resistentes (KAI, MASANORI et al., 2011).

O primeiro informe de resistência à dapsona foi em 1953 (WOLCOTT; ROSS, 1953), mas não existiam métodos capazes de confirmar o dado. Com o teste de susceptibilidade às drogas utilizando camundongos foi possível a identificação e confirmação de resistência à dapsona e a outros fármacos (PETTIT; REES, 1964).

No Brasil, os primeiros relatos de resistência a esta droga apareceram nas décadas de 60 e 70 como resultado do uso inapropriado da dapsona (NOGUEIRA et al., 1995). Em 1985, no Estado do Amazonas foi realizado estudo que demonstrou sulfono resistência secundária com comprovação laboratorial em seis pacientes do antigo leprosário da cidade de Manaus (TALHARI et al., 1985). Em 1993 foi descrita a resistência múltipla à dapsona e à rifampicina em quatro pacientes no Estado de São Paulo (OPROMOLLA et al., 1993). Esses achados confirmam a circulação de cepas resistentes de *M. leprae* no Brasil há mais de trinta anos.

Através do método de Shepard, a resistência à dapsona foi classificada em três graus: baixo, intermédio e alto (MATSUOKA et al., 2008; MATSUOKA, 2010). Assim uma concentração de 0,0001% de dapsona no teste de Shepard não se relaciona com mutação no gene *folp1* e é considerada sem significância clínica, entendendo que a administração de 0,0001 g de dapsona por 100 g na dieta do camundongo equivale à dosagem de 1 mg de dapsona diária em um humano. A dose atual de dapsona para os pacientes é de 100 mg por dia (MATSUOKA, 2010).

Com a descoberta do genoma do *M. leprae* foram revelados dois genes

relacionados com a biossíntese de folato, chamados *folp1* e *folp2* (COLE et al., 2001). Esta descoberta foi importante porque a dapsona tem como alvo a DPHS inibindo competitivamente seu substrato o ácido para-aminobenzoico (PABA), conseqüentemente a biossíntese de ácido fólico é inibida. A resistência à dapsona é associada às mutações nos códons 53 e 55 no gene *folp1*, enquanto que ainda nenhuma mutação no gene *folp2* foi associada com a resistência à esta droga (SINGH; COLE, 2011).

Todas as mutações até agora identificadas no gene *folp1* foram confirmadas pelo método de Shepard. As substituições de aminoácidos estão localizadas no códon 53: treonina (ACC) → isoleucina (ATC), alanina (GCC), valina (GTC), alanina (SAITO et al.) ou arginina (AGG) e no códon 55: prolina (CCC) → leucina (CTC), arginina (CGC) ou serina (TCC). Uma nova mutação no códon 48 foi também detectada em espécimes clínicos, porém os dados não foram comprovados ou descritos (MATSUOKA, 2010; NAKATA et al., 2011).

### **2.7.2 Resistência à rifampicina**

A rifampicina tem como alvo a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*. Este fármaco liga-se à subunidade  $\beta$  e inibe a transcrição de RNA mensageiro (MATSUOKA, 2010). A mutação acontece num pequeno trecho do gene, chamado de região determinante de resistência às drogas (RDRD). Assim, mutações nas regiões altamente conservadas do gene *rpoB* conferem resistência à rifampicina para várias micobactérias (BAUMSTARK et al., 1977; WILLIAMS et al., 1994).

O primeiro achado de resistência a rifampicina foi no ano de 1976 (JACOBSON; HASTINGS, 1976). As mutações até agora identificadas encontram-se nos códons 407, 410, 420, 425 e 427, assim como, inserções entre os códons 408 e 409 podem conferir resistência à rifampicina. No códon 407 existe a troca de glutamina (CAG) → valina (GTG). No códon 410 foi identificada a mudança do ácido aspártico (GAT) → tirosina (TAT), no códon 420 troca a histidina (CAC) → ácido aspártico (GAC), no códon 425 troca serina (TCG) → leucina (TTG) (em alta frequência, similar a descrita para o *M. tuberculosis*) ou fenilalanina (ATG) → metionina (TTC). No códon 427 existe uma substituição de leucina (CTG) → valina (GAG). Também outras mutações já foram identificadas, por exemplo, nas posições 416: serina (TCG) → cisteína

(TGT) e 408 (glicina → ácido aspártico), porém ainda não está esclarecida sua associação com resistência à rifampicina (MAEDA et al., 2001; MATSUOKA, 2010)

Além disso, existe o primeiro relato de mutação na posição 516 do gene *rpoB* do *M. leprae* que anteriormente só era conhecida na *Escherichia coli* (JIN; GROSS, 1988), onde acontece a troca do ácido aspártico → asparagina. Foi identificada também uma mutação na posição 526 previamente demonstrada somente no *M. tuberculosis* trocando o aminoácido histidina → tirosina (MAEDA et al., 2001; SINGH; COLE, 2011).

### **2.7.3 Resistência à ofloxacina**

A ofloxacina, uma droga do grupo das fluoroquinolonas, inibe a replicação do DNA mediante a ligação com a subunidade A da DNA girase no gene *gyrA*. Esta droga foi incluída no novo regime rifampicina, ofloxacina e minociclina conhecido como ROM, utilizado no tratamento da hanseníase PB. Porém o primeiro achado de resistência a esta droga foi em 1994 (CAMBAU et al., 1997). Posteriormente também foram descritos mais dois casos de pacientes com recidiva após tratamento com ofloxacina no Japão em 2000 e 2003 (MATSUOKA, 2010). Foi identificado também um isolado proveniente do Haiti mostrando resistência múltipla à ofloxacina e rifampicina (KAI, M. et al., 2011). Mutações associadas com o gene *gyrA* são comumente relatadas em micobactérias (CAMBAU et al., 1994; TAKIFF et al., 1994).

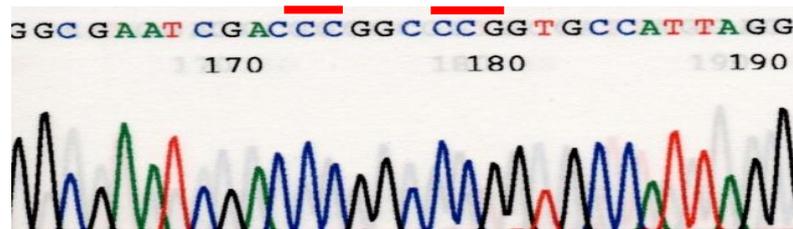
As mutações identificadas até o momento no gene *gyrA* encontram-se no códon 89: glicina (GGA) → cisteína (TGC) e no códon 91: alanina (GCA) → valina (GTA) (MATSUOKA et al., 2008; MATSUOKA, 2010; MATSUOKA et al., 2010). Também substituições de aminoácidos nos códons 91 (serina) e 94 (asparagina) são associadas com resistência às quinolonas (MATSUOKA, 2010).

Acredita-se que mutações nos códons 89, 92 e 95 relacionadas com resistência às quinolonas por parte do *M. tuberculosis* possam conferir também resistência para o *M. leprae*, mas ainda tais casos não foram descritos (SINGH; COLE, 2011). No caso do *M. tuberculosis* foi identificada a mutação que troca o aminoácido glicina → cisteína no códon 89 do mesmo gene (MAEDA et al., 2001).

Até o momento, ainda são conhecidos poucos casos de *M. leprae* com mutações na DRDR às quinolonas no gene *gyrA* (MAEDA et al., 2001).

Figura 6A. Mutações associadas nos genes do *M. leprae*. que conferem resistência medicamentosa à dapsona.

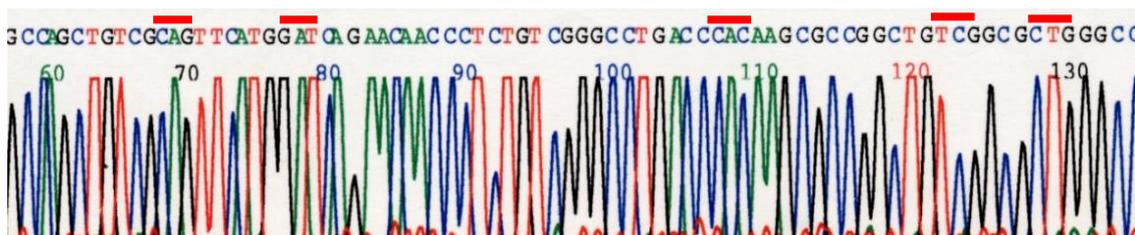
**Figura 6A. *folP1*: Treonina (ACC) 53 e Prolina (CCC) 55**



Fonte: (Matsuoka, 2008), adaptado.

Figura 6B. Mutações associadas nos genes do *M. leprae*. que conferem resistência medicamentosa à rifampicina.

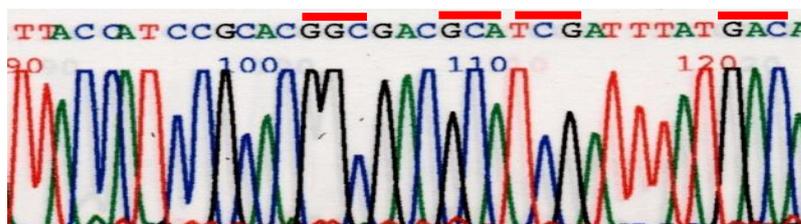
**Figura 6B. *rpoB*:Glicina (CAG) 407, Ácido Aspártico(GAT) 410, Histidina (CAC) 420, Serina (TCG) 425, Leucina (CTG) 427**



Fonte: (Matsuoka, 2008), adaptado.

Figura 6C. Mutações associadas nos genes do *M. leprae*. que conferem resistência medicamentosa às quinolonas.

**Figura 6C. *gyrA*: Glicina (GGC) 89, Alanina (GCA) 91, Serina (TCG) 92, Ácido Aspártico (GAC) 95**



Fonte: (Matsuoka, 2008), adaptado.

## 2.8 Diagnóstico de resistência às drogas

### 2.8.1 Método de Shepard

O *M. leprae* é um micro-organismo não cultivável por métodos tradicionais *in vitro*. Porém existe uma técnica capaz de permitir o crescimento deste bacilo *in vivo* denominada método de Shepard (SHEPARD, 1960). Este método permitiu que em 1964 fosse confirmada a resistência à dapsona através da inoculação de bacilos de isolados de pacientes com hanseníase nas patas de camundongos *BALB/c* (PETTIT; REES, 1964). Para a realização desta técnica faz-se necessária grande quantidade de bacilos obtidos a partir de amostra de biópsia de lesão contendo *M. leprae* que são inoculados na parte posterior das patas dos camundongos. O crescimento da bactéria é analisado entre as semanas 25 e 30 posteriores à inoculação onde são encontrados  $10^5$  a  $10^6$  bacilos (MATSUOKA, 2010).

Entre os camundongos inoculados existe um grupo controle e outros grupos que recebem o tratamento com as diferentes drogas testadas, as quais são administradas por via oral ou incorporadas à dieta do animal. Ao visualizar o crescimento do bacilo no grupo controle, é realizada a contagem dos bacilos entre os diferentes grupos experimentais. Para ser considerado resistente, um isolado deve ter proliferado na pata do camundongo tratado com a medicação. Essa técnica ainda constitui uma ferramenta padrão para constatar a

resistência às drogas. No entanto, o método de Shepard não é um método de diagnóstico prático para grande número de amostras (MATSUOKA et al., 2010).

Quadro 4. Critérios de diagnóstico de resistência às drogas em camundongos.

<b>Droga</b>	<b>Concentração na dieta (%)</b>
Dapsona	0,0001;0,001; 0,01*
Clofazimina	0,0001-0,001
Rifampicina	0,003-0,01
Ofloxacina	0,15
Esparfloxacina	0,02
Clarithromicina	0,03
Minociclina	0,08

\*Nível baixo, intermediário e alto de resistência respectivamente.

Fonte: (Matsuoka, 2010), adaptado.

### **2.8.2 LDS-DA, Método de microarranjos de DNA**

O sequenciamento de DNA é um método usualmente aplicado em países com grande crescimento científico e econômico, o que é uma desvantagem para países com baixo desenvolvimento nessas áreas e com uma alta prevalência de hanseníase (MATSUOKA, 2010).

