

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO  
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE  
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA**

**Gabriely Crivari de Almeida Lima**

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS A DROGA RESISTÊNCIA NO  
GENE *GYRB* DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

**BAURU  
2024  
GABRIELY CRIVARI DE ALMEIDA LIMA**

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS A DROGA RESISTÊNCIA NO  
GENE *GYRB* DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP- “Dr. Antônio Guilherme de Souza” como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração Análises Clínicas sob orientação do(a) Dr(a). Luciana Raquel Vincenzi Fachin

**BAURU  
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO "LAURO DE SOUZA LIMA"

L628d Lima, Gabriely Crivari de Almeida

Detecção de mutações relacionadas a droga resistência no gene gyrB do Mycobacterium leprae / Gabriely Crivari de Almeida Lima, Bauru, 2024. 24f. il.

Monografia apresentada ao programa de Especialização Multiprofissional em Assistência Dermatológica do Centro Formador de Recursos Humanos para o SUS/SP "Dr. Antônio Guilherme de Souza", unidade didática Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Dr. Luciana Raquel Vincenzi Fachin e coorientação da Dra. Patrícia Sammarco Rosa.

1. Resistência. 2. Mycobacterium leprae. 3. Fluorquinolona. 4. gyrB. I. Fachin, Luciana Raquel Vincenzi. II. Rosa. Patrícia Sammarco. III. Título.

**GABRIELY CRIVARI DE ALMEIDA LIMA**

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS A DROGA RESISTÊNCIA NO  
GENE *GYRB* DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP- “Dr. Antônio Guilherme de Souza” como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração Análises Clínicas sob orientação do(a) Dr(a). Luciana Raquel Vincenzi Fachin

---

Luciana Raquel Vincenzi Fachin

---

Patrícia Sammarco Rosa

Bauru, 22/02/2024

## RESUMO

No *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) a resistência aos antimicrobianos dapsona (DDS), rifampicina (RIF) e ofloxacina (OFLO) se dá, primariamente, pela ocorrência de mutações em sequências conservadas dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*. Na rotina do Instituto Lauro de Souza Lima, muitos pacientes que apresentam clínica compatível com recidiva a qual poderia estar associada a resistência, apresentam perfil de suscetibilidade sensível a DDS, RIF e OFLO pelos mecanismos conhecidos. Existem vários outros mecanismos de resistência, bem como outros genes que podem ser pesquisados. Na rede de vigilância de resistência no Brasil, para fluorquinolonas, apenas as mutações em *gyrA* são pesquisadas na rotina, e, portanto, não temos dados sobre mutações em *gyrB*. No gene *gyrB* as mutações nos códons 214 (Val214Gly), 464 (Asp464Asn) e 503 (Thr503Ile) foram associadas com resistência à OFLO em *M. leprae*.

O objetivo deste projeto é a detecção de mutações em *gyrB* por sequenciamento direto de DNA genômico de *M. leprae*. Para isso, foram utilizadas 52 amostras de DNA do banco de amostras do ILSL selecionadas entre julho de 2021 a dezembro de 2023, as quais já foram testadas por sequenciamento direto na rotina de investigação de resistência em hanseníase do ILSL para mutações já descritas. Foram utilizados dois pares de primers para amplificar e sequenciar as amostras pela metodologia de sequenciamento Sanger.

As sequências foram analisadas utilizando-se o software Mega11. O Par 1, o qual permite avaliar polimorfismo no códon 214, enquanto que o Par 3, nos códons 464 e 503. As amostras eram em maioria (53,84%) do sexo masculino, 92,19% maiores de 20 anos com média da idade de 51 anos. Procedentes de vários estados brasileiros, com destaque para SP e MT. Cerca de 92,30% dos casos (48/52) eram multibacilares e 51,92% das amostras provenientes de pacientes com hanseníase virchowiana (MHV). Do total de casos, 55,70% foram associados a situações de falência terapêutica, seguida por casos novos, 19,23% e 11,54% de casos de recidiva da doença. A maioria (59,61%) fez PQT/MB, destes cerca de 74,19% trataram por 24 meses.

O sequenciamento do gene *gyrB* pelo Par 1 foi eficiente em aproximadamente 98,07% dos isolados de *M. leprae* e pelo Par 3, 69,23%. Entretanto, nenhuma amostra foi polimórfica no gene *gyrB* e uma amostra apresentou polimorfismo não relacionado a droga resistência no códon 207 (Ile207Ile). Nossos resultados corroboram com a literatura, mostrando que mutações em *gyrB* é pouco frequente em *M. leprae*.

**Palavras-chave:** Resistência. *Mycobacterium leprae*. Fluorquinolona. gyrB

## ABSTRACT

In *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), resistance to the antimicrobials dapsone (DDS), rifampicin (RIF), and ofloxacin (OFLO) primarily occurs due to mutations in conserved sequences of the *folP1*, *rpoB*, and *gyrA* genes. In the routine at the Lauro de Souza Lima Institute, many patients showing symptoms compatible with relapse, potentially associated with resistance, exhibit susceptibility profiles to DDS, RIF, and OFLO through known mechanisms. Numerous other resistance mechanisms and genes remain unexplored. In the Brazilian resistance surveillance network for fluoroquinolones, only *gyrA* mutations are routinely investigated, leaving a gap in data regarding *gyrB* mutations. Mutations at codons 214 (Val214Gly), 464 (Asp464Asn), and 503 (Thr503Ile) in the *gyrB* gene have been associated with OFLO resistance in *M. leprae*.

The aim of this project is to detect *gyrB* mutations through direct genomic DNA sequencing of *M. leprae*. For this purpose, 52 DNA samples from the ILSL sample bank, selected between July 2021 and December 2023, were utilized. These samples had previously undergone routine direct sequencing at the ILSL for known mutations. Two primer pairs were employed to amplify and sequence the samples using Sanger sequencing methodology.

Sequences were analyzed using Mega11 software. Primer 1, assessing polymorphism at codon 214, and Primer 3, targeting codons 464 and 503. The majority of samples (53.84%) were male, with 92.19% over 20 years old and an average age of 51 years. Originating from various Brazilian states, notably SP and MT, approximately 92.30% of cases (48/52) were multibacillary, and 51.92% of samples were from patients with virchowian leprosy (MHV). Among the cases, 55.70% were associated with therapeutic failure, followed by new cases (19.23%) and relapse cases (11.54%). The majority (59.61%) underwent PQT/MB treatment, with around 74.19% treated for 24 months.

Sequencing of the *gyrB* gene using Primer 1 was effective in approximately 98.07% of *M. leprae* isolates, while Primer 3 showed efficiency in 69.23%. However, no sample exhibited polymorphism in the *gyrB* gene, and one sample presented non-drug resistance-related polymorphism at codon 207 (Ile207Ile). Our results align with the literature, demonstrating that *gyrB* mutations are infrequent in *M. leprae*.

