

PROTOCOLO PARA A VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA DOS MEDICAMENTOS
DA HANSENÍASE – INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA - BRASIL

NOVEMBRO DE 2016

Fundamentação

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. A luta contra a hanseníase tem sido um grande sucesso em grande parte devido ao desenvolvimento da poliquimioterapia (PQT) em 1981. Desde 1995, como resultado de doações à OMS da Novartis e da Fundação Novartis, todos os pacientes com hanseníase têm acesso à MDT sem custo. A eficácia da PQT na cura da hanseníase em um curto período de tempo trouxe uma diminuição dramática na carga da doença. No entanto, o declínio nos casos de hanseníase globalmente tem sido limitado desde o ano 2000 e ainda mais de 200.000 novos casos por ano são observados. Além disso, o aumento global da resistência antimicrobiana pode superar a epidemia de hanseníase. Uma vez que a rifampicina é a espinha dorsal do regime de MDT, é importante monitorizar o aparecimento de cepas resistentes à rifampicina, pelas recentes publicações que têm indicado casos de resistência à rifampicina em várias áreas endêmicas. A resistência à dapsona tem sido relatada desde o início de 1960. No caso da resistência à rifampicina, as fluoroquinolonas tornam-se os fármacos de segunda linha preferidos, mas infelizmente as cepas de *M. leprae* resistentes à fluoroquinolona já foram relatadas em vários países. A resistência à clofazimina ainda é rara. A resistência à ofloxacina também tem de ser monitorizada uma vez que as quinolonas fazem parte da maioria dos "regimes secundários" utilizados para tratar casos encontrados com resistência à PQT e considerando a sua utilização extensiva para tratar vários tipos de infecções. Para enfrentar o desafio de conter a doença e ser capaz de responder a um aumento da circulação de cepas resistentes a fármacos, é essencial manter uma vigília nos padrões de sensibilidade a drogas globalmente, bem como ser capaz de monitorar resistência primária e secundária.

Este documento visa orientar os países sobre como testar a resistência aos medicamentos da hanseníase, destacando quais os aspectos clínicos, de campo e laboratoriais a serem implementados para realizar esta atividade.

Objetivos

Objetivos Gerais:

O objetivo geral é oferecer diretrizes para a utilização de uma abordagem padronizada para:

- 1) Detectar a resistência aos fármacos anti-hansênicos primários e secundários (isto é, antibióticos utilizados no tratamento da hanseníase) entre os doentes de hanseníase;
- 2) Padronizar relatórios dos testes;
- 3) Monitorar as tendências ao longo do tempo da resistência a drogas global e nacional entre os novos casos de hanseníase e os recidivantes;
- 4) Identificar fatores de risco para resistência a medicamentos.

Objetivos específicos:

- I. Monitorar a tendência da resistência à rifampicina primária e secundária ocorrendo entre (i) novos casos de pacientes com hanseníase multibacilar (MB) e (ii) entre pacientes com hanseníase MB tratados que tiveram recidiva.
- II. Monitorar a tendência de resistência à dapsona primária e secundária ocorrendo entre (i) novos casos de pacientes com hanseníase MB e (ii) entre pacientes MB que foram tratados com hanseníase que tiveram recidiva.
- III. Monitorar a tendência de resistência à ofloxacina primária e secundária ocorrendo entre (i) novos casos de pacientes com hanseníase MB e (ii) entre pacientes MB que foram tratados com hanseníase que tiveram recidiva.

Antecedentes da vigilância da resistência aos medicamentos na hanseníase

A vigilância farmacológica começou em 2008, concentrando-se principalmente na resistência secundária com base apenas na inclusão de casos de recidiva. Os resultados foram publicados no WER e a última publicação foi feita na WER 3 de junho de 2011, 23 (86): 233-240.

Metodologia da vigilância da resistência aos medicamentos da hanseníase

Vigilância da Resistência Primária:

A vigilância da resistência primária às drogas na hanseníase será realizada com base em um modelo de vigilância sentinela com o objetivo de monitorar as tendências de resistência entre os novos casos de hanseníase durante um período de tempo.