O microarranjo de DNA para a susceptibilidade às drogas da hanseníase (LDS-DA) é uma técnica que tem como base a hibridização do DNA. O método é uma nova ferramenta da Biologia Molecular, que se caracteriza por ser rápido, simples, com alta reprodutibilidade e sensibilidade e fácil acessibilidade para as regiões geográficas onde existe pouco progresso nas áreas genéticas (MATSUOKA et al., 2008; MATSUOKA, 2010). Para a criação do teste foram selecionadas uma série de oligonucleotídeos com as mutações conhecidas dos genes *folp1*, *gyrA* e *rpoB* relacionados com a resistência medicamentosa e suas respectivas sequências selvagens do *M. leprae*. As sequências desses nucleotídeos foram fixadas covalentemente na superfície de uma lâmina de vidro revestida de policarbodiimida como sonda de captura. Das amostras biológicas é realizada PCR com iniciadores marcados com biotina. Os fragmentos de DNA marcados com biotina capturados pelas sondas na lâmina são detectados pelo complexo biotina-avidina *horseradish* e visualizados

através da adição do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina peroxidase (*Sigma-Aldrich*). Finalmente, é usado um *scanner* convencional e as imagens visualizadas dos *spots* são registradas em um computador. A intensidade de cada *spot* é analisada para determinar se as sequências na lâmina correspondem a sequências selvagens ou mutantes. Para que um resultado seja considerado válido devem aparecer os *spots* nos controles positivos (GP), de acordo com a Figura 7A.

Este método teve uma concordância de 97,1% para o gene *folP1*, 99,3% para o gene *rpoB* e 100% para o gene *gyrA* quando comparado com o sequenciamento direto de DNA de amostras de pacientes de hanseníase provenientes de Mianmar e Filipinas (MATSUOKA, 2010).

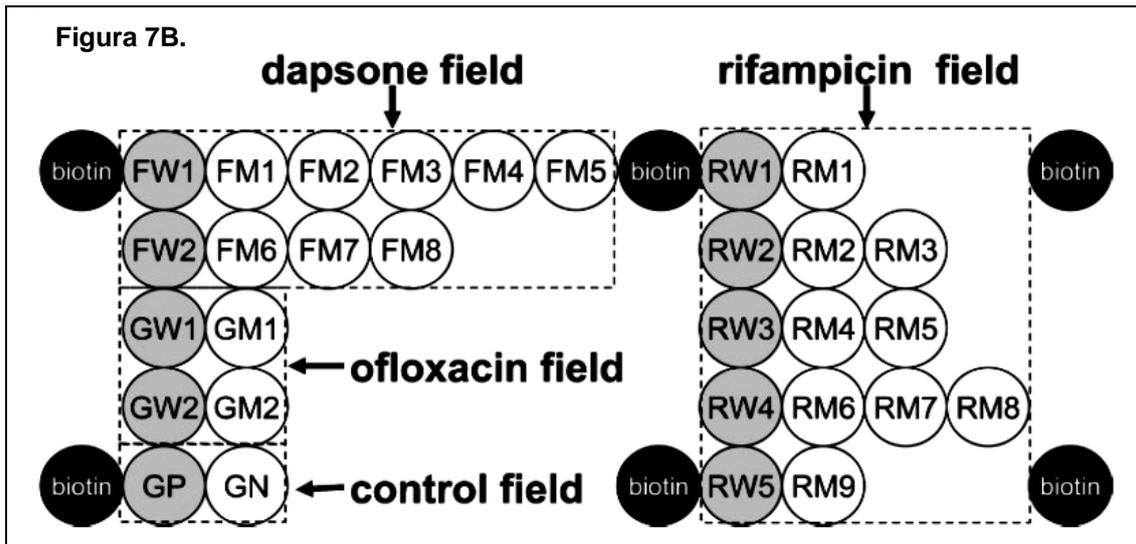
Através deste procedimento é possível detectar simultaneamente a maioria das mutações descritas para os três genes alvos que conferem resistência à dapsona, à rifampicina e às quinolonas (MATSUOKA et al., 2008).

Figura 7. A. Sequências de oligonucleotídeos na lâmina de microarranjos e as mutações associadas com resistência dos três genes. B. Distribuição das sequências (*spots*) no microarranjo de DNA.

Figura 7A.

Drug	Gene	Codon no.	Capture probes for wild-type	Capture probes for mutants
Dapsone	<i>folP1</i>	53	FW1 : GTGGCGAATCG <u>ACCC</u> GG	FM1 : TGGCGAATCGG <u>CCC</u> CGG FM2 : TGGCGAATCGG <u>TCC</u> CGG FM3 : TGGCGAATCGA <u>TCC</u> CGG FM4 : GCGGAATCGA <u>GCG</u> CGG FM5 : TGGCGAATCGA <u>GAC</u> CGG
		55	FW2 : CGG <u>CCC</u> GGTGCCATTA	FM6 : GACCGG <u>TCC</u> GGTGCC FM7 : GACCGG <u>GCG</u> GGTGCC FM8 : 8GACCGG <u>CTC</u> GGTGCC
Rifampicin	<i>rpoB</i>	407	RW1 : AGCTGT <u>CGCAG</u> TTCATG	RM1 : AGCTGT <u>CGG</u> TGTTTCAT
		410	RW2 : TTCATG <u>GATC</u> AGAA	RM2 : TTCATG <u>AATC</u> AGAACAA
		420	RW3 : CCTGAC <u>CCACA</u> AGCGC	RM3 : TTCATG <u>TATC</u> AGAACAA RM4 : GCCTGAC <u>CTACA</u> AGCGC
		425	RW4 : CGCCGACTG <u>TCGG</u> CGCTG	RM5 : GCCTGAC <u>CGACA</u> AGCGC RM6 : 6CCGACTG <u>ATGG</u> CGC
		427	RW5 : GCGCTGGGG <u>CCCGGG</u> TG	RM7 : GCCGACTG <u>TTGG</u> CG RM8 : GCCGACTG <u>TTCC</u> CG RM9 : GGCGCCGGGG <u>CCCGGG</u> TG
Ofloxacin	<i>gyrA</i>	89	GW1 : ATCCGCACGG <u>G</u> GACGCA	GM1 : ATCCGCA <u>CTGC</u> GACGCA
		91	GW2 : CGGCGACG <u>CATC</u> GATTT	GM2 : CGGCGA <u>CTATC</u> GATTT
Positive hybridization control in <i>gyrA</i>			GP : GGACCGTAGCCACGCTAA	
Negative hybridization control in <i>gyrA</i>			GN : GGACCGTCATCAGCTAA	

Fonte: (Matsuoka et al., 2008), adaptado.



Fonte: (Matsuoka et al., 2008), adaptado.

### 2.8.3 Sequenciamento de DNA

Além do fator ético envolvido nos testes com animais e do tempo necessário para ocorrer o crescimento do bacilo em camundongos, o método de Shepard precisa de bacilos viáveis para sua realização. Comumente as amostras são congeladas e enviadas a laboratórios especializados para esse fim. Estes laboratórios, geralmente se localizam em áreas distantes ao lugar de detecção dos casos suspeitos de resistência aos medicamentos (MATSUOKA, 2010).

Com a descoberta das regiões genômicas específicas de *M. leprae* onde acontecem as mutações que conferem resistência foram desenvolvidos ensaios moleculares baseados no DNA, simplificando assim os testes de susceptibilidade às drogas (MATSUOKA, 2010). Assim, a Biologia Molecular permitiu desenvolver instrumentos úteis para a identificação de bacilos *M. leprae* resistentes à PQT. Um exemplo dessas técnicas é o sequenciamento de fragmentos de DNA das regiões alvos de resistência medicamentosa (MATSUOKA et al., 2008).

A partir de amostras biológicas de pacientes com hanseníase realiza-se PCR e em seguida os produtos amplificados para cada gene são purificados e sequenciados diretamente para determinar se existe a substituição ou inserção de aminoácidos nos códons das regiões determinantes de resistência às

drogas (MATSUOKA et al., 2010).

Entre as vantagens do sequenciamento do DNA está sua alta reprodutibilidade. Contudo, esta técnica ainda não está disponível para avaliar a resistência à clofazimina e à minociclina, apesar de que os dados apontem para uma taxa de resistência à clofazimina desprezível e à não existência de informações de resistência à minociclina (MATSUOKA, 2010).

A OMS incorporou no programa de vigilância da hanseníase o uso do sequenciamento direto dos fragmentos da PCR em 2008, com o objetivo de supervisionar o nível de resistência medicamentosa entre os casos novos e os casos de recidiva (ASIA, 2009). Entre os países selecionados para essa tarefa se encontram a Índia, a China, o Brasil, Mianmar, o Vietnã, as Filipinas, a Indonésia, a Colômbia, a Etiópia e Mali, os quais contam com laboratórios de referência para tal finalidade.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

Identificar mutações nos genes envolvidos na resistência à dapsona, à rifampicina e à ofloxacina em *Mycobacterium leprae* proveniente de pacientes com hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta.

#### **3.2 Específicos:**

1. Detectar a resistência medicamentosa de *M. leprae* pelo método de sequenciamento direto de nucleotídeos de DNA;
2. Detectar a resistência medicamentosa de *M. leprae* pela técnica de microarranjos de DNA (LDS-DA) descrita por Matsuoka et al., 2008;
3. Comparar os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com os resultados obtidos pelas técnicas moleculares;
4. Identificar bacilos *M. leprae* resistentes entre pacientes tratados através da monoterapia com dapsona;
5. Investigar possível associação entre recidiva (à PQT ou à monoterapia) e resistência medicamentosa.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Modelo do estudo**

Estudo prospectivo experimental de casos, de coorte transversal, com componente analítico.

### **4.2 Informações éticas**

Todos os procedimentos descritos neste projeto tiveram o consentimento do Comitê de Ética (CEP) em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta (Aprovado CEP-FUAM nº 005/2009).

### **4.3 Universo de estudo**

#### **4.3.1 População de estudo**

Pacientes com hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM), centro de referência em Dermatologia, localizado na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil.

#### **4.3.2 Critérios de elegibilidade**

##### **4.3.2.1 Participantes**

Pacientes com hanseníase atendidos na FUAM, no período de maio de 2009 a janeiro de 2011 de acordo com a demanda espontânea do setor de hanseníase.

##### **4.3.2.2 Critérios de inclusão**

No estudo foram incluídos pacientes com hanseníase (paucibacilares e multibacilares) atendidos na FUAM, de ambos os sexos, com idade de 18 a 65 anos, entre casos novos, recidivas, reingressos e pacientes que realizavam acompanhamento do tratamento da PQT, que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o TCLE (APÊNDICE D). A classificação da hanseníase foi baseada em critérios clínicos, histopatológicos e índice bacteriológico.

#### **4.3.2.3 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo: pacientes gestantes, indígenas e pacientes com outras dermatoses que foram inclusos por apresentar lesões de pele parecidas com hanseníase, porém após realizar baciloscopia e outros exames complementares foi diagnosticada outra doença de pele.

#### **4.3.3 Amostragem**

No estudo foram incluídos 197 pacientes com hanseníase do Projeto MCT/CT Amazônia 2008, Processo 5758/2008-2, intitulado “Avaliação da resistência antimicrobiana de *Mycobacterium leprae* pelo método de microarranjos de DNA”, sob a coordenação da Dra. Maria das Graças da Cunha. O período de inclusão dos pacientes compreendeu os meses de maio de 2009 a janeiro de 2011. Os pacientes foram classificados no projeto como negativos e positivos com base ao resultado do IB, como casos de 1ª vez (casos novos) ou recidiva (se tiveram antecedentes clínicos de episódios de hanseníase anterior ao estudo). No projeto também foram inclusos pacientes considerados reingressos e outros que faziam acompanhamento da PQT. No estudo foram realizados testes moleculares de resistência às drogas inclusive nos pacientes com baciloscopia negativa.

A coleta da baciloscopia das lesões de pele foi realizada após assepsia e isquemia do local, seguindo o procedimento padrão. As amostras foram colocadas em álcool 70% ou depositadas em FTA® *elutecard* (Cat. no. WB120401; Whatman Inc., Florham Park, N.J., USA) e armazenadas a 25°C.