**Keywords:** Resistance, *Mycobacterium leprae*, Fluoroquinolone, *gyrB*.

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1-** Imagem de gel de agarose 1,5% mostrando DNA amplificado e corado com Gel Red. .... 14
- Figura 2-** Eletroferograma representando o sequenciamento de fragmento do gene gyrB. A: amostra de DNA mutante no códon 207 (ATT); B: amostra de DNA não polimórfico (WT). .... 16

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1-</b> Dados gerais dos pacientes incluídos no estudo (n=52).....	10
<b>Tabela 2-</b> Característica do tratamento dos pacientes (n=52) .....	12
<b>Tabela 3-</b> Frequência das mutações nos genes folp1, rpoB e gyrA do <i>M. leprae</i> entre as amostras incluídas no estudo (n=52).....	12
<b>Tabela 4-</b> Sequências de primers usados nesse estudo.....	13
<b>Tabela 5-</b> Resultado da PCR para a amplificação dos fragmentos de DNA do gene gyrB (n=52). .....	14
<b>Tabela 6-</b> Resultado do sequenciamento de DNA nos genes gyrB e gyrA do <i>M. leprae</i> nas amostras incluídas no estudo (n=52).....	15

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
3.1.	AMOSTRAS DE DNA.....	6
3.2.	EXTRAÇÃO DE DNA DO BIORREPOSITÓRIO .....	7
3.3.	QPCR RLEP E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO .....	7
3.4.	AMPLIFICAÇÃO DE DRDR DE GYRB POR PCR .....	8
3.5.	SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	8
<b>4</b>	<b>RESULTADO</b> .....	<b>9</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>16</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>19</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um bacilo gram-positivo, álcool-ácido-resistente, parasita intracelular obrigatório de crescimento lento que infecta as células de Schwann nos nervos periféricos e macrófagos da pele. O *M. leprae* é transmitido principalmente por meio do contato próximo e prolongado com uma pessoa infectada. A hanseníase é tratável e curável, especialmente quando diagnosticada precocemente<sup>1</sup>. Ela faz parte da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública (Portaria de Consolidação MS/GM nº 4, de 28 de setembro de 2017) tornando-se obrigatório que os profissionais de saúde reportem os casos do agravo no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN).

A implantação da poliquimioterapia (PQT) em 1981 pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>2</sup> foi um dos mais importantes avanços técnicos na história do controle da doença, que juntamente com um esforço global organizado levou a uma importante diminuição da prevalência da doença, de estimados cinco milhões de casos em 1985 para menos de 200 mil casos em 2014<sup>3</sup>. A PQT é constituída pelo conjunto dos seguintes medicamentos: a rifampicina (RFP), a dapsona (DDS) e a clofazimina (CLO), com administração associada. Essa associação pretende evitar a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença.

Apesar da PQT, em 2021, a hanseníase ainda está presente em muitos países em desenvolvimento, sendo Índia, Brasil e Indonésia responsáveis por 74,46% dos casos novos notificados nesse ano<sup>4</sup>. Entre os anos de 2016 e 2020, foram diagnosticados no Brasil 155.359 casos novos de hanseníase. Desses, 86.225 ocorreram no sexo masculino, o que corresponde a 55,5% do total. Essa predominância foi observada na maioria das faixas etárias e anos da avaliação, com maior frequência nos indivíduos entre 50 e 59 anos, totalizando 29.587 casos novos<sup>5</sup>.

Um indicador importante para o controle da hanseníase é o número de recidivas, que mede o sucesso do tratamento e acredita-se resultar de um tratamento inadequado e / ou tratamento incompleto. Em 2021 foram registrados 3.201 casos de recidiva, sendo que o Brasil foi responsável por 1.212, o que correspondeu a 37,86% do total de casos de recidiva relatados no mundo<sup>4</sup>.

Definem-se como recidiva todos os casos de hanseníase tratados regularmente com esquemas oficiais padronizados e corretamente indicados, que receberam alta por cura, isto é, saíram do registro ativo da doença no SINAN, e que voltam a apresentar novos sinais e sintomas clínicos de doença infecciosa ativa. Os casos de recidiva em hanseníase geralmente ocorrem em período superior a cinco anos após a cura<sup>6</sup>.

Em 2015 o Ministério da Saúde, considerando o aumento no registro de casos de recidiva registrados no SINAN, deficiente definição clínico-laboratorial da doença, e os atuais relatos de resistência medicamentosa em diferentes regiões do país (norte e sudeste), divulgou uma nota informativa alertando estados e municípios para esta situação, além de orientar sobre a importância do diagnóstico diferencial entre recidiva, reação reversa hanseníase, insuficiência terapêutica e falência terapêutica<sup>6</sup>. Essas situações clínicas, provavelmente, podem estar contabilizadas nos 3.586 casos de outras causas de retratamento, que não recidiva, relatados no Brasil no ano de 2021<sup>4</sup>.

Dentre estas situações clínicas, merece destaque a falência terapêutica, situação em que o paciente diagnosticado com hanseníase não apresenta sinais de melhora clínica durante o tratamento regular e adequadamente indicado, esses casos são os que têm maior probabilidade de apresentar bacilo com resistência medicamentosa<sup>6</sup>.

Epidemiologicamente existem dois tipos de resistência, a secundária ou adquirida, que é resultante de um tratamento inadequado e geralmente está acompanhada de melhora clínica inicial seguida de reativação da doença. E a primária, que se manifesta em indivíduos que ainda

não receberam o tratamento; neste caso, muito provavelmente, a infecção ocorreu a partir de bacilos provenientes de paciente com resistência secundária<sup>7</sup>.

As primeiras especulações sobre a emergência de resistência começaram a surgir no final da década de 1940<sup>8</sup>. Nesta época, os derivados sulfônicos como promim, diazona e DDS já estavam sendo utilizados, ainda que experimentalmente, no tratamento da hanseníase. A DDS foi a primeira droga associada a comprovação experimental de resistência; isto só foi possível depois que a técnica de inoculação do bacilo em coxim plantar de camundongos isogênicos foi padronizada por Shepard em 1960<sup>9</sup>. Utilizando-se desta metodologia, Pettit & Rees foram os primeiros a demonstrar experimentalmente, em 1964, o primeiro caso de resistência do bacilo à DDS<sup>10</sup>. Posteriormente, vários outros relatos começaram a surgir em várias partes do mundo<sup>11-17</sup>, associados a relatos de elevação das taxas de prevalência e incidência da hanseníase para níveis alarmantes em algumas áreas.

O êxito no sequenciamento do genoma do *M. leprae*, em 2000, permitiu aos pesquisadores obterem grandes avanços no conhecimento de características bioquímicas, genéticas, metabólicas e fisiológicas do bacilo. Graças a esses avanços, hoje é possível compreender melhor os mecanismos de ação das drogas anti-micobacterianas bem como alguns dos mecanismos de resistência a essas drogas<sup>18</sup>. Deste modo, a detecção molecular de resistência em micobactérias tem se baseado na observação de mutações em genes que codificam regiões envolvidas no alvo de ação das drogas ou de sua ativação.

Mutações em regiões determinantes de droga resistência (DRDR) nos genes *folP1*<sup>13,19,17</sup>, *rpoB*<sup>14,20</sup> e *gyrA*<sup>14</sup> estão relacionadas com resistência a DDS, RIF e ofloxacina (OFLO), respectivamente. O surgimento da resistência aos medicamentos é uma preocupação e uma ameaça para muitos programas de intervenção em doenças infecciosas, especialmente quando a prevenção secundária (quimioterapia) é o principal componente da estratégia de controle.

Diante da emergência de relatos de bacilos resistentes a uma das drogas da PQT e até mesmo multidrogas resistentes (MDR) em pacientes de recidiva<sup>14-17,19,21-31</sup>, bem como de resistência primária em casos novos<sup>31-34</sup>, a estratégia da OMS para 2016-2020 foi fortalecer uma vigilância nos padrões de sensibilidade a drogas globalmente e monitorar resistência primária e secundária.