Determinados estabelecimentos de saúde serão identificados no país e selecionados como locais sentinelas onde as amostras de tecidos e cópia da ficha do SINAN serão enviadas para os laboratórios de referência (ILSL, FIOCRUZ e FUAM).

Como é baseado em um modelo de vigilância sentinela, não pretende cobrir rotineiramente todos os novos casos diagnosticados no Brasil, mas os três Centros devem tentar testar 10% do total de novos casos detectados por ano. Uma estimativa de 10% dos casos novos será utilizada para que se obtenha uma representatividade de todo o Brasil.

Vigilância da Resistência Secundária:

Para recidivas, todos os casos confirmados como recidivas de MB serão testados quanto à resistência a fármacos. Isto implica que, quando houver suspeita de recidiva, o paciente será encaminhado para exame clínico e coleta de amostras.

Esboço geral do sistema de vigilância

O objetivo principal do sistema de vigilância sentinela é detectar a resistência à rifampicina primária e secundária entre os pacientes com hanseníase. A inclusão da resistência à dapsona aumentaria ainda mais a preparação para enfrentar a rifampicina e a resistência a múltiplos fármacos. A resistência à clofazimina é excepcional e não é

suficientemente conhecida por seu mecanismo e métodos moleculares para detectá-lo, portanto, o teste de resistência para esta droga não é recomendado no momento.

Ofloxacina é um dos fármacos eficazes para tratar casos resistentes à rifampicina e uma vez que as mutações para cepas resistentes à ofloxacina são agora bem conhecidas, decidiu-se incluir a monitorização da resistência à ofloxacina juntamente com rifampicina e dapsona. A ofloxacina não tem sido utilizada para o tratamento da hanseníase extensivamente em programas nacionais, além da combinação com rifampicina e minociclina como tratamento de dose única para hanseníase paucibacilar (PB) de lesão única e estudos experimentais de novos regimes. É também bem conhecido que este fármaco está facilmente disponível em muitos países, incluindo os endêmicos de lepra, e pode ser utilizado por médicos privados no tratamento da hanseníase.

Componentes

O sistema de vigilância é composto por várias partes:

- 1) O primeiro componente é a coleta sistemática de amostras no campo para todas as recidivas. Isso envolve a identificação adequada de casos de recidiva, a coleta de amostras de tecido apropriadas desses pacientes eo transporte de amostras para os laboratórios de referência nacional.
- 2) O segundo componente é a identificação de locais sentinela para o teste de novos casos de hanseníase para resistência a fármacos (apenas MB). A partir desses locais, deve também ser assegurada a coleta de amostras de tecido apropriadas destes doentes e o transporte das amostras para o respectivo laboratório de referência.
- 3) O terceiro componente é a parte laboratorial que será realizada por laboratórios de referência que receberão amostras do campo e realizados testes para resistência à rifampicina, dapsona e ofloxacina.
- 4) O quarto componente é a coleta sistemática de informações, a fim de acompanhar as tendências ao longo de um período de tempo e para garantir que os dados possam ser interpretados de forma significativa. Os dados serão armazenados num sistema de dados

eletrônico com acesso seguro e restrito especialmente desenhado para esse fim. No anexo 1, apresenta-se os dados sobre os doentes, incluindo as suas histórias de tratamento, sexo, idade e características socioeconômicas, a fim de identificar os fatores de risco para a resistência à droga nacional.

Seleção dos laboratórios envolvidos

A atividade de vigilância requer o fortalecimento da capacidade laboratorial atual para a pesquisa da hanseníase. O laboratório do ILSL foi identificado para coordenar e em conjunto com os laboratórios da FIOCRUZ e da FUAM irão desenvolver a capacidade para testes de resistência no Brasil. O ILSL com sua capacidade de realizar os teste de resistência também assumirá, a pedido da OMS, realizar testes e garantir a implementação de um sistema adequado para a coleta, armazenamento e remessa de amostras de países das Américas.