### **4.4 Detalhamentos de procedimentos**

#### **4.4.1 Extração do DNA**

Das amostras de baciloscopia coletadas foi realizada a extração do DNA do *M. leprae* segundo o protocolo do Kit DNase da QIAGEN com algumas modificações (Apêndice A). Para as amostras coletadas com FTA® *elute card* foi utilizado o protocolo proposto pelo fabricante (Apêndice B). O DNA extraído

foi armazenado a -20°C até seu uso na PCR.

#### 4.4.2 Amplificação dos fragmentos gênicos

##### 4.4.2.1 Primeira amplificação: Iniciadores KAI

Com o DNA do *M. leprae* extraído das amostras biológicas foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde as regiões alvos dos genes: *folp1*, *gyrA* e *rpoB* foram amplificadas usando um par de iniciadores para cada gene (20 nM) previamente descritos por Kai et al., 2011 (Quadro 5). Para a realização da PCR foi utilizada AmpliTaq Gold® 360 Master Mix. As condições da PCR foram iniciadas com incubação a 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de anelamento a 58°C para os genes *folp1* e *gyrA*, e de 63°C para o gene *rpoB* por 30 segundos; posteriormente os fragmentos foram estendidos a 72°C por 30 segundos, continuando com a desnaturação a 94°C por 30 segundos, finalizando com extensão por 5 minutos a 72°C. Para tal finalidade, foi usado o termociclador Veriti® 96-Well *Fast Thermal Cycler* (AppliedBiosystem). Cada mix de PCR preparado contou com controles negativos para validar a reação.

A Tabela 3 descreve o volume dos reagentes usados para a primeira PCR (PCR-Kai). As amostras foram testadas individualmente para os três genes alvos: *folp1*, *gyrA* e *rpoB*. O volume final de cada reação foi 25µL.

Tabela 3. Descrição dos volumes e reagentes utilizados na PCR-Kai.

	Água	Iniciadores	AmpliTaq Gold <i>Master Mix</i>	DNA
1 X 25 µL	8,75 µL	1,25 µL	12,5 µL	2,5 µL

Quadro 5. Descrição da sequência dos iniciadores utilizados na primeira PCR-KAI.

Gene	Sequência dos Iniciadores	Amplicon
<i>folp1</i> senso	GCAGGTTATTGGGGTTTTGA	312
<i>folp1</i> antisenso	CCACCAGACACATCGTTGAC	
<i>gyrA</i> senso	ACGCGATGAGTGTGATTGTGG	336
<i>gyrA</i> antisenso	TCCCAAATAGCAACCTCACC	
<i>rpoB</i> senso	CAGACGCTGATCAATATCCGT	358
<i>rpoB</i> antisenso	CAGCGGTCAAGTATTCGATC	

Fonte: (Kai et al., 2011), adaptado.

#### 4.4.2.2 *Nested* PCR

Dos fragmentos amplificados na PCR-Kai foram realizados *Nested* PCR. Para tanto, 10µL dessa reação foram misturados a 90µL de água de injeção para completar uma diluição de 1:10. O procedimento foi realizado individualmente para cada gene, utilizando-se 2,5 µL do produto da diluição como DNA para o *Nested* PCR. Foi usado um par de iniciadores específicos para cada gene, propostos por Kai et al., 2011 (Quadro 6). Para a realização da *Nested* PCR foi utilizada AmpliTaq Gold® 360 *Master Mix*. As condições desta *Nested* PCR são idênticas às descritas anteriormente no procedimento da PCR-Kai. O mix da *Nested* também contou com o controle negativo que validava a PCR.

Tabela 4. Descrição dos volumes e reagentes utilizados no *Nested* PCR.

	Água	Iniciadores (Senso/Antisenso)	AmpliTaQ Gold Master Mix	DNA
1 X 25 µL	8,75 µL	0,625 µL Total 1,25 µL	12,5 µL	2,5 µL da diluição 1:10 1ªPCR

Quadro 6. Descrição dos iniciadores utilizados na *Nested* PCR.

Gene	Sequência dos Iniciadores	Amplicon
<i>folp1</i> senso	CTTGATCCTGACGATGCTGT	245
<i>folp1</i> antisenso	ACATCGTTGACGATCCGTG	
<i>gyrA</i> senso	GATGGTCTCAAACCGGTACA	291
<i>GyrA</i> antisenso	CCCAAATAGCAACCTCACCA	
<i>rpoB</i> senso	CAATATCCGTCCGGTGGTC	337
<i>rpoB</i> antisenso	GTATTCGATCTCGTCGCTGA	

Fonte: (Kai et al., 2011), adaptado.

#### 4.4.2.3 PCR Matsuoka

Para a realização da terceira PCR foram utilizados três pares de iniciadores marcados com biotina para cada gene (*folp1*, *gyrA* e *rpoB*) em uma mesma PCR descritos por Matsuoka et al., 2008. Na reação foi usado 1 µL do produto de amplificação da *Nested* PCR de cada gene, obtendo-se volume final de reação de 30 µL. Para a realização da PCR-Matsuoka foi utilizada Ampli Taq Gold® 360 *Master Mix*. Cada mix preparado contou com controle negativo como método de validar a reação.

As condições da PCR foram iniciadas com incubação a 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de anelamento a 58°C por 30 segundos; posteriormente foram estendidos a 72°C por 30 segundos, continuando com a desnaturação a 94°C por 30 segundos e finalizando com uma extensão por 5 minutos a 72°C. Este procedimento foi realizado em termociclador Veriti® 96-*Well Fast Thermal Cycler* (AppliedBiosystem).

Tabela 5. Descrição dos volumes e reagentes utilizados na PCR-Matsuoka.

	Água	Iniciadores ( <i>folp1</i> , <i>gyrA</i> e <i>rpoB</i> )	AmpliTaq Gold Master Mix	DNA
1 X 30 µL	7,5 µL	1,5µL	15 µL	1 µL cada gene <i>Nested</i> PCR

Quadro 7. Iniciadores da terceira PCR.

Gene	Sequência dos Iniciadores	Amplicon
<i>folp1</i> senso	GTGAGTTTGGCGCCAGTGCA	119
<i>folp1</i> antisenso	Biotina-GCAAGTTCTTTTACGACAGG	
<i>gyrA</i> senso	TGAGACTCCGGTTTCCGCC	139
<i>gyrA</i> antisenso	Biotina-CAGCGACCACGGCTGCGCC	
<i>rpoB</i> senso	TCGCCGCTATCAAGGAATTC	127
<i>rpoB</i> antisenso	Biotina-TCACGCGACAAACCACCCGG	

Fonte: (Matsuoka et al., 2008), adaptado.

#### 4.4.2.4 Eletroforese

Para a eletroforese foi preparado gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA, pH 8.0 (TBE). O gel foi corado utilizando SYBR® *Safe* DNA Gel *Stain*. Dos produtos amplificados da *Nested* PCR eram utilizados 10 µL e misturados com 1 µL de *loading dye* 3X; em seguida, estes produtos corados foram pipetados no gel de agarose 2%, as condições da corrida foram 45 minutos a 75 V e 80 mA. A amplificação dos fragmentos de DNA era visualizada com ajuda de luz azul. O tamanho dos fragmentos esperados é detalhado no Quadro 6, sendo usado um controle de peso molecular (*ladder*) de 100 bp. Quando constatada a amplificação dos produtos da *Nested* PCR no gel de eletroforese, foram recortadas as bandas com uma lâmina de bisturi para a posterior purificação de DNA a partir do gel (Anexo 4). Da PCR-Kai não

foi realizada eletroforese.

Para a PCR-Matsuoka o gel de agarose foi preparado em concentração de 4% em TBE corado com SYBR® *Safe DNA Gel Stain* onde são adicionados 8 µL do produto amplificado da PCR-Matsuoka misturados com 1 µL de *loading dye* 3X por poço. A corrida eletroforética foi realizada por 60 minutos, a 75 V e 80 mA. Os fragmentos amplificados foram visualizados com ajuda de luz azul. Foi usado um controle de peso molecular (*ladder*) de 100 bp. O tamanho dos *amplicons* foi detalhado no Quadro 7.

O resultado da amplificação dos produtos da *Nested* PCR e PCR-Matsuoka foi também avaliado de forma semi-quantitativa através de cruzes, sendo “NEG” correspondente ao fragmento não amplificado visualmente, 1+ correspondente à banda de intensidade fraca, 2+ à banda de intensidade média e 3+ à banda de intensidade forte, com o intuito de registrar os dados de uma forma mais sistemática.

#### **4.4.2.5 LDS-DA, Microarranjos de DNA**

Os produtos amplificados da PCR-Matsuoka foram processados pela técnica de microarranjos de DNA descrita por Matsuoka et al, 2008 (Apêndice C). Para o ensaio foram utilizados 2 µL do produto da PCR de cada gene ou 6 µL do produto da PCR Multiplex dos três genes os que foram misturados a 34 µL de solução de hibridização *UniHyb*. A solução foi aquecida a 98°C por 5 minutos e esfriada rapidamente com gelo. Seguidamente, essa solução foi aplicada na lâmina de microarranjos de DNA e incubada a 42°C por 60 minutos. Após este passo, a lâmina foi colocada em solução de lavagem a 47°C por 20 minutos. Os fragmentos hibridizados de DNA ligados à biotina foram detectados na lâmina através interação do complexo de avidina-biotina *horseradish* e foram visualizados através de substrato TMB peroxidase. Os *spots* resultantes foram digitalizados utilizando um *scanner* convencional e computador. A intensidade de cor de cada *spot* que cobre a mesma região de cada gene foi avaliada e comparada com a Figura 7B para determinação dos sítios de resistência (MATSUOKA et al., 2008).

#### 4.4.2.6 Sequenciamento de DNA

Antes de realizar o sequenciamento das amostras, os fragmentos eram purificados após a *Nested PCR*, utilizando o kit comercial *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, Wisconsin). Para tal etapa, foi seguido o protocolo proposto pelo fabricante. O DNA obtido da purificação dos produtos da *Nested PCR* foi quantificado usando em espectrofotômetro (*ACTGene*, ASP-3700). Este DNA foi armazenado a -20°C até a realização da etapa de preparação da reação de sequenciamento, onde dependendo da concentração de DNA obtido era determinada a quantidade em µL que seriam adicionados na reação. Os iniciadores utilizados para tal finalidade foram os mesmos utilizados na *Nested PCR* (Quadro 6). Foram utilizados os iniciadores em ambas as direções da dupla fita.

As condições da reação de sequenciamento foram as seguintes: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguido de 15 ciclos de desnaturação (96°C por 10 segundos), hibridização (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 75 segundos) 5 ciclos de desnaturação (96°C por 10 segundos), hibridização (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 90 segundos), 5 ciclos de desnaturação (96°C por 10 segundos), hibridização (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 2 minutos).

Após a realização da reação de sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando o método de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio (ANEXO II).

Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise de sequenciamento direto de DNA com o intuito de detectar as mutações já descritas através da eletroforese capilar, utilizando o sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e polímero POP-7 (Applied Biosystems). Este método permite também a detecção de novos sítios de mutação ou inserção nos genes avaliados.

As regiões alvos dos genes *folp1* (acesso AL 583917, gene ML583917), *rpoB* (acesso AL583923, gene ML1891) e *gyrA* (acesso AL 583917, gene ML0006) obtidas do *GenBank* foram os padrões de referência para comparação e identificação de mutações nas amostras dos pacientes de hanseníase analisados neste estudo.