A presença de mutações pontuais em genes que codificam alvos de drogas conhecidos, como a DNA girase, a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (RNAP) e diidroteratoato sintase, é amplamente considerada uma importante assinatura molecular para a resistência a drogas na hanseníase<sup>25</sup>. A pesquisa restrita a estes alvos, entretanto, pode ocasionar resultados falso negativos e subestimar a magnitude da resistência do patógeno. Prova disso é que embora um grande número de casos de recidivas seja detectado no Brasil, apenas 8,4%, 13,3% e 1,9% dos casos podem ser explicados por mutações que sabidamente conferem resistência bacilar à RIF, DDS e OFLO, respectivamente<sup>31</sup>. Na rotina do ILSL, muitos pacientes que apresentam clínica compatível com recidiva a qual poderia estar associada a resistência, apresentam perfil de suscetibilidade sensível a DDS, RIF e OFLO pelos mecanismos conhecidos. Entre os casos de recidiva e falência terapêutica testados no ILSL dentro do programa de vigilância de resistência medicamentosa em hanseníase no período de 2015 a 2018, apenas 1,8% tiveram resistência molecular comprovada, suscitando a possibilidade de outros fatores estarem envolvidos no insucesso terapêutico. Essas observações justificam a pesquisa por outras mutações nos mesmos genes ou em outras sequências que possam estar associadas à resistência.

Por recomendação da OMS, quando há resistência a RIF e DDS, deve-se usar esquema medicamentoso alternativo, que inclui OFLO, minociclina e claritromicina<sup>35</sup>. Dentre essas, a OFLO é uma das principais drogas de segunda linha para o tratamento de pacientes com hanseníase resistente<sup>35</sup>. No entanto, seu uso não é exclusivo para a hanseníase, mas também para outras doenças infecciosas, incluindo a tuberculose, o que já levou à resistência OFLO em

*M. leprae*<sup>36-40</sup>. No ILSL, avaliando com os resultados encontrados para o sequenciamento da *gyrA* de 2010 a 2021, que demonstraram taxa de 0,11% de mutação em *gyrA*, identificamos um aumento importante na resistência às fluoroquinolonas em 2022. Dentre 26 pacientes com resistência à OFLO, 6 (23%) fizeram uso de OFLO no primeiro ou segundo tratamentos, e 4 (15,4%) eram recidivas, 5 (19,2%) casos novos, 11 (42,3%) classificados como falência terapêutica e 6 (23,1%) como insuficiência terapêutica. Cerca de 25% dos casos resistentes à OFLO fizeram uso desta droga no curso de um tratamento, o que sugere uma possível pressão seletiva associada ao surgimento ou manutenção da cepa mutante. Corroborando com nossos achados, Ahuja et al. 2022<sup>41</sup> relataram 16 casos de resistência à OFLO em 25 casos de resistência identificados, desses 10% foram em casos novos de hanseníase. Uma razão para encontrar um alto número de casos resistentes à OFLO pode ser explicada pelo fato de que as fluoroquinolonas são amplamente utilizadas para o tratamento de outras doenças infecciosas. Pacientes com histórico médico de administração de OFLO para outras doenças além da hanseníase podem desenvolver resistência ao longo do tempo.

A resistência à OFLO se dá principalmente por substituições de aminoácidos nas regiões determinantes de resistência a quinolonas (QRDRs) localizadas nos domínios N- e C-terminais das subunidades A (*gyrA*) e B (*gyrB*) da DNA girase. Normalmente, mutações nos códons 89 e 91 em *gyrA*, relacionados com resistência do *M. leprae* à OFLO, são os mais pesquisados e a mutação no códon 91 (Ala91Val) é a mais frequente. No gene *gyrB* as mutações nos códons 214 (Val214Gly), 464 (Asp464Asn) e 503 (Thr503Ile) foram associadas com resistência à OFLO em *M. leprae*<sup>18,37,40,42</sup>. Provavelmente devido à baixa prevalência de resistência à OFLO, substituições em *gyrB* não sejam frequentemente analisadas<sup>43</sup>. No ILSL, apenas as mutações em *gyrA* são pesquisadas na rotina, e, portanto, não temos dados sobre mutações em *gyrB*.

Diante do exposto, (1) poucos casos de retratamento que podem ser explicados por mutações que sabidamente conferem resistência bacilar, (2) incremento do número de casos de resistência a OFLO, (3) escassos estudos envolvendo substituições em *gyrB*, somados a (4) poucas opções de tratamento alternativo, (5) a resistência antimicrobiana poder resultar em infecções persistentes, prejudicando as medidas de controle e (6) o desconhecimento do perfil de mutações em *gyrB* no banco de amostras do ILSL, propomos a análise de substituições de aminoácidos em *gyrB* para identificar mecanismos alternativos de resistência à OFLO.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo geral deste estudo é pesquisar mutações no gene *gyrB* por sequenciamento direto em amostras do biorrepositório do ILSL.

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Detectar mutações localizadas na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) no gene *gyrB* do *M. leprae* em amostras do biorrepositório do ILSL;
2. Descrever a frequência de amostras mutantes para o gene *gyrB* em amostras do biorrepositório do ILSL;
3. Comparar a presença de mutações no gene *gyrB* do *M. leprae* com amostras do biorrepositório do ILSL testadas para resistência por sequenciamento das regiões determinantes de resistência a drogas (DRDRs) recomendado pela OMS;
4. Elucidar a contribuição das mutações detectadas no gene *gyrB* do *M. leprae* para a resistência à ofloxacina no tratamento da hanseníase.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Amostras de DNA**

Um total de 52 amostras de DNA foram obtidas do biorrepositório do ILSL entre julho de 2021 a dezembro de 2023. O biorrepositório é constituído por amostras que já foram testadas

por sequenciamento direto na rotina de investigação de resistência em hanseníase do ILSL para mutações já descritas nos genes *folp1* (códon 53 e 55), *rpoB* (códon 441, 451, 456 e 458) e *gyrA* (códon 89 e 91), recomendadas pela OMS.

As amostras de DNA selecionadas do biorrepositório corresponderam às cepas de *M. leprae* isoladas de biópsias de lesões de pele de pacientes com hanseníase. Como critérios de inclusão as amostras do banco apresentaram: (1) resultado de qPCR confirmado para primer específico da região RLEP (Specific Repetitive Element) do DNA de *M. leprae*, (2) possuíam resultados de sequenciamento confirmados para os genes, *folP1*, *rpoB* e *gyrA* e (3) foram suscetíveis ou resistentes para DDS, RFP e OFLO.

A amostra de DNA com perfil de resistência sensível (Thai53), cedida pelo Dr. James Krahembuhl e mantida em laboratório através de passagens em camundongos nus atímicos será utilizada como controle tipo selvagem.

### **3.2. Extração de DNA do biorrepositório**

As biópsias em álcool 70% foram individualmente fragmentadas usando bisturi e transferidas para tubos contendo Tampão ATL (180 µL, Kit Dneasy Blood & Tissue, Qiagen, Brasil) e proteinase K (20 µL, Kit Dneasy Blood & Tissue, Qiagen, Brasil). Foram incubadas por 56°C overnight em banho-maria. O DNA de *M. leprae* foi extraído em equipamento QIAcube (QIAGEN) utilizando o Kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, Brasil). Após a estimativa da concentração (ng/µL) e pureza (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE), os DNAs isolados foram estocados a -20°C até o uso.