- ILSL: Estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), Maranhão, Tocantins, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais.
- FUAM: Região Norte (Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Pará e Amapá).
- FIOCRUZ: Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e da Região Nordeste (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia).

A vigilância da resistência aos medicamentos entre os novos casos será uma atividade continua para os centros participantes que necessitarão manter o trabalho de vigilância sentinela em longo prazo e, portanto, dispor dos recursos humanos necessários para realizar essa vigilância.

São deveres do programa nacional de hanseníase da SVS/MS garantir desempenho prático dos testes por parte dos laboratórios de referência, garantindo a disponibilidade de uma rede laboratorial para a coleta de amostras, transporte e armazenamento de espécimes, bem como o armazenamento e monitoramento de dados.

É necessário, então que a CGHDE/SVS/MS estabeleça um memorando de entendimento (MoU) para garantir o acesso a dados de resistência para poder realizar a monitorização do programa utilizando um sistema de informação de resistência medicamentosa de hanseníase (SIRMH) que está sendo desenvolvido com o apoio técnico da OPAS BRA.

Documentação

Os resultados dos testes também serão utilizados para o retratamento adequado do paciente, fornecendo informações de feed-back para as unidades de saúde que cuidam dos pacientes testados. Para tal, foram desenvolvidos formulários de informação clínica normalizados para registrar os dados que serão enviados aos laboratórios de referência e aos centros de saúde (ver Anexo 1).

Seleção de pessoas afetadas pela hanseníase a serem testadas para resistência aos medicamentos

Definições

Uma recidiva é definida como a re-ocorrência de hanseníase a qualquer momento após a conclusão de um curso completo de tratamento com a PQT recomendada pela OMS. A recidiva é diagnosticada pelo aparecimento de novas lesões cutâneas definitivas e pelo aumento do índice baciloscópico (BI) de duas ou mais unidades em qualquer local em comparação com BI retirado do mesmo local em um exame prévio.

Um novo caso de hanseníase é definido como uma pessoa com sinais e sintomas de hanseníase que nunca receberam tratamento.

Casos multibacilares (MB) têm seis ou mais lesões cutâneas, enquanto os casos paucibacilares (PB) têm até cinco lesões cutâneas no total.

Se um esfregaço de pele é feito e é positivo, o paciente deve ser classificado como MB, qualquer que seja o número de lesões cutâneas. Se o esfregaço é negativo, a classificação é decidida pelo número de lesões cutâneas. Outros fatores como o comprometimento do nervo podem ser considerados no nível de referência para classificar a doença.

Crítérios de inclusão

Todas as recidivas com evidência de BI2+ no exame de esfregaço e / ou biópsia em centros de referência.

Novos casos de hanseníase (MB somente) com evidência de BI2+ no exame de esfregaço e / ou biópsia detectados por sítios sentinela.

Para facilitar a disponibilidade de instalações de esfregaço / biópsia para novos casos, os locais sentinela podem ser identificados como centros de cuidados secundários e terciários que também podem ser os locais sentinela selecionados para a vigilância da resistência primária.

Todas as recidivas suspeitas serão encaminhadas para as instalações do centro de referência selecionado e serão examinadas por um especialista (médico experiente designado) para confirmar o diagnóstico de recidiva e excluir as reações e para realizar a coleta de amostras.

Todos os novos casos de hanseníase de centros sentinelas classificados como casos MB terão que recolher amostras, quer sendo referidas, quer diretamente no local sentinela. Apenas amostras pelo menos BI 2+ no exame de esfregaço ou biópsia serão transportadas para o laboratório nacional central para testes de resistência aos medicamentos a nível nacional ou internacional.

Consentimento do paciente

O consentimento do paciente deve ser obtido de acordo com as diretrizes éticas do país. Para os doentes com menos de 18 anos de idade, o consentimento dos pais deve ser pedido.