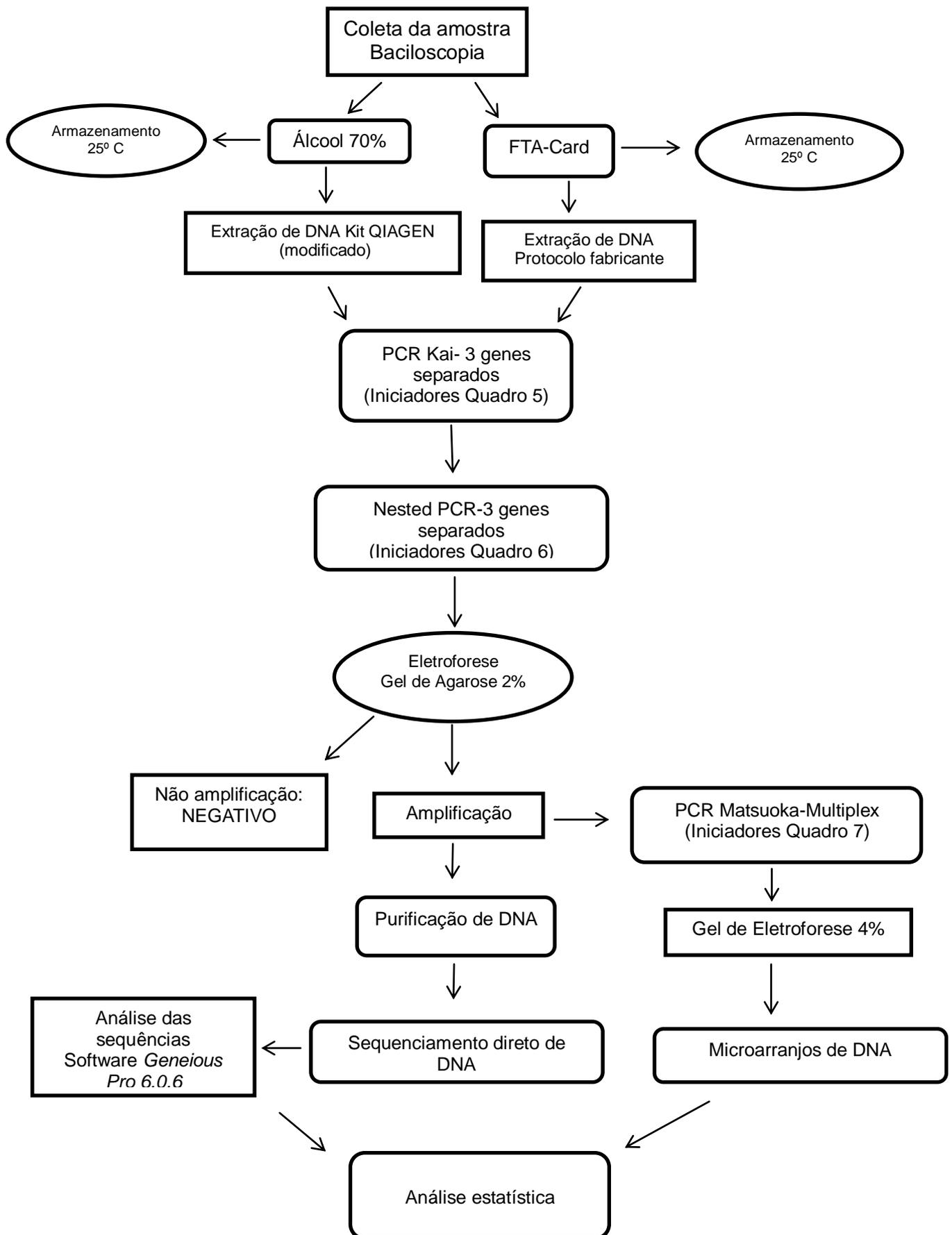
As sequências, obtidas do sequenciador genético *BigDye Terminator* v3.1 (AppliedBiosystem), foram comparadas com as sequências de cepas de referência onde as mutações foram marcadas usando o software *Geneious Pro* 6.0.6 para analisar e identificar as mesmas.

#### **4.4.2.7 Análise estatística**

As frequências dos dados como sexo dos pacientes, mutações identificadas nos genes estudados, resultado das LDS-DA foram calculadas por simples contagem.

Foi utilizada a tabelas de contingência para comparar os resultados do sequenciamento de DNA com o BI das amostras.

## 5. FLUXOGRAMA



## 11. REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2005. Programa nacional de eliminação da hanseníase. *Nota técnica: prevalência da hanseníase no Brasil – 2004*. Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde/SVS. 2010. Instruções Normativas das ações de controle da hanseníase no SUS. Portaria no. 3.125/SVS-SAS. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125\\_07\\_10\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125_07_10_2010.html) (acessado 18/07/2014)

World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/lep/leprosy/en/index.html> (acessado em 15/08/2011).

World Health Organization. <http://www.who.int/lep/microbiology/en/index.html> (acessado em 15/08/2011).

World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/lep/mdt/en/index.html> (acessado em 15/08/2011).

World Health Organization. <http://www.who.int/lep/diagnosis/en/index.html> (acessado em 15/08/2011).

World Health Organization (WHO). Global leprosy situation 2011. Weekly Epidemiological Record 2011. No. 36, 389-400. <http://www.who.int/wer/en>

World Health Organization (WHO). Global leprosy situation 2012. Weekly Epidemiological Record 2012. No. 34, 87, 317-328. <http://www.who.int/wer/en>

ANTUNES, S., SOARES, C., HEISE, C., FLORIANO, M., BARRETO, J., NERY, J., ANDRADA, N. Hanseníase Neural Primária. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2011; 1-26.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 36, n. 3, p. 373-82, 2003.

ASIA, W. H. O. R. O. F. S. E. Guidelines for global surveillance of drug resistance in leprosy. World Health Organization (WHO), Regional Office for South-East Asia, 2009.

BARRETO, J.; NOGUEIRA, M. E. S.; DIORIO, S. M. et al. Sorologia rápida para hanseníase (teste ML Flow) em pacientes dimorfos classificados como paucibacilares pelo número de lesões cutâneas: uma ferramenta útil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, p. 45-47, 2008.

BAUMSTARK, B. R.; SPREMULLI, L. L.; RAJBHANDARY, U. L. et al. Initiation of protein synthesis without formylation in a mutant of *Escherichia coli* that grows in the absence of tetrahydrofolate. Journal of Bacteriology, v. 129, n. 1, p. 457-471, 1977.

BROWNW, S.; HORGEZEIL, L. B663 in the treatment of leprosy: prelliminary report of a pilot trial. Lep Review, v. 33, n. 1, p. 6-11, 1962.

CAMBAU, E.; PERANI, E.; GUILLEMIN, I. et al. Multidrug-resistance to dapson, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. The Lancet, v. 349, n. 9045, p. 103-104, 1997.

CAMBAU, E.; SOUGAKOFF, W.; BESSON, M. et al. Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. Journal of Infectious Diseases, v. 170, n. 2, p. 479-483, 1994.

COLE, S.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, 2001.

CONTIN, L. A.; ALVES, C. J. M.; FOGAGNOLO, L. et al. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 1, p. 91-95, 2011.

CUNHA, M.; VIRMOND, M.; SCHETTINI, A. P. et al. OFLOXACIN multicentre trial in MB leprosy FUAM-Manaus and ILSL-Bauru, Brazil. *Lepr Rev*, v. 83, n. 3, p. 261, 2012.

DA SILVA ROCHA, A.; DOS SANTOS, A. A. C.; PIGNATARO, P. et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggests the occurrence of reinfection of bacterial population shift during disease relapse. *J Med Microbiol*, v. 60, n. 10, p. 1441-1446, 2011.

DE MEDEIROS BRITO, M. D. F.; XIMENES, R. A. A.; GALLO, M. E. N. Retreatment of leprosy relapse. O retratamento por recidiva em hanseníase. *An Bras Dermatol*, v. 80, n. 3, p. 255-60, 2005.

DEPS, P. D.; ANTUNES, J. M. A. P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J. Detection of *Mycobacterium leprae* infection in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) using the rapid ML Flow test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 1, p. 86-87, 2007.

GELBER, R. H. Activity of minocycline in *Mycobacterium leprae*-infected mice. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 156, n. 1, p. 236-239, 1987.

GÓMEZ-VALERO, L.; ROCHA, E. P.; LATORRE, A. et al. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Research*, v. 17, n. 8, p. 1178-1185, 2007.

GONZÁLEZ, A.; MAESTRE, J.; HERNÁNDEZ, O. et al. Survey for secondary dapsona and rifampicin resistance in Cuba. *Lepr Rev*, v. 64, p. 128-128, 1993.

GROSSI, M. A. D. F.; LEBOEUF, M. A. A.; ANDRADE, A. R. C. D. et al. A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 34-38, 2008.

IGNOTTI, E.; DE PAULA, R. C. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010. Ministério da Saúde, S. D. V. E.: 185-202 p, 2010.

JACOBSON, R.; HASTINGS, R. Rifampin-resistant leprosy. *Lancet*, v. 2, n. 7998, p. 1304, 1976.

JIN, D. J.; GROSS, C. A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *Journal of Molecular Biology*, v. 202, n. 1, p. 45-58, 1988.

KAI, M.; NGUYEN PHUC, N. H.; NGUYEN, H. A. et al. Analysis of Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium leprae* in an Endemic Area of Vietnam. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 5, p. e127-e132, March 1, 2011.

KAIMAL, S.; THAPPA, D. M. Relapse in leprosy. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, v. 75, n. 2, p. 126, 2009.

MAEDA, S.; MATSUOKA, M.; NAKATA, N. et al. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 12, p. 3635-3639, 2001.

MATSUOKA, M. Drug resistance in leprosy. *Jpn J Infect Dis*, v. 63, n. 1, p. 1-7, January, 2010.

MATSUOKA, M.; AYE, K. S.; KYAW, K. et al. A novel method for simple detection of mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae*, based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries. *J. Med Microbiol*, v. 57, n. Pt 10, p. 1213-9, October, 2008.

MATSUOKA, M.; SUZUKI, Y.; GARCIA, I. E. et al. Possible mode of emergence for drug-resistant leprosy is revealed by an analysis of samples from Mexico. *Jpn J Infect Dis*, v. 63, n. 6, p. 412-6, Nov 2010.

Ministério da Saúde. Portaria Nº 3.125 de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase. Gabinete do Ministro/MS. Brasília (DF); 2010.

NAKATA, N.; KAI, M.; MAKINO, M. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae folP1* gene and dapsone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 2, p. 762-6, Feb 2011.

NOGUEIRA, W.; MARZLIAK, M. L. C.; GONÇALVES, O. S. et al. Perspectivas de eliminação da hanseníase. *Hansenologia Internationalis*, v. 20, n. 1, 1995.

OPROMOLLA, D. V. A.; COSTA, H. C.; OLIVEIRA, P. Resistência medicamentosa múltipla secundária na hanseníase. *Hansen Int*, v. 18, n. 1/2, p. 11-6, 1993.

World Health Organization (WHO). Chemotherapy of leprosy for control programmes. Geneva, Technical Reports Series, n. 675, 1982.

PENNA, G.; PEREIRA, G.; MOREIRA, M. Guia Para o Controle da Hanseníase- Cadernos da Atenção Básica nº 10. Ministério da Saúde, Brasília, 2002.

PEREIRA, E. V. E.; NOGUEIRA, L. T.; DA SILVA MACHADO, H. A. et al. Epidemiologic profile of the leprosy of the city of Teresina, in the period of 2001-2008, 235. *An Bras Dermatol*, v. 86, n. 2, p. 235-40, 2011.

PETTIT, J.; REES, R. Sulphone resistance in leprosy. An experimental and clinical study. *Lancet*, v. 2, n. 7361, p. 673, 1964.

ROCHA, A. D. S.; CUNHA, M. D. G.; DINIZ, L. M. et al. Drug and Multidrug Resistance among *Mycobacterium leprae* Isolates from Brazilian Relapsed Leprosy Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 6, p. 1912-1917, 2012.

SAITO, H.; TOMIOKA, H.; NAGASHIMA, K. *In vitro* and *in vivo* activities of ofloxacin against *Mycobacterium leprae* infection induced in mice. *Int. J. Lepr*, v. 54, p. 560-562, 1986.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P. et al. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, v. 19, n. 2, p. 338-81, Apr 2006.

SHEPARD, C. C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 112, n. 3, p. 445-454, 1960.

SINGH, P.; BUSSO, P.; PANIZ-MONDOLFI, A. et al. Molecular drug susceptibility testing and genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from South America. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 6, p. 2971-3, Jun 2011.

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

TAKIFF, H. E.; SALAZAR, L.; GUERRERO, C. et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, n. 4, p. 773-780, 1994.

TALHARI, S.; DAMASCO, M. H. D. S.; CUNHA, M. D. G. S. et al. Sulfono-resistência secundária: comprovação laboratorial em seis casos; Secondary dapsona-resistance: laboratorial confirmation in 6 cases. *An. Bras. Dermatol*, v. 60, n. 4, p. 175-8, 1985.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. Hanseníase. Instituto Superior de Estudos da Amazônia, 1989. 4ª Edição, 2006.

WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. *Leprosy Review.*, v. 75, n. 2, p. 118-130, 2004.