### **3.3. qPCR RLEP e Sequenciamento genômico**

A presença de DNA genômico de *M. leprae* foi confirmada por detecção da região RLEP (*Specific Repetitive Element*) por qPCR segundo Azevedo et al., 2017. PCR foram realizados para amplificar as DRDRs recomendados pela OMS (*folP1*, *rpoB* e *gyrA*) que conferem resistência a DDS, RFP, OFLO e/ou sensibilidade. A qualidade dos produtos amplificados foi

avaliada em gel de agarose a 1,5%. Os amplicons de PCR foram purificados e sequenciados no sequenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### 3.4. Amplificação de DRDR de *gyrB* por PCR

A PCR para amplificação das regiões gênicas de interesse do gene *gyrB* foi realizado com volume final de 20  $\mu$ L, contendo 1  $\mu$ L de tampão 10x, 0,5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mM), fornecidos no mesmo kit da enzima Taq DNA Polimerase, 1  $\mu$ L de dNTP (2,5 mM de cada nucleotídeo), 0,25  $\mu$ L de cada primer (10 pmol), 0,15U da enzima Taq DNA Polimerase e de 3 a 8  $\mu$ L de DNA genômico. O volume de água nuclease *free* foi ajustado conforme o volume de DNA alvo utilizado na reação. Os seguintes primers foram utilizados, o Par 1, forward 5' TAT GAC TTT GGG ACG GTG GC 3' e reverse 5' TGC TTG ACG AAG TCC ACC AG 3' para amplificação de um fragmento do gene *gyrB* de 242 pb e o Par 3, forward 5' TGG AAA ACT TGC CGA TTG CC 3' e reverse 5' GTG ATA ACG CAG CCT GGA GA 3' para amplificação de um fragmento de 259 pb. As condições da PCR foram as seguintes; desnaturação inicial de 95°C/ 5 minutos, ciclos de 94°C/40 seg., 60°C/40 seg., 72°C/3 min. durante 35 ciclos, seguidos de extensão final a 72°C/10 min. em Termociclador BioRad T100 Thermal Cycler. Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado DNA da cepa Thai53. DNA subtraído da reação de PCR foi utilizado como controle negativo (*mix* da PCR sem DNA). Os fragmentos amplificados por PCR foram observados em gel de agarose (1,5%, 90V/1 hora) e posteriormente recuperados da banda do gel no QIAcube (Qiagen) utilizando o kit MiniElute Gel Extract Kit.

### 3.5. Sequenciamento de DNA

O DNA recuperado da banda do gel foi sequenciado utilizando Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi preparada com volume final de 10  $\mu$ L, contendo 1,75  $\mu$ L de tampão 5x, 1  $\mu$ L de primer forward ou reverse (3,2 pmol), 0,5  $\mu$ L de Big Dye, 5,75  $\mu$ L de água ultrapura e 1  $\mu$ L de DNA. As condições da reação de sequenciamento ocorreram em, 96°C/1 min., 25 ciclos de 96°C/15 seg.,

50°C/15 seg. (rampa de 1°C/seg.), 60°C/4 min. (rampa 4°C/seg.). Os primers usados na reação de sequenciamento foram os mesmos usados para amplificação de DRDR de *gyrB* por PCR (descritos no item 3.4). As amostras foram purificadas por precipitação com etanol-EDTA e sequenciadas no 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os fragmentos sequenciados foram alinhados e analisados contra sequências referências retiradas do GeneBank (NCBI Reference Sequence NC\_002677.1), utilizando o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software v 10.0 para identificação de mutações associadas a resistência do *M. leprae* em *gyrB*.

#### 4 RESULTADO

Um total de 52 amostras de DNA do banco de amostras do ILSL foram analisadas. Essas amostras são provenientes da rotina de investigação de resistência em hanseníase do ILSL para mutações já descritas nos genes *folp1* (códon 53 e 55), *rpoB* (códon 441, 451, 456 e 458) e *gyrA* (códon 89 e 91), recomendadas pela OMS e foram selecionadas segundo os critérios de inclusão descritos anteriormente. Das amostras analisadas, 28 (53,84%) foram provenientes do sexo masculino, enquanto 23 (44,23%) do sexo feminino, sendo que 92,19% eram maiores de 20 anos e a média da idade de 51 anos. No quesito procedência, os pacientes eram originários de diversos estados brasileiros, destacando-se São Paulo (SP) e Mato Grosso (MT) como os mais representados. A forma clínica mais comum foi a multibacilar (MB), abrangendo significativos 92,30% dos casos (48/52), enquanto 4/52 (7,70%) estavam sem essa informação. Cerca de 51,92% das amostras foram provenientes de pacientes com hanseníase virchowiana (MHV), seguida pela hanseníase dimorfa (MHD) com 28,85%. Do total de casos, 55,70% foram associados a situações de falência terapêutica, seguida por casos novos, 19,23% e 11,54% de casos de recidiva da doença. A distribuição de acordo com gênero, idade, procedência, forma

clínica, classificação operacional [paucibacilar (PB) ou multibacilar (MB)], status e resultados da baciloscopia estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados gerais dos pacientes incluídos no estudo (n=52)

<b>Variável</b>	<b>Nº (%) de Pacientes</b>
<b><i>Gênero</i></b>	
Masculino	28/52 (53,84)
Feminino	23/52 (44,23)
NI	01/52 (1,93)
<b><i>Idade</i></b>	
≤ 20 anos	03/52 (5,77)
>20 anos	48/52 (92,30)
NI	01/52 (1,93)
<b><i>Procedência</i></b>	
GO	01/52 (1,93)
MG	04/52 (7,70)
MS	02/52 (3,84)
MT	08/52 (15,38)
PE	07/52 (13,46)
PR	06/52 (11,53)
RS	04/52 (7,69)
SC	02/52 (3,84)
SP	14/52 (26,92)
TO	03/52 (5,76)
NI	1/52 (1,93)
<b><i>Forma clínica</i></b>	
MB	48/52 (92,30)
NI	04/52 (7,70)
<b><i>Classificação</i></b>	
MHI	03/52 (5,76)
MHT	0/52 (0)
MHDT	0/52 (0)
MHD	15/52 (28,85)
MHDV	02/52 (3,85)
MHV	27/52 (51,92)
NI	05/52 (9,61)

**Status**

Suspeita de recidiva	06/52 (11,54)
Insuficiência terapêutica	03/52 (5,77)
Caso Novo	10/52 (19,23)
Falência terapêutica	29/52 (55,70)
NI	04/52 (7,70)

**IB**

0	1/52 (1,92)
0,2	1/52 (1,92)
0,5	2/52 (3,85)
0,8	1/52 (1,92)
0,75	2/52 (3,85)
1	2/52 (3,85)
1,25	1/52 (1,92)
2	1/52 (1,92)
2,5	2/52 (3,85)
2,25	1/52 (1,92)
2,75	1/52 (1,92)
3	1/52 (1,92)
3,5	1/52 (1,92)
4	5/52 (9,62)
4,5	1/52 (1,92)
4,16	1/52 (1,92)
5	6/52 (11,54)
5,25	2/52 (3,85)
NI	20/52 (38,46)

---

NI: não informado; MB: paciente multibacilar; MHI: Hanseníase indeterminada; MHT: Hanseníase Tuberculóide; MHDT: Hanseníase Dimorfa Tuberculóide; MHD: Hanseníase Dimorfa; MHDV: Hanseníase Dimorfa Virchowiana; MHV: Hanseníase Virchowiana; PQT PB: Poliquimioterapia Paucibacilar; PQT MB: Poliquimioterapia Multibacilar; IB: Baciloscopia.

Com relação ao tratamento realizado pelos pacientes cujas amostras foram incluídas no estudo, a maioria (59,61%) fez PQT/MB. Desses, apenas 3 (5,77%) realizaram um segundo tratamento. Um dos pacientes que já havia tratado 24 meses de PQT/MB fez mais 13 meses de RIF+MIN+CLO+OFX. Outro, fez um segundo tratamento alternativo, porém, não informou quais drogas foram usadas. O terceiro paciente, havia tratado com PQT/MB 12 meses e completou o segundo tratamento com mais 24 meses de PQT/MB. Em relação aos demais, 4 pacientes (7,69%) foram submetidos a abordagens terapêuticas alternativas no primeiro tratamento, 3 (75%) receberam RIF+CLO+OFX e um (25%), MINO+RIF+CLO. Este último, tratou uma segunda vez com claritromicina por 13 meses. Dos pacientes que fizeram

tratamento com PQT/MB, cerca de 74,19% trataram por 24 meses, enquanto o tratamento com PQT/PB foi menos frequente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Característica do tratamento dos pacientes (n=52)

Variável	Nº de tratamentos / Nº (%) pacientes	
	1º tratamento	2º tratamento
<b>PQT/MB</b>	<b>31/52 (59,61)</b>	<b>3/52 (5,77)</b>
12 doses	6/31 (19,35)	1/6 (16,66)
24 doses	23/31 (74,19)	2/23 (8,69)
>12 < 24	1/31 (3,22)	0
> 24	1/31 (3,22)	0
<b>PQT/PB</b>	<b>1/52 (1,92)</b>	<b>1/52 (1,92)</b>
6 doses	1/1 (100)	1/1 (100)
<b>Outros</b>	<b>4/52 (7,69)</b>	<b>1/52 (1,92)</b>
MINO+RIF+CLO	1/4 (25)	1/1 (100)
RIF+CLO+OFX	3/4 (75)	0
<b>Não trataram</b>	<b>10/52 (19,23)</b>	
<b>NI</b>	<b>6/52 (11,53)</b>	

NI: Não informado; RIF: rifampicina; OFX: ofloxacina; MINO: minociclina; CLO: clofazemina.