Na instalação de referência e no local sentinela

É importante que todos os casos que atendam aos critérios de seleção / inclusão sejam incluídos para testes e que suas informações sejam armazenadas corretamente em um banco de dados. Isso minimizaria os vieses de seleção que podem afetar a análise de tendências. As amostras devem então ser enviadas para o laboratório de referência designado no país.

Espera-se que cada local sentinela será capaz de identificar e colher as amostras de tecido necessárias a partir de pelo menos 10% do total de novos casos MB por ano em todo o país.

Para caso de recidiva, as informações sobre histórico de tratamento passado e apresentações clínicas atuais devem ser coletadas usando o formulário de relato de caso, conforme mostrado no Anexo 1. Cada Caso de recidiva MB será submetido a um esfregaço cutâneo utilizando a técnica padrão como para uma rotina de coleta de esfregaço cutâneo para índice bacteriológico. Para novo caso, a informação sobre histórico e apresentações clínicas atuais devem ser coletadas usando o formulário de relatório de caso como mostrado no Anexo 1 .

O número de identificação do caso é fornecido pelas autoridades nacionais e partilhado pelas autoridades de referência, pelas autoridades nacionais e pelo laboratório referência para teste.

Para cada caso que satisfaça os critérios de inclusão, o seguinte tipo de amostras será enviado para o laboratório referência. Os materiais biológicos serão coletados de acordo com sua prática clínica e consentimento do paciente.

- Preferencialmente uma biópsia de pele (por exemplo, biópsia de punch de 4 mm) de uma lesão proeminente.

- ou alternativamente duas amostras de esfregaço cutâneo de lesão com BI 2+ ou mais, lóbulos da orelha também são locais preferíveis para amostragem.

Dada a natureza da coleta e para facilitar a inscrição de todos os novos casos, os locais sentinelas serão selecionados entre os centros secundários e terciários onde ambos os especialistas para confirmar o diagnóstico ea capacidade de laboratório para coletar e armazenar as amostras estão disponíveis. Isso poderia levar a um viés na seleção dos pacientes, apenas aqueles com acesso a esses centros seriam incluídos, mas seria muito garantir cobertura de número adequado de novos pacientes para avaliar o nível de resistência primária. Pelo menos 10% dos novos casos de hanseníase MB devem ser testados quanto à resistência a rifampicina, dapsona e ofloxacina.

Informações a coletar

A primeira parte do formulário refere-se a informações como o número de identificação do caso, a data do relatório e os dados relativos ao instituto que enviou o espécime.

A segunda parte trata dos detalhes demográficos do caso, como idade, sexo, residência e, se possível, informações relacionadas a informações sócio-demográficas, incluindo sobre a cidadania do paciente.

A terceira parte trata da apresentação clínica atual do caso, juntamente com os testes realizados. A descrição detalhada do estado clínico das lesões cutâneas e nervosas, particularmente de qualquer nova lesão cutânea, deve ser registrada. É importante registrar os resultados de data e BI dos esfregaços cutâneos para cada local. As características clínicas e os resultados de esfregaço serão considerados para se chegar à atual classificação do caso de recidiva.

Para os casos de recidiva apenas: A quarta parte abrange a história clínica que inclui a data do diagnóstico inicial e detalhes sobre a apresentação clínica no momento do diagnóstico, classificação, incluindo razões e data se houver, re-classificação feita posteriormente, tratamento prescrito com indicação de adesão do paciente Ao tratamento e resultados de quaisquer testes que foram realizados. Caso o cartão de tratamento do doente esteja disponível, as informações supramencionadas poderão ser recolhidas a partir do mesmo. Normalmente, os cartões de pacientes idosos podem não estar disponíveis, caso em que as informações terão de ser recolhidas com base no recall do doente.

A quinta parte trata da descrição do local e dos resultados de BI dos espécimes de pele a serem enviados para a o laboratório referência.

Coleta de amostras e transporte

As amostras de esfregaço cutâneo ou as amostras de biópsia são transportadas para laboratório nacional para exame utilizando o serviço de transporte (anexo 3).