WILLIAMS, D. L.; WAGUESPACK, C.; EISENACH, K. et al. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 38, n. 10, p. 2380-2386, 1994.

WOLCOTT, R.; ROSS, H. Exacerbation of leprosy during present day treatment. *International Journal of Leprosy*, v. 21, n. 4: 1, p. 437, 1953.

# APÊNDICES

## **APÊNDICE A. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA-KIT QIAGEN COM MODIFICAÇÕES.**

### **Preparo da amostra:**

- 1- Centrifugar a amostra de baciloscopia por 15 minutos à velocidade máxima;
- 2- Descartar o sobrenadante;
- 3- Ressuspender o pellet com 200 µl de PBS;
- 4- Deixar reagir à temperatura ambiente por 30 minutos;
- 5- Centrifugar por 15 minutos à velocidade máxima;
- 6- Descartar o sobrenadante.

### **Reação de lise:**

- 7- Adicionar 200 µl de buffer de lise (buffer AL, QIAGEN);
- 8- Adicionar 20 µl de Proteinase K;
- 9- Incubar a 56° C por 30 minutos;
- 10-Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) à amostra e misturar por vórtex;
- 11-Pipetar a mistura na coluna de extração da QIAGEN e adicionar um tubo coletor.

### **Extração do DNA:**

- 12-Centrifugar a coluna com o tubo coletor a 8000 RPM por 1 minuto;
- 13-Descartar o tubo coletor com seu conteúdo;
- 14-Colocar a coluna em um novo tubo coletor;
- 15-Adicionar 500 µl de buffer AW1 (QIAGEN);
- 16-Centrifugar por 1 minuto a 8000 RPM;
- 17-Descartar o tubo coletor com seu conteúdo;
- 18-Colocar a coluna em um novo tubo e adicionar 500 µl de buffer AW2;
- 19-Centrifugar a 14000 RPM para secar a membrana;
- 20-Descartar o tubo coletor.

### **Eluição do DNA:**

- 21-Colocar a coluna em um tubo coletor de 1,5 ml;
- 22-Adicionar 80 µl de buffer AE na membrana;
- 23-Incubar 1 minuto a temperatura ambiente;
- 24-Centrifugar por 1 minuto a 8000 RPM para eluir o DNA;
- 25-Armazenar o DNA extraído a -20 °C.

**APÊNDICE B. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE FTA-CARD FTA® *elutecard* (Cat. no. WB120401; Whatman Inc., Florham Park, N.J., USA)**

1. Cortar 1 disco de 3 mm de diâmetro do FTA-Card com auxílio do *biopsypunch*.
2. Transferir o papel recortado para um tubo de 1.5 ml.
3. Adicionar 500 µl de H<sub>2</sub>O estéril ao tubo e pulsar o *vórtex*3X por 5 segundos.
4. Usando meios estéreis (pinça) transferir o disco de papel para o microtubo de 0,5 ml contendo 30µl de H<sub>2</sub>O estéril. Centrifugar o tubo por 10 segundos.
5. Transferir o tubo para a placa aquecedora 95° C por 30 minutos.
6. Remover a amostra e pulsar o *vórtex* ou ressuspender gentilmente a amostra 60X.
7. Centrifugar por 30 segundos para separar a matriz do eluído. O líquido restante contém DNA purificado.
8. Retirar o sobrenadante e colocar em outro tubo. Descartar o tubo anterior e o papel.
9. Alíquotar o DNA e armazenar a -20° C.
10. Realizar a PCR.

**APÊNDICE C. PROTOCOLO DE MICROARRANJOS DE DNA, MATSUOKA et. al., 2008.**

**Preparo da amostra:**

1. Adicionar 6µl do produto da PCR Multiplex + 34µl da solução de hibridização ou 2µl do produto da PCR de cada gene + 38µl da solução de hibridização.
2. Misturar e centrifugar a 1000 RPM por 2 segundos.
3. Colocar a solução para desnaturar a 98°C por 5 minutos utilizando a placa aquecedora.
4. Após o tempo de aquecimento, colocar os tubos com as amostras em gelo e manter por 5 minutos.
5. Centrifugar a 1000 RPM por 2 segundos.

**Hibridização:**

6. Umedecer tiras de papel absorvente com água destilada e colocar na caixa plástica.
7. Aplicar 40µl da mistura na lâmina de microarranjos de DNA e cobrir com um filme de cobertura.
8. Colocar a lâmina de microarranjos na caixa plástica contendo o papel absorvente umidificado.
9. Incubar a lâmina de microarranjos contida na caixa plástica por 60 minutos a 42°C.
10. Durante esta incubação pré-aquecer o buffer de lavagem (15ml) a 47°C (mais de 30 minutos) em outra caixa plástica.

**Lavagem:**

11. Retirar a lâmina do microarranjos de DNA da incubação, descartar o papel absorvente e remover o filme de cobertura.
12. Colocar a lâmina na caixa plástica contendo o buffer de lavagem pré-aquecido e selar a caixa plástica com papel *parafilm*.
13. Incubar a lâmina com o buffer de lavagem a 47°C por 20 minutos.
14. Retirar a lâmina do banho de Maria e colocá-lo sobre um suporte metálico.

**Bloqueio:**

15. Preparar a solução de conjugação, misturando 2,5 ml de TBST + 30µl de solução A e 30µl de solução B, deixar reagir por 30 minutos antes de usar na etapa 1 da coloração.
16. Bloquear a reação adicionando 2 ml de TBST na lâmina de microarranjos e deixar reagir a temperatura ambiente por 30 minutos.
17. Descartar a solução de bloqueio.

**Coloração:**

18. Adicionar 2 ml da solução de conjugação AB sobre a lâmina e deixar reagir por 30 minutos à temperatura ambiente.
19. Descartar a solução de conjugação AB e colocar a lâmina de microarranjos na caixa plástica.
20. Adicionar 15 ml de TBST e inverter 5x suavemente. Descartar o TBST.
21. Repetir o procedimento de lavagem sem descartar o TBST.
22. Antes de descartar o TBST preparar o substrato:
  - 5 ml de água destilada + 2 gotas de reagente C (buffer de pH 5,3) e misturar,
  - + 3 gotas de reagente D (TMB) e misturar,
  - + 2 gotas de reagente E (peróxido de hidrogênio) e misturar,
  - + 2 gotas de reagente F (estabilizador) e misturar.

Observação: os reagentes CDEF deverão ser armazenados na geladeira.

23. Aplicar 2ml do buffer de coloração sobre a lâmina e incubar de 30-60 minutos à temperatura ambiente.
24. Lavar a lâmina com água destilada.
25. Secar a lâmina com secador (não aproximando muito para não aquecer);
26. Utilizar *scanner* convencional para registrar as imagens dos *spots* da lâmina de microarranjos de DNA no computador.

## **APÊNDICE D – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**Título do Estudo: “Análise do perfil de resistência antimicrobiana através de metodologia de microarranjos de DNA em pacientes com hanseníase”**

**Coordenadora:** Dra. Maria da Graça Souza Cunha

**Instituição:** Fundação Alfredo da Matta

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa chamada **“Análise do perfil de resistência antimicrobiana através de metodologia de microarranjos de DNA em pacientes com hanseníase”**.

**O objetivo é verificar o motivo porque alguns pacientes com hanseníase após o tratamento e receberem alta apresentam novamente os sintomas da doença e porque razão alguns micróbios são resistentes aos medicamentos utilizados no tratamento da hanseníase.**

Os pacientes que participarem da pesquisa serão submetidos aos exames de rotina: coleta de sangue, baciloscopia, avaliação de prevenção de incapacidade, consulta médica e biópsia (retirada de um pequeno fragmento da pele). Esses procedimentos serão realizados utilizando-se material descartável e a sua realização causam certo desconforto.

Sua participação é totalmente voluntária, você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo, sua recusa em participar não envolverá punição ou perda de seus direitos constituídos, depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária para o claro entendimento da natureza do estudo.

A identificação de resistência do micróbio ao tratamento utilizado na rotina atual levará ao uso de um tratamento alternativo. Além disso, você estará colaborando em um estudo científico que beneficiará outras pessoas que por ventura apresentarem a doença após a alta. A não ser pelo atendimento da equipe de saúde você não receberá nenhum benefício financeiro nem terá gastos decorrentes de sua participação no estudo.

Os registros de sua participação nesse estudo serão mantidos em sigilo (confidenciais).

Entretanto, estes registros poderão ser do conhecimento dos representantes das instituições envolvidas no estudo, dos Comitês de Ética e pelas autoridades de saúde. Seu nome nunca será usado em nenhum relatório deste estudo.

Sua participação neste estudo poderá ser interrompida se você apresentar condições de saúde que representem riscos para você na opinião dos médicos do estudo.

Qualquer informação importante que surgir durante sua participação no estudo e que possa afetar a sua saúde será levada ao seu conhecimento. Você será informado dos resultados dos testes realizados neste projeto no sexto mês após a inclusão do paciente em virtude da necessidade de treinamento da equipe de pesquisadores.

Serão incluídos no estudo 400 pacientes de hanseníase, virgens de tratamento e recidiva.

O material biológico coletado (escarificado após incisão) será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores. Neste caso, estão previstos estudos para avaliação de como o corpo se defende nos casos em que existe mais de um tipo de doença envolvida, mediante a apresentação do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos.

Caso fique comprovado que você foi prejudicado devido a sua participação no estudo, você terá direito a tratamento médico e à indenização conforme previsto no item V.6 da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde sobre pesquisas médicas envolvendo seres humanos que estabelece: “Os sujeitos da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, tem direito à indenização”.

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você tenha perguntas relacionadas com esta pesquisa, ou você sentir qualquer problema:  
Dra.

Maria da Graça Souza Cunha (92-9985-5161) ou Dra. Lúcia de Paula (92-8831-9301).

Sabemos que o exame não oferece risco para sua saúde, porém conforme previsto no item V.6 da Res. 196/96 do Conselho Nacional de Ética em

Pesquisa, sobre pesquisas médicas envolvendo seres humanos que estabelece: “Os sujeitos da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito integral, tem direito à indenização”.

SE VOCÊ NÃO ENTENDEU ALGUMA PARTE DESTE DOCUMENTO OU DA EXPLICAÇÃO, PERGUNTE AO INVESTIGADOR ANTES DE ASSINAR.

Eu, \_\_\_\_\_, em pleno gozo das minhas faculdades mentais, faço-me voluntário(a) para participar do estudo em questão.

(Impressão dactiloscópica)

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_ (nome do paciente) em \_\_/\_\_/\_\_ pelo \_\_\_\_\_ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

\_\_\_\_\_

Assinatura da Testemunha Nome da testemunha

# **ANEXOS**

## ANEXO I – PURIFICAÇÃO DE DNA

### PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR – PROMEGA KIT

- 1- Realizar o gel das amostras a ser purificadas;
- 2- Pesar os tubos de 1,5 mL vazios;
- 3- Recortar o gel contendo as amostras e transferir ao tubo de 1,5 mL anteriormente pesado;
- 4- Em seguida realizar a subtração do peso do tubo com a amostra com o peso do tubo vazio;
- 5- O valor da subtração multiplicado por 1000X será o volume em  $\mu\text{l}$  a ser adicionado da Solução de Ligação a Membrana do KIT. (ex: resultado da subtração 0,261 será adicionado 261 $\mu\text{l}$  da solução de Ligação a Membrana na amostra);

**Observação: caso realizado diretamente do produto da PCR, adicionar Solução de Ligação a Membrana sendo o mesmo volume da reação da PCR, ou seja, 20 $\mu\text{l}$  do volume da reação, adicionar 20 $\mu\text{l}$  de Solução de Ligação a Membrana.**

- 6- Realizar o aquecimento do tubo a 59°C para diluição do gel. Durante este procedimento deverá homogeneizar a amostra;
- 7- Após diluição transferir o produto dissolvido para um tubo coletor contendo a coluna de membrana sílica e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- 8- Centrifugar a 13.500 RCF por 2 minutos;
- 9- Após centrifugação descartar o sobrenadante no tubo coletor;
- 10- Adicionar 700  $\mu\text{l}$  da Solução de Lavagem da Membrana e centrifugar a 13.500 RCF por 1 minuto;
- 11- Descartar o sobrenadante e adicionar 500  $\mu\text{l}$  da Solução de Lavagem da Membrana e centrifugar a 13.500 RCF por 5 minutos;
- 12- Esvaziar o tubo coletor e centrifugar novamente a 13.500 RCF por 1 minuto para evaporação de resíduos de etanol;
- 13- Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 ml;
- 14- Em seguida adicionar 30  $\mu\text{l}$  de água livre de nuclease no centro da mini-coluna e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos;

- 15-Centrifugar a 13.500 RCF por 2 minutos;
- 16-Descartar a coluna;
- 17-Quantificar o DNA resultante;
- 18- Armazenar a amostra a 4°C ou a -20°C.