**Tabela 3.** Frequência das mutações nos genes *folp1*, *rpoB* e *gyrA* do *M. leprae* entre as amostras incluídas no estudo (n=52).

Gene <sup>a</sup>	Convergência Fenotípica <sup>b</sup>	Nº (%) de Amostras
<b><i>folp1</i></b>		
55, CCC →CGC	(Pro → Arg)	1 (1,92)
Não mutante		51 (98,03)
Não amplificaram PCR		0
<b><i>rpoB</i></b>		
Não mutante		48 (92,30)
Não amplificaram PCR		4 (7,70)
<b><i>gyrA</i></b>		
91, GCA →GTA	(Ala → Val)	26 (50)
Não mutante		26 (50)
Não amplificaram PCR		0

<sup>a</sup> Códon, mutação

<sup>b</sup> Aminoácidos: Pro: prolina; Arg: arginina; Ala: alanina; Val: valina.

Vinte e seis amostras apresentaram perfil de sensibilidade a todas as drogas. Por outro lado, uma das amostras apresentou perfil de resistência a dapsona e 26 foram resistentes a ofloxacina, apresentando mutação no gene *gyrA* e todas foram sensíveis a rifampicina (Tabela 3).

Os primers que foram utilizados estão mostrados na Tabela 4. O par de primer 1 (Par1) amplifica um fragmento de 242 pares de base e o par de primer 3 (Par 3) um fragmento de 259 pares de base.

**Tabela 4.** Sequências de primers usados nesse estudo.

Primer	Gene	Sequência	Tamanho fragmento (pb)
Par 1 (F)	<i>GyrB</i>	5' TAT GAC TTT GGG ACG GTG GC 3'	242
Par 1 (R)	<i>GyrB</i>	5' TGC TTG ACG AAG TCC ACC AG 3'	
Par 3 (F)	<i>GyrB</i>	5' TGG AAA ACT TGC CGA TTG CC 3'	259
Par 3 (R)	<i>GyrB</i>	5' GTG ATA ACG CAG CCT GGA GA 3'	

F: forward; R: reverse; pb: pares de base

Os resultados das PCRs para a amplificação dos fragmentos do gene *gyrB* estão demonstrados na Tabela 5. A categorização das amostras foi realizada em três grupos: positivo, quando a amplificação mostrou uma banda de DNA forte no gel de agarose a 1,5%, negativo, quando não houve observação de DNA amplificado no gel e fraco, quando a banda de DNA observada no gel de agarose apresentou-se pouco corada (Figura 1). No caso do Par 1, observamos que todas (100%) as amostras amplificaram esse fragmento, apenas uma delas (1,93%) amplificou fraco. No que diz respeito ao Par 3, apenas 37 (71,15%) das amostras foram positivas no gel, 10 (19,23%) amplificaram fraco e as outras 5 (9,62%) não amplificaram (negativas). O Par 1 mostrou uma taxa de positividade (1,10 x) maior em comparação com o Par 3.

**Tabela 5.** Resultado da PCR para a amplificação dos fragmentos de DNA do gene *gyrB* (n=52).

<b>gyrB</b>	<b>Par 1</b>	<b>Par 3</b>
<b>Positivo</b>	51/52 (98,07)	37/52 (71,15)
<b>Negativo</b>	0	5/52 (9,62)
<b>Fraco</b>	1/52 (1,93)	10/52 (19,23)

**Figura 1.** Imagem de gel de agarose 1,5% mostrando DNA amplificado e corado com Gel Red.

O sequenciamento foi considerado eficiente quando as sequências de DNA forneceram dados para identificação isolados não polimórficos (WT) e polimórficos (mutantes), independente dos polimorfismos (mutações) estarem ou não relacionados a droga resistência. Nesse caso, foram excluídos os isolados que não amplificaram no PCR ou que não produziram sequências legíveis nos eletroferogramas. Vale ressaltar que o par de primer 1, Par 1, amplifica um fragmento do gene *gyrB* o qual permite avaliar polimorfismo no códon 214, enquanto que o Par 3, nos códons 464 e 503. Especialmente no Par 3, observamos que o códon 464 foi melhor avaliado no sentido *reverse* da fita de DNA e o códon 503 no sentido *forward*. Portanto, o sequenciamento do gene *gyrB* pelo Par1 foi eficiente em aproximadamente 98,07% dos isolados de *M. leprae* e pelo Par 3, 69,23% (Tabela 6). Considerando os polimorfismos relacionados a droga resistência, no gene *gyrB*, nenhuma amostra foi polimórfica. Dados do

banco de amostras do ILSL, mostram que metade (50%) dos isolados analisados são polimórficos no códon 91 (Ala91Val) e 80,76% apresentam polimorfismos não relacionados a droga resistência no códon 99 (Arg99Arg).

Por outro lado, uma das amostras apresentou polimorfismo não relacionado a droga resistência no códon 207 (Ile207Ile) (Figura 2).

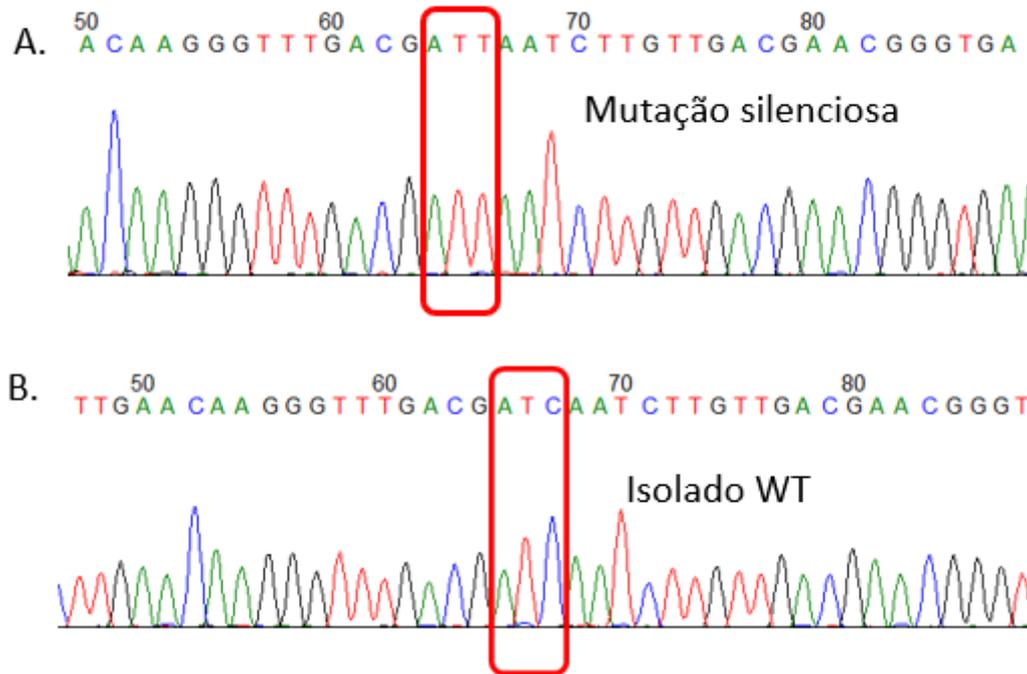
**Tabela 6.** Resultado do sequenciamento de DNA nos genes *gyrB* e *gyrA* do *M. leprae* nas amostras incluídas no estudo (n=52).