## ANEXO II. PREPARO DA PLACA DE SEQUENCIAMENTO.

### PROTOCOLO EtOH/EDTA/ACETATO DE SÓDIO. – BULA BIGDYE V3.1 APPLIED BIOSYSTEM

Para precipitar reações de 10 µL em placas com 96 poços:

1. Remover a placa do termociclador e centrifugar 1 min 2000 RCF;
2. Adicionar 3µL da mistura de EDTA 125 mM + acetato de sódio 3M (pH 5,2) a cada um dos poços;

Nota: Verificar que a solução foi adicionada no fundo dos poços.

3. Adicionar 25µL de EtOH 100% gelado, a cada um dos poços;
4. Selar a placa com *strips* e misturar por inversão (4x);
5. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz;
6. Centrifugar a 2.000 RCF por 45 minutos ou 3.000 RCF por 30 minutos;

Importante: o próximo passo deve ser realizado imediatamente. Se isto não for possível, deves realizar um spin na placa por mais 2 minutos antes de recomeçar.

7. Inverter a placa e fazer um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Obs: Antes de inverter a placa, desprezar o conteúdo da mesma na pia junto com uma leve batida na mesa. Após programar a centrifuga na temperatura de 4°C.

8. Adicionar 35µL de EtOH a 70% em cada um dos poços;
9. Centrifugar por 15 minutos, a 4°C e 1.650 RCF;
10. Inverter a placa e realizar *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;
11. Incubar a placa a 52°C por 15 minutos, cobrir com papel alumínio (termociclador Veriti® 96-Well *Fast Thermal Cyclers* (AppliedBiosystem)).
12. Se não colocar no sequenciador imediatamente, congelar a placa seca ao abrigo da luz;
13. No momento de sequenciar adicionar 10 µL de formamida Hi-Di, lavando as paredes dos poços;
14. Aquecer a placa 95°C por 1 minuto, montar e colocar no sequenciador.

## **RESULTADOS**

## REVIEW ARTICLE

# MOLECULAR DIAGNOSIS IMPROVING MONITORING OF DRUG RESISTANCE IN LEPROSY

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine No. C 294

Keywords: leprosy, *Mycobacterium leprae*; Resistance; Mutations; Multidrug therapy

### ABSTRACT

Leprosy remains a major health problem in many countries. Global efforts to control leprosy, including multidrug therapy (MDT), which is the combination rifampicin, dapsona and clofazimine, have led to significant reduction in the detection of new cases in recent years. The current strategy of MDT aims to prevent the emergence, transmission and spread of resistant strains of *Mycobacterium leprae*. The drug resistance of *M. leprae* has been described since 1964 to dapsona, since 1976 to rifampicin and since 1966 to ofloxacin. Recent advances in the molecular biology of *M. leprae* have allowed the development of tests that identify specific targets of resistance to MDT.

**MATILDE DEL CARMEN CONTRERAS MEJÍA<sup>(1)</sup>; ISABELLA DA MOTA PASSOS<sup>(1)</sup>; MARIA DA GRAÇA SOUZA CUNHA<sup>(2)</sup>; LUCIA DE PAULA<sup>(3)</sup>**

<sup>(1)</sup>Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada; <sup>(2)</sup> Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta; <sup>(3)</sup> Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia.

Dr Lucia de Paula at Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Av General Rodrigo Octavio Jordão

Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I, CEP 69077-000, Manaus – AM, Brazil - Phone: 55 (92) 8123-9811

Email: [lpaula.bio@hotmail.com](mailto:lpaula.bio@hotmail.com)

## **INTRODUCTION**

Leprosy is a disease that remains one of the largest health problems for some countries in Latin America, Asia and Africa. Areas of high endemicity remain in some regions of Brazil, Indonesia, Philippines, the Republic of Congo, India, Madagascar, Mozambique, Nepal and the United Republic of Tanzania <sup>[1]</sup>. Currently, leprosy is on the list of neglected tropical diseases in the world <sup>[2]</sup>. In 1984, a new approach to therapy that included a combination of drugs, called multidrug therapy (MDT), began <sup>[3]</sup>. MDT currently forms the basis of the strategy for the control of leprosy <sup>[4, 5]</sup>.

With the combined efforts of national programs in endemic countries and the collaboration of international agencies, the number of leprosy cases in several countries has decreased <sup>[6]</sup>. The identification of resistant strains of *Mycobacterium leprae* is essential to reduce the number of leprosy cases <sup>[7]</sup>.

This paper discusses drug resistance in leprosy, beginning with the appearance of the first resistant strains of *M. leprae* to the current situation of this problem.

## **LEPROSY AND MULTIDRUG THERAPY (MDT)**

Leprosy treatment is based on the combination of the antibiotics rifampicin, clofazimine, and dapsone <sup>[3]</sup>. This therapy aims to avoid the use of monotherapy treatment that could lead to the development of resistant strains of *M. leprae*.

In the last two decades, more than 14 million people have been cured of leprosy through the use of MDT. However, every year, more than 250,000 new cases are still detected throughout the world <sup>[7]</sup>.

MDT is considered an effective treatment because it has reduced the prevalence of leprosy cases in many areas. However, there are reports of *M. leprae* resistant to some components of MDT<sup>[4, 8]</sup>. Unfortunately, even today, the detection of new leprosy cases remains high in many countries<sup>[8]</sup>.

In countries with a high endemicity of leprosy, mainly in the outskirts of big cities, health services do not provide the necessary coverage for the treatment of leprosy patients, which leads to increased risk of reinfection<sup>[9]</sup>.

Another factor that hinders the reduction of leprosy cases is the manifestation of relapse. The World Health Organization<sup>[10]</sup> considers a relapse case one in which the patient successfully completed MDT treatment but subsequently developed new signs and symptoms of the disease. Relapses can be caused by various factors such as the permanence of intact *M. leprae*, prolonged use of monotherapy drugs or even inappropriate therapy<sup>[11]</sup>. However, relapses cases are rare<sup>[12]</sup>.

Because leprosy reactions and relapses are clinically very similar, it is important to differentiate between them. Leprosy reactions are inflammatory conditions that are interspersed in the chronic phase of the disease and are triggered by factors such as vaccination, pregnancy, physical and emotional stress, among others. These reactions may occur before or during treatment or after discharge of the patient<sup>[12]</sup>. It was observed that patients who experienced leprosy reactions during treatment had triple the chance of relapsing<sup>[13]</sup>. The difficulty of making the correct differential diagnosis between relapse and reactive episodes causes an ambiguity in the diagnosis, a fact that contributes to the transmission of leprosy<sup>[14]</sup>.

Patients treated with MDT have a ten times lower risk of relapsing than those

treated with dapsone monotherapy<sup>[11]</sup>.

The WHO introduced a surveillance program of relapses to reduce the impact of this phenomenon. After implementation of this program, many endemic countries started reporting their relapse cases<sup>[14]</sup>.

## **DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUES**

*M. leprae* cannot be cultivated in vitro<sup>[7]</sup>, which hinders the development of standard techniques in laboratories for detecting bacillus. However, using animal models, it has been possible to obtain genetic, metabolic and antigenic information about the leprosy bacillus<sup>[15]</sup>. These findings also enabled a description of the genetic basis of drug resistance in *M. leprae* by employing molecular techniques to test the susceptibility of the drugs used in MDT<sup>[7]</sup>.

Likewise, the relationship between changes in the DNA nucleotide sequences of some *M. leprae* genes and resistance to drugs such as dapsone, rifampin and ofloxacin has been described<sup>[5]</sup>.

The drug susceptibility tests provide important information for the treatment of leprosy patients; however, they are not routinely performed in endemic countries<sup>[5]</sup>.

## **DRUG RESISTANCE**

Drug resistance to *M. leprae* is the product of spontaneous mutations due to errors in DNA replication in the genes that encode targets of the drugs used in MDT<sup>[15]</sup>.

Although drug resistance in new cases of the disease is considered rare<sup>[16]</sup>, the number of patients with this type of bacillus has increased in recent years due to inadequate treatment or abandonment of treatment by patients<sup>[5]</sup>. Withdrawal

of treatment may occur due to side effects of the drugs used in MDT <sup>[17]</sup>. Most patients with resistant bacillus are relapse cases <sup>[4, 7, 18, 19]</sup>.

With the introduction of dapsone, the first drug used to treat leprosy, in 1940 also came the first reports of drug resistant *M. leprae* <sup>[20]</sup>.

Despite the aim of MDT to prevent the spread of resistant *M. leprae* strains, there have been reports of resistance to dapsone since 1964 <sup>[21]</sup>, to rifampicin since 1976 <sup>[22]</sup> and to ofloxacin since 1994 <sup>[23]</sup>.

In 1993, an isolate was identified in Cuba that exhibited resistance to rifampicin and dapsone <sup>[24]</sup>. Also in 1997, multidrug resistant (MDR) strains of *M. leprae* were identified <sup>[23]</sup>. At this time, the *folp1* gene was not sequenced; therefore, it was not possible to confirm the mutation associated with dapsone resistance. In leprosy, there is no official definition of MDR bacilli, this terminology is used when *M. leprae* are resistant to more than one drug used in MDT <sup>[14]</sup>.

Recently new cases of leprosy featuring primary resistance were identified <sup>[4, 18, 25]</sup>.

## **DAPSONE RESISTANCE**

Dapsone is a bacteriostatic agent that has been used worldwide as a first-line drug for the treatment of leprosy <sup>[19, 26]</sup>. Dapsone is a sulfone analog of para-aminobenzoic acid (PABA) that targets the enzyme dihydropteroate synthase (DHPS) <sup>[27]</sup>. DHPS is encoded by the *folp1* gene and is involved in the synthesis of folic acid. The mechanism of action of dapsone occurs through competitive inhibition of folic acid synthesis.

Unfortunately, due to the extensive use of dapsone as a monotherapy treatment between 1960 and 1970, the number of cases of *M. leprae* resistant to dapsone

increased [19, 26].

The first case of dapsone resistance was reported in 1953 [28], but at that time, there were no techniques to confirm the finding. The development of an experimental mouse model of leprosy known as the Shepard method [29] allowed the identification of resistance to dapsone and other drugs [19].

In Brazil, the first reports of dapsone resistance appeared in the 1960s and 1970s as a result of the use of dapsone monotherapy [30]. In 1985, a study conducted in the state of Amazonas showed laboratory confirmation of secondary sulfone resistance in six patients from the former leprosarium in Manaus [31]. In 1993, another study described multiple resistance to rifampicin and dapsone in four patients in the state of São Paulo [32].

The sequencing of the *M. leprae* genome revealed two genes related to folate biosynthesis, *folp2* and *folp1* [10]. Dapsone resistance is associated with mutations in codons 53 and 55 in the *folp1* gene [33, 34], whereas no *folp2* mutations are related to dapsone resistance [7]. The specific mutations in the *folp1* gene that confer dapsone resistance are located in codon 53: threonine (ACC) → isoleucine (ATC), alanine (GCC), valine (GTC), alanine or arginine (AGG) and in codon 55: proline (CCC) → leucine (CTC), arginine (CGC) or serine (TCC). Recently, a new mutation in codon 48 was detected in clinical specimens [19, 26].

## **RIFAMPICIN RESISTANCE**

Rifampicin was previously used as a monotherapy drug or in combination with dapsone before the implementation of MDT. It is considered a potent

bactericidal agent and has been shown to suppress resistant *M. leprae* bacillus; therefore, reports of rifampicin resistance are less frequent <sup>[4]</sup>. Rifampicin is considered a key drug in the MDT treatment of leprosy <sup>[14]</sup>.