Gene	Nº (%) de amostras com sequenciamento eficiente	Nº (%) de amostras com presença polimorfismo <sup>a</sup>	Nº (%) de amostras com presença substituições <sup>b</sup>
<i>gyrB</i>			
Par 1	51/52 (98,07)	0/52 (0)	1/51 (1,96)
Par 3	36/52 (69,23)	0/52 (0)	
<i>gyrA</i>	52/52 (100)	26/52 (50)	42/52 (80,76)

<sup>a</sup> Apenas polimorfismos que conferem droga resistência.

<sup>b</sup> Substituições que não são conhecidas por conferir resistência a ofloxacina (códon 99)

**Figura 2.** Eletroferograma representando o sequenciamento de fragmento do gene *gyrB*. A: amostra de DNA mutante no códon 207 (ATT); B: amostra de DNA não polimórfico (WT).



## 5 CONCLUSÃO

A Poliquimioterapia (PQT) surgiu como um elemento fundamental na transforma o do cenário terapêutico da hanseníase. Composta por Rifampicina, Dapsona e Clofazimina, essa abordagem demonstrou eficácia notável, refletindo diretamente na redu o dos casos globais de hanseníase. Segundo o Ministério da Saúde, no mundo em 2022, foram registrados 174.087 casos novos de hanseníase, correspondendo a uma taxa de detec o de 21,8 casos por 1 milhão de habitantes. Índia, Brasil e Indonésia reportaram mais de 10 mil casos novos de hanseníase cada. O Brasil permanece em segundo lugar no ranking mundial em número de casos novos, o que o classifica como um país prioritário para hanseníase pela Organiza o Mundial da Saúde (OMS). Durante o período de 2013 a 2022 foram notificados 316.182 casos de hanseníase no País. De 2013 a 2022 houve uma redu o de 28,9% no número de casos notificados. Nos anos pré-pandemia da covid-19 (2013 a 2019) houve uma redu o de 0,8%. No que diz respeito   faixa etária, 53,9% situavam-se entre 30 e 59 anos, 24,6% (n=62.693) tinham 60 anos ou mais,

15,3% (n=38.899) estavam na faixa de 15 a 29 anos, e 6,3% (n=15.947) eram menores de 15 anos <sup>44</sup>. A análise das nossas amostras revelou que 53,13% eram do sexo masculino, 37,50% eram do sexo feminino, sendo que 92,19% eram maiores de 20 anos. O que comprova que mesmo com os números de casos analisados seja menor, o sexo masculino possui maior prevalência no diagnóstico de Hanseníase.

As fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos amplamente utilizada no tratamento de diversas infecções bacterianas, incluindo a hanseníase. Esses medicamentos apresentam um espectro de ação abrangente, inibindo a replicação do DNA bacteriano por meio da interferência nas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, essenciais para o processo de síntese e reparo do DNA. Na hanseníase, as fluoroquinolonas desempenham um papel crucial como parte do arsenal terapêutico, especialmente em casos de resistência ou intolerância a outros medicamentos utilizados na Poliquimioterapia. As fluoroquinolonas mais comumente utilizadas na hanseníase incluem Ofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina. Esses medicamentos possuem uma eficácia notável, resultando em uma rápida redução da carga bacteriana e contribuindo para a prevenção de resistência. No entanto, apesar de sua eficácia, diversos fatores podem levar ao desenvolvimento de resistência <sup>45,46,47,48</sup>

A resistência à fluoroquinolona emerge como uma consideração crucial no tratamento da hanseníase, apesar de sua prevalência ser inferior em comparação com outras doenças bacterianas. É pertinente destacar que, embora a resistência à fluoroquinolona seja um fenômeno relevante na hanseníase, sua incidência é mais proeminente na tuberculose. Na tuberculose, especialmente nos casos de tuberculose multirresistente (MDR-TB), que já incorporam resistência à isoniazida e rifampicina, observa-se frequentemente resistência adicional às fluoroquinolonas, tornando o manejo clínico mais complexo. A variação geográfica na prevalência da resistência à fluoroquinolona, influenciada por práticas de prescrição, aderência ao tratamento e infraestrutura de saúde, destaca a necessidade de vigilância epidemiológica contínua na hanseníase. Essa abordagem permite ajustes nas estratégias terapêuticas em resposta às dinâmicas evolutivas da resistência antimicrobiana <sup>49,50,51</sup>.

As mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, que codificam as subunidades das enzimas alvo, são os principais mecanismos de resistência observados <sup>52,53,54,55,56</sup>. Pesquisas constam que a resistência aos antimicrobianos da PQT se dá, primariamente, pela ocorrência de mutações em sequências conservadas dos genes *folp1* (Rifampicina), *rpoB* (Dapsona) e *gyrA* (Ofloxacina). Embora um grande número de casos de recidivas seja detectado no Brasil, apenas 8,4%, 13,3% e 1,9% dos casos podem ser explicados por mutações que sabidamente conferem resistência

bacilar à RIF, DDS e OFLO, respectivamente<sup>57,58,59</sup>. Entre as amostras estudadas na pesquisa, a frequência das mutações nos genes *folp1*, *rpoB* e *gyrA* foram no gene *folp1*, observando uma mutação em 1 amostra, resultando na substituição de prolina por arginina. Anteriormente, as substituições no *gyrB* foram descritas como estando principalmente associadas às substituições no *gyrA*, resultando em um elevado nível de resistência<sup>60,61</sup>. No entanto, em nosso estudo, as amostras indicaram mutações no códon *gyrA*, sem evidência de polimorfismo no gene *gyrB*, demonstrando a inexistência de associação.

Na rotina do ILSL, muitos pacientes que apresentam clínica compatível com recidiva a qual poderia estar associada a resistência, apresentam perfil de suscetibilidade sensível a DDS, RIF e OFLO pelos mecanismos conhecidos; suscitando a possibilidade de outros fatores estarem envolvidos no insucesso terapêutico. Essas observações justificam a pesquisa por outras mutações nos mesmos genes ou em outras sequências que possam estar associadas à resistência. Sendo assim, nós escolhemos estudar sobre o gene *gyrB*. A análise meticulosa das regiões do *gyrB* revelou eficiências variáveis de sequenciamento entre esse gene e a resistência à Ofloxacina. Embora tenhamos observado uma baixa incidência de substituições no *gyrB*, é crucial ressaltar a necessidade de expandir nosso estudo para incluir mais amostras. Portanto, este estudo serve como um ponto de partida promissor, indicando a importância de futuras investigações.

## REFERÊNCIAS

1. Froes LARJ, Sotto MN, Trindade MAB. Hanseníase: características clínicas e imunopatológicas. *Anais Brasileiros de dermatologia*. 2022 mai 01 [acesso 2023 Mai 15];97(3):338-347. Disponível em: <http://www.anaisdedermatologia.org.br/pt-pdf-S266627522200039X>
2. World Health Organization. Global leprosy: update on the 2012 situation. *Wkly Epidemiol Rec [Internet]*. 2013 Sept 30 [cited 2023 Aug 14];88(35):365-79. Available from: <http://www.who.int/publications/i/item/who-wer8835-365-379>
3. World Health Organization. *Chemotherapy of leprosy*. Geneva; WHO; 1994. [cited 2023 Aug 14]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39877>
4. World Health Organization. Global Leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. *Wkly Epidemiol Rec [internet]*. 2022 [cited 2023 Aug 14];97(36):429–52. Available from: <https://reliefweb.int/report/world/weekly-epidemiological-record-wer-9-september-2022-vol-97-no-36-2022-pp-429-452-enfr>
5. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico de Hanseníase [internet]. Brasília MS; 2023. [citado em 2023 Ago 14]. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hanseniase\\_-\\_25-01-2022.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hanseniase_-_25-01-2022.pdf)
6. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças Negligenciadas em Eliminação (CGHDE) [internet]. Brasília MS; 2015. [citado em 2023 Ago 14]. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_integrado\\_acoes\\_estrategicas\\_hanseniase.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_hanseniase.pdf).
7. Charles B, Shepard C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J. exp. med. [internet]* 1960 [cited 2023 Aug 14];112(3): 445–454. doi: 10.1084/jem.112.3.445.
8. Guinto RS, Cellona RV, Fajardo TT, Cruz EC. Primary dapsone-resistant leprosy in Cebu, Philippines. *Int. J. Leprosy [internet]*. 1981 [cited 2023 Aug 14];49(4): 427-430. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7042607/#:~:text=A%20survey%20of%20the%20prevalence,lepraefully%20susceptible%20to%20dapsone>.
9. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. *J. exp. Med [internet]*. 1960 [cited 2023 Aug 14];112: 445-54. doi: 10.1084/jem.112.3.445.
10. Pettit JHS, Rees RJW. Sulfone resistance in leprosy. An experimental and clinical study [internet]. 1964 [cited 2023 Aug 14]; 2(7361):673-4. doi: 10.1016/s0140-6736(64)92482-1.

11. Baohong, J. Drug resistance in leprosy – a review. *Lepr. Rev* [internet]. 1985 [cited 2023 Aug 14];56: 265-78. Available from: [http://leprev.ilsl.br/pdfs/1985/v56n4/pdf/pdf\\_full/v56n4.pdf](http://leprev.ilsl.br/pdfs/1985/v56n4/pdf/pdf_full/v56n4.pdf)
12. Matsuoka M, Kashiwabara Y, Namisato M. A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparfloxacin. *Int. J. Lepr* [internet]. 2000 [cited 2023 Aug 14];68 (4): 452-55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11332288/>.
13. Gillis TP, Williams DL. Dapsone resistance in *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* [internet]. 2000 [cited 2023 Aug 15];71 (1):S91-95. Available from: <http://leprev.ilsl.br/pdfs/2000/v71s1/pdf/v71s1a19.pdf>.
14. Cambau E, Bonnafe P, Perani E, Sougakoff WJIB, Jarlier V. Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. *Clin. Infect. Dis* [internet]. 2002 [cited 2023 Aug 15];34: 39-45. doi: 10.1086/324623
15. Sekar B, Elangeswaran N, Jayarama E, Rajendran M, Kumar, SS, Vijayaraghavan R, Anandan D, Arunagiri K. Drug susceptibility of *Mycobacterium leprae*: a retrospective analysis of mouse foot pad inoculation results from 1983 to 1997. *Lepr. Rev* [internet]. 2002 [cited 2023 Aug 16];73:239-244. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12449888/>
16. Shetty VP, Wakade AV, Ghata S, Pai VV, Ganapati R, Antia NH. Viability and drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* using mouse foot pad in 37 relapse cases of leprosy. *Int. J. lepr* [internet]. 2002 [cited 2023 Aug 16];71 (3): 210-217. Available from: [http://ijl.ilsl.br/detalhe\\_artigo.php?id=NTgxNQ==](http://ijl.ilsl.br/detalhe_artigo.php?id=NTgxNQ==)
17. Williams DL, Spring L, Harris E, Roche P, Gillis TP. Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* [internet] 2002 [cited 2023 Aug 16];44 (6):1530-37. doi: 10.1128/AAC.44.6.1530-1537.
18. Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseu C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Comm* [internet] Jan 2018 [cited 2023 Aug 16];24:9(1):352. doi: 10.1038/s41467-017-02576-z
19. Kai M, Matsuoka M, Nakata N, et al. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* to mutation in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett* [internet] 1999 [cited 2023 Aug 16];177(2): 231-35. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13737.x
20. Honoré N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother* [internet] 1993 [cited 2023 Aug 16];(37):414-18. doi: 10.1128/AAC.37.3.414
21. Jacobson RR, Hastings RC. Rifampin resistant leprosy. *Lancet* [internet] 1976 [cited 2023 Aug 16];11;2(7998):1304-5. doi: 10.1016/s0140-6736(76)92071-7
22. Jacobson RR. Final report of the WHO regional working group on drug policy and operational research in the leprosy programme. In: Manila, Philippines, p.10, 1981([https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/207182/ICP\\_BVM\\_005\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/207182/ICP_BVM_005_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y))

23. Guelpa-Lauras CC, Grosset JH, Constant-Desportes M, Brucker G. Nine cases of rifampin-resistant leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1984 Mar;52(1):101-2. PMID: 6538556.
24. Grosset J, Guelpa-Lauras CC, Bobin P, et al. Study of 39 documented relapses of multibacillary leprosy after treatment with rifampin. *Int. J. Lepr* [internet] 1989 [cited 2023 Aug 16];57: 607-14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2674301/>
25. Cambau E, Perani E, Guillemin I, et al. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *The Lancet* [internet] 1997 [cited 2023 Aug 16];349 (9045): 103-104. doi: 10.1016/S0140-6736(05)60888-4
26. Roche PW, Shrestha N, Thomas A, Honore N, Cole ST. Rapid detection of resistance to rifampicin in *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 2000 Dec;71 Suppl:S96-7; discussion S97-9. PMID: 11201897.
27. Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, et al. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother* [internet] 2001 [cited 2023 Aug 16]; 45(12):3635-9. doi: 10.1128/AAC.45.12.3635-3639.2001
28. Matsuoka M, Kashiwabara Y, Liangfen Z, et al. A second case of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* isolated from a japanese patient with relapsed lepromatous leprosy. *Int. J Other Mycobact Dis Lepr* [internet] 2003 [cited 2023 Aug 16];71 (3): 240-43. doi: 10.1489/1544-581x(2003)71<240:ascomm>2.0.co;2
29. Adalgiza SR, Alexandre ACS, Patrícia P, José NA, Antônio BM, Diego FS, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* from brazilian leprosy patients suggests the occurrence of re-infection or of bacterial population shift during disease relapse. *J Med Microbiol* [internet] 2011[cited 2023 Aug 16];1441–1446. doi: 10.1099/jmm.0.029389-0
30. Alzate CB, Díaz FL, Montoya MR, et al. Leprosy drug resistance surveillance in Colombia: The experience of a sentinela country. *PLoS Negl Trop Dis* [internet] Oct 2016 [cited 2023 Aug 16];5(10):e0005041. doi: 10.1371/journal.pntd.0005041
31. Cambau E, Saunderson P, Matsuoka M, Cole ST, Kai M, Suffys P, Rosa PS, et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-2015. *Clinical Microbiology and Infection* [internet] 2018 [cited 2023 Aug 16];1198-743X(18)30197-6. doi: 10.1016/j.cmi.2018.02.022
32. Mejía MDCC, Santos MP, Silva GAV, et al. Identification of primary drug resistance to rifampin in *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in Amazonas State, Brazil. *J. Clin. Microbiol* [internet] 2014 [cited 2023 Aug 16];52(12):4359-60. doi: 10.1128/JCM.01688-14.
33. Lavania M, Nigam A, Turankar RP, Singh I, Gupta P, Kumar S, et al. Emergence of primary drug resistance to rifampicin in *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in India. *Clin Microbiol Infect* [internet] 2015 [cited 2023 Aug 16];21(12):e85-6. doi: 10.1016/j.cmi.2015.08.004