Rifampicin targets the  $\beta$  subunit of RNA polymerase encoded by the *rpoB* gene. Rifampicin binds to the  $\beta$  subunit and inhibits mRNA transcription <sup>[19]</sup>. Resistance-causing mutations occur in a small part of the gene, called the drug resistance determining region (DRDR). Thus, mutations in highly conserved regions of the *rpoB* gene confer rifampicin resistance to many types of mycobacteria <sup>[27, 35]</sup>. The first finding of rifampicin resistance was in 1976 <sup>[36]</sup>.

The mutations identified thus far are located at codons 407, 410, 420, 425 and 427. Additionally, insertions between codons 408 and 409 may confer resistance to rifampicin. The mutation in codon 407 is glutamine (CAG)  $\rightarrow$  valine (GTG). The mutation in codon 410 is aspartic acid (GAT)  $\rightarrow$  tyrosine (TAT). The mutation in codon 420 is histidine (CAC)  $\rightarrow$  aspartic acid (GAC). The mutations in codon 425 are phenylalanine (ATG) methionine  $\rightarrow$  (TTC) and serine (TCG)  $\rightarrow$  leucine (TTG), which occurs with a high frequency, similar to that described for *M. tuberculosis*. The mutation in codon 427 is leucine (CTG)  $\rightarrow$  valine (GAG). Additionally, mutations have been identified at positions 416, serine (GCT)  $\rightarrow$  cysteine (TGT), and 408, aspartic acid  $\rightarrow$  glycine, but it is unclear if they are associated with rifampicin resistance <sup>[18, 19]</sup>.

Recently, a mutation previously described in *Escherichia coli* at position 516 of the *rpoB* gene, aspartic acid  $\rightarrow$  asparagine was described in *M. leprae* <sup>[37]</sup>.

Similarly, a mutation previously described in *M. tuberculosis* at position 526, histidine → tyrosine, was also described in *M. leprae* <sup>[7, 18]</sup>.

## **OFLOXACIN RESISTANT**

Ofloxacin is a moderate-spectrum bactericide. The first trial to evaluate its effectiveness against *M. leprae* was conducted in 1986 by the Shepard method <sup>[38]</sup>. Currently, it is used in alternative schemes in leprosy patients in patients with some contraindication to traditional MDT. This drug has been included in the new regime used in the treatment of paucibacillary leprosy consisting of rifampicin, ofloxacin and minocycline and known as ROM. ROM can also be used in MB patients for 24 months. A combination of ofloxacin, clofazimine and minocycline is used in cases of resistance or intolerance to rifampin <sup>[39]</sup>.

Ofloxacin, which belong to the fluoroquinolone drug group, inhibits DNA replication by binding the A subunit of DNA gyrase encoded by the *gyrA* gene. The first finding of ofloxacin resistance occurred in 1994 <sup>[23]</sup>. Later, two relapsed cases after ofloxacin treatment were described in Japan in 2000 and 2003. Mutations associated with *gyrA* gene are commonly reported in mycobacteria <sup>[40, 41]</sup>.

The mutations identified to date in the *gyrA* gene are in codon 89: glycine (GGA) → cysteine (TGC) and in codon 91: alanine (GCA) → valine (GTA) <sup>[5, 19]</sup>.

Additionally, amino acid substitutions in codons 91 (serine) and 94 (asparagine) are associated with resistance to quinolones <sup>[19]</sup>.

It is believed that mutations in codons 89, 92 and 95, which confer quinolone resistance by *M. tuberculosis*, may also confer resistance in *M. leprae*, but as of

yet, no reports have been described <sup>[7]</sup>.

So far, few cases are known of quinolone-resistant *M. leprae* with mutations in the DRDR of the *gyrA* gene <sup>[18]</sup>.

## **DIAGNOSIS OF DRUG RESISTANCE**

Considering that *M. leprae* is non-culturable in vitro by traditional methods the Shepard method <sup>[29]</sup> has been used since 1960 for growth of *M. leprae* bacillus in mice. This technique requires a large amount of bacilli obtained from biopsies of skin lesions in leprosy patients. The bacilli are inoculated in the paws of nude mice, which due to their lack of a thymus allow growth of the bacilli. In 1964, this technique allowed confirmation of dapson resistance <sup>[20]</sup>. This method is still a standard tool to verify drug resistance.

However, the Shepard method is not practical to use with a large number of samples because it requires a significant number of animals, and confirmation of drug resistance takes a long time <sup>[19]</sup>. In addition to the ethical factor involved in animal tests and the time required for the growth of the bacillus in mice, the Shepard method requires viable bacilli <sup>[19]</sup>. This fact complicates the logistics of transporting samples between institutions that collect biopsies and those that perform the test.

With the discovery of specific genomic regions of *M. leprae* that confer drug resistance, DNA-based molecular assays have been developed, simplifying drug resistance testing. Thus molecular biology allowed the development of useful tools for the identification of *M. leprae* bacillus resistant to MDT <sup>[16]</sup>.

DNA sequencing is a method commonly used in countries with large scientific and economic growth, which is a disadvantage for countries with low

development and in areas with a high prevalence of leprosy <sup>[19]</sup>. Analysis of DRDRs with molecular biology techniques is simple and reliable, and it aims to replace the Shepard method <sup>[5]</sup>.

Currently, many laboratories directly sequence the *folp1*, *gyrA* and *rpoB* genes of *M. leprae*, where mutations associated with drug resistance are found, using DNA products amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR).

The WHO incorporated direct sequencing of PCR fragments into its leprosy surveillance program in 2008 <sup>[25]</sup> to monitor cases of drug resistance among new cases and relapse cases. Among the countries selected for this task are India, China, Brazil, Myanmar, Vietnam, Philippines, Indonesia, Colombia, Ethiopia and Mali, which have reference laboratories for this purpose.

However, because of the number of leprosy cases is still high in many countries, the decentralization of drug resistance surveillance in those countries that have endemic foci of leprosy is considered essential.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

We declare no conflict of interest.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to acknowledge the Foundation Alfredo da Matta, in the city of Manaus-AM, Brazil; the Federal University of Amazonas, Brazil; the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil; and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil.

#### **REFERENCES**

Brasil, Ministério da Saúde/SVS. 2010. Instruções Normativas das ações de controle da hanseníase no SUS. Portaria no. 3.125/SVS-SAS.

- [1] World Health Organization (WHO). Fact sheet N°101 2012; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>. Accessed 02/17/2013, 2013.
- [2] World Health Organization (WHO) 2010. Neglected tropical diseases. 2013. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). Accessed 02/17/2013, 2013.
- [3] World Health Organization (1992). Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO, Geneva, Technical Reports Series, n. 675.
- [4] Kai, M., Nguyen Phuc, N. H., Nguyen, H. A., Pham, T. H., Nguyen, K. H., Miyamoto, Y., Nguyen, T. T. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. *Clinical Infectious Diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. Mar 1 2011; 52 (5): e127-132.
- [5] Matsuoka, M., Suzuki, Y., Garcia, I. E., Fafutis-Morris, M., Vargas-Gonzalez, A., Carreno-Martinez, C., Nakajima, C. Possible mode of emergence for drug-resistant leprosy is revealed by an analysis of samples from Mexico. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. Nov 2010; 63 (6): 412-416.

- [6] World Health Organization (WHO). Global leprosy situation, beginning 2011. Weekly Epidemiological Record. Vol No. 36, 2011, 862011: 389 – 400.
- [7] Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. Future Microbiology. Jan 2011; 6 (1): 57-71.
- [8] Silva Sobrinho RA, Mathias TAF. Prospects for the elimination of leprosy as a public health problem in the State of Paraná, Brazil. Cadernos de Saúde Pública. 2008; 24 (2): 303-314.
- [9] da Silva Rocha, A., dos Santos, A. A. C., Pignataro, P., Nery, J. A., de Miranda, A. B., Soares, D. F., Boéchat, N. Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggests the occurrence of reinfection or of bacterial population shift during disease relapse. Journal of Medical Microbiology. 2011; 60 (10): 1441 - 1446.
- [10] Cole, S., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K., Thomson, N., Wheeler, P., Harris, D. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature. 2001; 409 (6823): 1007 - 1011.
- [11] Kaimal S, Thappa DM. Relapse in leprosy. Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology. 2009; 75 (2): 126.

- [12] Araújo MG. Hanseníase no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36 (3): 373-382.
- [13] de Medeiros Brito MdF, Ximenes RAA, Gallo MEN. Retreatment of leprosy relapse O retratamento por recidiva em hanseníase. An Bras Dermatol. 2005; 80 (3): 255 - 260.
- [14] Rocha, A. d. S., Cunha, M. d. G., Diniz, L. M., Salgado, C., Aires, M. A. P., Nery, J. A., Matsuoka, M. Drug and Multidrug Resistance among *Mycobacterium leprae* Isolates from Brazilian Relapsed Leprosy Patients. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50 (6): 1912 - 1917.
- [15] Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clinical Microbiology Reviews. Apr 2006; 19 (2): 338-381.
- [16] Matsuoka, M., Aye, K. S., Kyaw, K., Tan, E. V., Balagon, M. V., Saunderson, P., Suzuki, Y. A novel method for simple detection of mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae*, based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries. Journal of Medical Microbiology. October 1, 2008; 57 (10): 1213 - 1219.
- [17] Goulart IMB, Lopes VR, Massuda D. Fatores que interferem no controle da hanseníase na rede básica de assistência à saúde. Hansen Int. 1991; 16 (1-2): 7 - 15.

- [18] Maeda, S., Matsuoka, M., Nakata, N., Kai, M., Maeda, Y., Hashimoto, K., Kashiwabara, Y. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45 (12): 3635 - 3639.
- [19] Matsuoka M. Drug resistance in leprosy. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. Jan 2010; 63 (1): 1 - 7.
- [20] Pettit J, Rees R. Sulphone resistance in leprosy. An experimental and clinical study. *Lancet*. 1964; 2 (7361): 673.
- [21] Marks J. *Mycobacterial Disease in Man and Animals [Abridged]*. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1964; 57 (6): 479.
- [22] Jacobson RR, Hastings RC. Rifampin-resistant leprosy. *Lancet*. 1976; 2 (7998): 1304.
- [23] Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet*. 1997; 349 (9045): 103 - 104.
- [24] González, A., Maestre, J., Hernández, O., Columbie, Y., Atrio, N., Martín, M., Rodríguez, J. Survey for secondary dapsone and rifampicin resistance in Cuba. *Leprosy Review*. 1993; 64: 128.

- [25] Asia W.H.O.R.O.F.S.E. Guidelines for global surveillance of drug resistance in leprosy: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2009.
- [26] Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* folP1 gene and dapsone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Feb 2011; 55 (2): 762 - 766.
- [27] Baumstark BR, Spremulli LL, RajBhandary UL, Brown GM. Initiation of protein synthesis without formylation in a mutant of *Escherichia coli* that grows in the absence of tetrahydrofolate. *Journal of Bacteriology*. 1977; 129 (1): 457 - 471.
- [28] Wolcott R, Ross H. Exacerbation of leprosy during present day treatment. *International Journal of Leprosy*. 1953; 21 (4:1): 437.
- [29] Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 1960; 112 (3): 445 - 454.
- [30] Nogueira W, Marzliak MLC, Gonçalves OS, Brasil M. Perspectivas de eliminação da hanseníase. *Hansenologia Internationalis*. 1995; 20 (1).

- [31] Talhari S, Damasco MHdS, Cunha MdGS, Schettini AP, Andrade LMCd. Sulfono-resistência secundária: comprovação laboratorial em seis casos; Secondary dapsone-resistance: laboratorial confirmation in 6 cases. An. Bras. Dermatol. 1985; 60 (4): 175 - 178.
- [32] Opromolla DVA, Costa HC, Oliveira P. Resistência medicamentosa múltipla secundária na hanseníase. Hansen Int. 1993; 18 (1/2): 11 - 16.
- [33] Williams, D. L., Spring, L., Harris, E., Roche, P., & Gillis, T. P. Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsone resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. 44 (6): p. 1530 - 1537.
- [34] Kai, M., Matsuoka, M., Nakata, N., Maeda, S., Gidoh, M., Maeda, Y., Kashiwabara, Y. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. FEMS Microbiology Letters, 1999. 177 (2): p. 231-235.
- [35] Williams, D. L., Waguespack, C., Eisenach, K., Crawford, J. T., Portaels, F., Salfinger, M., Gillis, T. P. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1994; 38 (10): 2380 - 2386.