34. Liu D, Zhang Q, Sun Y, Wang C, Zhang Y, Fu X, et al. Drug resistance in *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy in China. *Clin. Exp. Dermatol* [internet] 2015 [cited 2023 Aug 16];40(8):908-11. doi: 10.1111/ced.12665
35. A guide for surveillance of antimicrobial resistance in leprosy: 2017 update. WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789290225492>.
36. Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B. Multidrug resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet* [internet] 1997 [cited 2023 Aug 16];349:103–104. 1997. doi: 10.1016/S0140-6736(05)60888-4
37. Kim SK, Lee SB, Kang TJ, Chae GT. Detection of gene mutations related with drug resistance in *Mycobacterium leprae* from leprosy patients using touch-down (TD) PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* [internet] 2003 [cited 2023 Aug 16];36: 27–32. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00038-5.
38. Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, et al. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother* [internet] 2001 [cited 2023 Aug 16];45: 3635–3639. doi: 10.1128/AAC.45.12.3635-3639.2001
39. Matsuoka M, Kashiwabara Y, Namisato M. A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparfloxacin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* [internet] 2001 [cited 2023 Aug 16];68: 452–455. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11332288/>
40. You EY, Kang TJ, Kim SK, Lee SB, Chae GT. Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea. *J Infect* [internet] 2005 [cited 2023 Aug 16];50: 6–11. DOI: 10.1016/j.jinf.2004.03.012
- 41- Ahuja M, Singh I, Pathak VK, Darlong J, et al. Ofloxacin resistance in multibacillary new leprosy cases from Purulia, West Bengal: a threat to effective secondary line treatment for rifampicin-resistant leprosy cases. *J Glob Antimicrob Resist* [internet] 2022 [cited 2023 Aug 16];30:282-285. doi: 10.1016/j.jgar.2022.06.008.
- 42- Chokkakula S, Chen Z, Wang L, Jiang H, Chen Y, Shi Y, et al. Molecular surveillance of antimicrobial resistance and transmission pattern of *Mycobacterium leprae* in Chinese leprosy patients. *Emerg Microbe. Infect* [internet] 2019 [cited 2023 Aug 16];8:1479e89. doi: 10.1080/22221751.2019.1677177.
- 43- Chauffour A, Morel F, Reibel F, Petrella S, Mayer C, Cambau E, Aubry A. A systematic review of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase mutations and their impact on fluoroquinolone resistance. Elsevier [internet]. 2021 [cited from 2023 Aug 16] Available from: [:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X21003815?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X21003815?via%3Dihub)
- 44- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças Negligenciadas em Eliminação (CGHDE) [internet]. Brasília MS; 2015. [citado em 2024 Fev 15]. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2024/be\\_hansen-2024\\_19jan\\_final.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2024/be_hansen-2024_19jan_final.pdf)
- 45- Kim SK, Lee SB, Kang TJ, Chae GT. Detection of gene mutations related with drug resistance in *Mycobacterium leprae* from leprosy patients using touch-down (TD) PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* [internet] 2003 [cited 2023 Aug 16];36: 27–32. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00038-5.

- 46- Worobec SM. Treatment of leprosy/Hansen's disease in the early 21st century. *Dermatologic Therapy* [internet] 2009 [cited 2023 Feb 26]; 22:6: 518–537. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01274.x>
- 47- Chauffour A, Morel F, Reibel F, Petrella S, Mayer C, Cambau E, Aubry A. A systematic review of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase mutations and their impact on fluoroquinolone resistance. Elsevier [internet]. 2021 [cited from 2023 Aug 16] Available from: [:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X21003815?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X21003815?via%3Dihub)
- 48- Li X, Li G, Yang J, Jin G, Shao Y, Li Y, Wei P, Zhang L. Drug Resistance (Dapsone, Rifampicin, Ofloxacin) and Resistance-Related Gene Mutation Features in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. [internet] 2022 [cited from 2023 Mar 01];23(20):12443. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms232012443>
- 49- Wang Z, Sun R, Mu C, et al. Characterization of Fluoroquinolone-Resistant and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Using Whole- Genome Sequencing in Tianjin, China. Dovepress [internet] 2022 [cited from 2023 Mar 07]. Available from: <https://www.dovepress.com/characterization-of-fluoroquinolone-resistant-and-multidrug-resistant-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>
- 50- Pantel A, Petrella S, Veziris N, Brossier F, Bastian S, Jarlier V, Mayer C, Aubry A. Extending the definition of the GyrB quinolone resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* [internet] 2012 [cited from 2023 Mar 07];56(4):1990-6. doi: 10.1128/AAC.06272-11.
- 51- Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J, Rodwell T. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLoS One*. [internet] 2015 Mar [cited from: 2023 Mar 07];10(3):e0120470. doi: 10.1371/journal.pone.0120470.
- 52- Chhabra S, Narang T, Sahu S, et al. High frequency of ofloxacin resistance patterns of *Mycobacterium Leprae* from India: An indication to revisit second line anti-leprosy treatment regimen. *Elsivier* [internet] 2023 [cited from 2023 Mar 07] Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.10.006>
- 53- Jouet A, Braet S, Gaudin C, Bisch G, et al. Hi-plex deep amplicon sequencing for identification, high-resolution genotyping and multidrug resistance prediction of *Mycobacterium leprae* directly from patient biopsies by using Deeplex Myc-Lep. *eBioMedicine* [internet] 2023 [cited from 2023 Mar 07] Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104649>
- 54- Yokoyama K, Kim H, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Impact of Amino Acid Substitutions in B Subunit of DNA Gyrase in *Mycobacterium Leprae* on Fluoroquinolone Resistance. *PLOS Neglected tropical diseases* [internet] 2012 [cited from 2023 Mar 07] Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001838>
- 55- Matrat S, Cambau E, Jarlier V, Aubry A. Are all the DNA gyrase mutations found in *Mycobacterium leprae* clinical strains involved in resistance to fluoroquinolones? *Antimicrob Agents Chemother* [internet] 2008 [cited from 2023 Mar 07];52(2):745-7. doi: 10.1128/AAC.01095-07.

- 56- Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* [internet] 2015 [cited from 2023 Mar 07];1354(1):12-31. doi: 10.1111/nyas.12830
- 57- Iwao Y, Mori S, Ato M, Nakata N. Simultaneous Determination of *Mycobacterium leprae* Drug Resistance and Single-Nucleotide Polymorphism Genotype by Use of Nested Multiplex PCR with Amplicon Sequencing. *J Clin Microbiol* [internet] 2021 [cited from 2023 Mar 01] Available from: <https://doi.org/10.1128/jcm.00814-21>
- 58- Malik S, Willby M, Sikes D, Tsodikov OV, Posey JE. New insights into Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Genetic Analysis of *gyrA* and *gyrB* Mutations. [internet] 2012 [cited from 2023 Mar 01] Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039754>
- 59- Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York academy of sciences*. [internet] 2015 [cited from 2023 Mar 01] Available from: <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>
- 60- Kocagöz T, Hackbarth CJ, Unsal I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* [internet] 1996 [cited from 2023 Mar 06]. doi: 10.1128/AAC.40.8.1768.
- 61- Pantel A, Petrella S, Veziris N, Brossier F, Bastian S, Jarlier V, Mayer C. Extending the Definition of the *GyrB* Quinolone Resistance-Determining Region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase for Assessing Fluoroquinolone Resistance in *M. tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* [internet] 2012 [cited from 2023 Mar 06]. Available from: <https://doi.org/10.1128/aac.06272-11>