- [36] Jacobson R, Hastings R. Rifampin-resistant leprosy. *Lancet*. 1976; 2 (7998): 1304.
- [37] Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *Journal of Molecular Biology*. 1988; 202 (1): 45 - 58.
- [38] Saito H, Tomioka H, Nagashima K. *In vitro* and *in vivo* activities of ofloxacin against *Mycobacterium leprae* infection induced in mice. *Int. J. Lepr*. 1986; 54: 560 - 562.
- [39] Cunha, M., Virmond, M., Schettini, A. P., Cruz, R., Ura, S., Ghuidella, C., Filho, A. OFLOXACIN multicentre trial in MB leprosy FUAM-Manaus and ILSL-Bauru, Brazil. *Lepr Rev*. 2012. 83 (3), 261.
- [40] Takiff, H. E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W. M., Kreiswirth, B., Telenti, A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38 (4): 773 - 780.
- [41] Cambau E, Sougakoff W, Besson M, Truffot-Pernot C, Grosset J, Jarlier V. Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *Journal of Infectious Diseases*. 1994; 170 (2): 479-483.

## Short communication

Submitted in Journal of Clinical Microbiologic JCM01688-14R1

### Identification of primary drug resistance to rifampin in *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in Amazonas state, Brazil

[lpaula.bio@hotmail.com](mailto:lpaula.bio@hotmail.com) #

MATILDE DEL CARMEN CONTRERAS MEJÍA<sup>(1)</sup>; MÁISA PORTO DOS SANTOS<sup>(1,5)</sup>; GEORGE ALLAN VILLAROUÇO DA SILVA<sup>(1,2)</sup>; ISABELLA DA MOTTA PASSOS<sup>(1,6)</sup>; FELIPE GOMES NAVECA<sup>(2)</sup>; MARIA DA GRAÇA SOUZA CUNHA<sup>(3)</sup>; MILTON OZÓRIO MORAES<sup>(4)</sup> LUCIA DE PAULA (#)<sup>(1,7)</sup>

<sup>(1)</sup> Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas; <sup>(2)</sup> Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane; <sup>(3)</sup> Fundação Alfredo da Matta; <sup>(4)</sup> Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ; <sup>(5)</sup> Laboratorio de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA; <sup>(6)</sup> Universidade Estadual do Amazonas; <sup>(7)</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Regional Catalão, Universidade Federal de Goiás.

#### ABSTRACT

The aim of this study was to identify polymorphisms in the *folp1*, *gyrA* and *rpoB* genes in leprosy patients treated in Amazonas state, Brazil. Among 197 slit-skin smears samples from untreated or relapsed patients we found three cases of primary resistance to rifampicin and one confirmed case of multidrug resistance.

**Key words:** Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Resistant; Mutations; Multidrug therapy

Efforts to reduce leprosy lead the World Health Organization (WHO) to initiate a program introducing a multidrug therapy (MDT) in 1982, a combination of rifampicin, clofazimine and dapsones successfully reduced the number of patients under treatment (1). But the introduction of MDT did not alter the number of new cases. Brazil diagnoses yearly 35,000 leprosy patients in the past decade (2) and drug resistance to MDT components has been observed (3, 4).

*Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy, is an obligate intracellular slow growing bacteria, which has a highly conserved genome (5). Here, we used DNA sequencing in *folp1*, *rpoB* (encoding targets of first line drugs, dapsones and rifampicin, respectively) and *gyrA* (second line) to assess drug resistance in slit skin smears obtained from leprosy patients treated at the Alfredo da Matta Tropical Dermatology Foundation (FUAM), Manaus, Amazonas, Brazil, from May 2009 to January 2011. The study was approved through the Ethical Committee of Research of this institution (n<sup>o</sup>05/2009). Written consent was obtained from each subject before admission in the study. The samples were collected as done in the routine procedure for the determination of the bacterial index (BI) and transferred into 70% ethanol Eppendorf tubes or FTA<sup>®</sup> elute cards (Whatman Inc., Florham Park, N.J., USA). The BI of the slit skin specimens varied between zero (0) and 6+. For DNA extraction, we used either QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kit (Life Technologies-Brazil) for ethanol stored samples or the manufacturer's instructions for FTA<sup>®</sup> cards.

Fragments of the three genes were separately amplified using the PCR conditions and primers previously described (4). The amplified DNA fragments were confirmed using gel electrophoresis in 2.0% Metaphor Agarose (Ludwig Biotec) diluted in TBE buffer. PCR products were then purified using the PCR clean-up system kit (PROMEGA). For sequencing, the same primers used to generate the PCR fragment of each gene (4) were used with the ABI BigDye 3.1 Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems do Brasil). The target regions of the *folP1* (accession no. AL 583917, gene ML583917), *rpoB* (accession no. AL583923, gene ML1891) and *gyrA* (accession no. AL583917, gene ML0006) genes were used as standard wild-type strains, and the reported mutations were labeled in these fragments.

From 197 samples there were 56 Lepromatous leprosy (LL), 54 borderline lepromatous, 27 borderline borderline, 51 borderline tuberculoid, 6 tuberculoid and 3 indeterminate cases according to Ridley and Jopling (6). All patients were treated according to WHO recommendations for paucibacillary and multibacillary leprosy. Among those, there were new (n=126) and relapse cases (n=39), reentry (n=3) and patients with leprosy reactions (n=29). There were 153 males and 44 females. A total of 76, 102 and 79 samples were PCR positive for *rpoB*, *folp1* and *gyrA*, respectively.

Among the samples screened we found a total of 4 of 76 PCR positive (5.2%) specimens carrying previously described *rpoB* polymorphisms. One of the four cases was a multidrug resistant strain in a relapse case, where polymorphisms at *folp1*, and *gyrA* were also detected.

Analyzing the *rpoB* region, three samples showed GAT→TAT (Asn→Tyr) single nucleotide polymorphism (SNP) at codon 410, which has been previously

reported in leprosy (7, 8). All of these were new cases clearly demonstrating primary drug resistance to rifampin in Amazonas state. Two of these patients were males and one female, all of them had BI = 4+ with LL as clinical form. The relapse case showed at codon 425 TCG→TTC (Ser→Phe) polymorphism at *rpoB* commonly associated with drug resistance in leprosy (3, 7, 9) and also presented a SNP at codon 91 in the *gyrA* gene altering the GCA→GTA (Ala-Val). Another polymorphism in the *folp1* gene was detected at codon 55 (CCC→CGC) changing Proline to Leucine, commonly associated with dapsone resistance (7, 10-13), demonstrating MDR (12). This was a male patient that lived in a leprosarium and received dapsone monotherapy treatment for more than 10 years and later received 24 doses of MDT and finally another 24 doses of MDT together with ofloxacin after MDR detection.

We also detected single nucleotide variations at *rpoB*, *folp1* and *gyrA* in the vicinity of known mutations, but those have never been described with resistance in leprosy. It is likely that these SNPs are not associated with drug resistance, but could be used for molecular epidemiology and strain identification. In three new cases we detected polymorphisms at *folp1* gene, at codons: 50 GGC→GGT (Gly), 44 GCG→GTC (Ala→Val), and 64 GTT→GTC (Val). Also, a new case showed one polymorphism at codon 89 at *gyrA* gene CCG→CTG (Pro→Leu). None of these SNPs are known to be related to drug resistance, neither in *M. leprae* nor *M. tuberculosis* complex.

Among the 39 relapse cases, we detected polymorphisms in *rpoB* gene at codons 437 GCC→GAC (Ala→Asx) and 444 GTG→GCG (Val→Ala). The latter sample showed two different populations, one with the amino acid Alanine and the other one with a Valine in *rpoB* gene suggesting a double infection. This

sample was obtained from a potential relapse case and maybe this SNP could be used to distinguish strains to define reinfection. A common SNP that was not associated with resistance was identified at the *gyrA* gene, a polymorphism among four new cases a synonymous SNP at position 99 CGC→ CGT (Arg) (5% of the total of polymorphisms). Curiously, all of these cases were from multibacillary patients (LL=3, BL=1) with high bacillary loads (BI ≥ 3).

The detection of drug-resistant *M. leprae* strains have been reported in Brazil (14-16). Nevertheless, circulating genotypes and resistant strains are not routinely surveyed worldwide (17). Here, we confirm the occurrence of multidrug resistant and also primary resistant cases in this geographical area. It is likely that resistant strains are actively circulating in the north of Brazil suggesting an urgent need for drug-resistant monitoring policy and a careful pos-treatment follow-up of cured patients in order to detect relapse earlier and rapidly identify resistant strains.

## **CONFLICT OF INTEREST**

We declare that there is no conflict of interest.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful for staff at Alfredo da Matta Foundation, in the city of Manaus-AM, Brazil, the Federal University of Amazonas, Brazil. This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil, the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil and Amazonas State Funding Agency (FAPEAM) and Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS FIOCRUZ for use of its facilities (ILMD - Sequencing Platform).

## REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). 1982. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO, Geneva, Technical Report Series n.675.
2. Pereira EVE, Nogueira LT, da Silva Machado HA, Lima LAN, Ramos CHM. 2011. Epidemiologic profile of the leprosy of the city of Teresina, in the period of 2001-2008. 235. An Bras Dermatol. 86 (2): 235-240.
3. Matsuoka M. 2010. Drug resistance in leprosy. Japanese Journal of Infectious Diseases. 63 (1): 1-7.
4. Kai, M., Nguyen Phuc, N. H., Nguyen, H. A., Pham, T. H., Nguyen, K. H., Miyamoto, Y., Nguyen, T. T. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 52 (5): e127-32.
5. Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., & Cole, S. T. 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. Nature Genetics. 41(12):1282-9.
6. Ridley D, Jopling W. 1962. A classification of leprosy for research purposes. Leprosy Review. 33:119-128.

7. Maeda, S., Matsuoka, M., Nakata, N., Kai, M., Maeda, Y., Hashimoto, K., Kashiwabara, Y. 2001. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (12): 3635-3639.
8. Matsuoka, M., Aye, K. S., Kyaw, K., Tan, E. V., Balagon, M. V., Saunderson, P., Suzuki, Y. 2008. A novel method for simple detection of mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae*, based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries. *Journal of Medical Microbiology*. 57 (Pt 10): 1213-9.
9. Emmanuelle C, Bonnafous P, Evelyne P, Sougakoff W, Baohong J, Vincent J. 2002. Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. *Clinical Infectious Diseases*. 34 (1): 39-45.
10. Williams, D. L., Waguespack, C., Eisenach, K., Crawford, J. T., Portaels, F., Salfinger, M., Gillis, T. P. 1994. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38 (10): 2380-6.

11. Kai, M., Matsuoka, M., Nakata, N., Maeda, S., Gidoh, M., Maeda, Y., Kashiwabara, Y. 1999. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. FEMS Microbiology Letters. 177 (2): 231-5.
12. Lee, S., Kim, S., Kang, T., Chae, G., Chun, J., Shin, H., Kim, N. 2001. The prevalence of *folP1* mutations associated with clinical resistance to dapson, in *Mycobacterium leprae* isolates from South Korea. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 95 (4): 429-32.
13. Matsuoka M, Kashiwabara Y, Namisato M. 2000. A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapson, rifampin, ofloxacin and sparflloxacin. International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases. 68 (4): 452-5.
14. Talhari S, Damasco MHdS, Cunha MdGS, Schettini AP, Andrade L.M.C.D. 1985. Sulfono-resistência secundária: comprovação laboratorial em seis casos; Secondary dapson-resistance: laboratorial confirmation in 6 cases. An Bras Dermatol. 60 (4): 175-8.
15. Rocha, A. d. S., Cunha, M. d. G., Diniz, L. M., Salgado, C., Aires, M. A. P., Nery, J. A., Matsuoka, M. 2012. Drug and Multidrug Resistance among *Mycobacterium leprae* Isolates from Brazilian Relapsed Leprosy Patients. Journal of Clinical Microbiology. 50 (6): 1912-7

16. Fontes, A., Gomes, H., Araujo, M., Albuquerque, E., Baptista, I., Moura, M., & Suffys, P. 2012. Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107, 143-149.
  
17. Williams DL, Gillis TP. Sep, 2012. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. *Leprosy Review*. 83(3):269-81