A biópsia da pele pode ser coletada com um punch de 4mm para casos novos, ou uma biópsia cirúrgica de 6mm no caso de casos de recidiva, especialmente se a BI estiver baixa. O paciente deve dar consentimento para fazer a biópsia. A biópsia pode ser colocada num tubo estéril de centrifugação de 1,8 ml (tipo parafuso), que são pré-cheias com 1 ml de etanol a 70% (etanol absoluto de grau de biologia molecular 70% + água

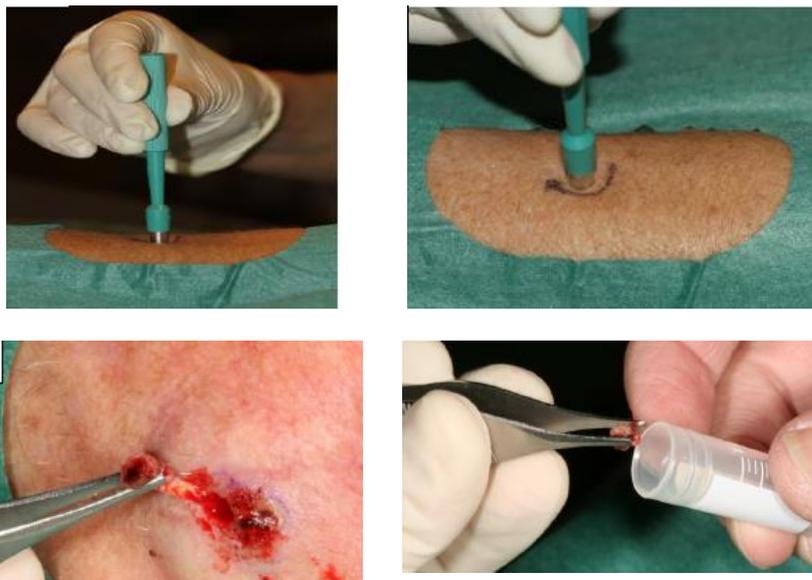
estéril deionizada de MilliQ ou com água para Injeção humana 30%, a mistura deve ser preparada em laboratório) como descrito acima. As amostras podem ser mantidas à temperatura ambiente e até serem enviadas para laboratórios em lote para detecção molecular de resistência. Os bacilos são rapidamente inativados, o que significa que as amostras podem ser enviadas por transporte de rotina sem a necessidade de controlar a temperatura durante o transporte, ou tomar precauções adicionais para o controle de biossegurança.

As amostras de esfregaço de pele fendida são colhidas da mesma maneira que a obtenção de esfregaços cutâneos para o exame do índice baciloscópio usando uma lâmina de aço inoxidável descartável. As amostras devem ser coletadas de dois locais diferentes das lesões cutâneas mais proeminentes ou de locais que apresentaram maior BI em exames prévios para casos suspeitos de recidiva. A lâmina de aço inoxidável Contendo as raspagens de tecido devem ser enxaguadas num tubo de centrífuga de 1,8 ml (tipo eppendorf) preenchido com 1 ml de etanol a 70% (etanol absoluto de grau de biologia molecular 70% + água estéril deionizada de MilliQ ou água para injeção humana 30 %, A mistura deve ser preparada no laboratório) certificando-se de que as raspas de tecido são lavadas da superfície da pá e estão suspensas na solução. Isto significa que a partir de cada caso serão colhidas duas amostras de esfregaço de pele.

Uma vez que, por vezes, não há DNA suficiente nas amostras para obter resultados de PCR, pode ser necessário nestes casos ter uma segunda amostra (segundo local, por exemplo, com um BI mais elevado). Por conseguinte, um segundo esfregaço cutâneo ou uma biópsia podem ser tomados depois de terem conversado com o centro de referência ou respectivo laboratório de referência caso a caso.

Figura 4: (A) Exame de esfregaço cutâneo e tubo de centrífuga com 1 ml de Etanol 70% para coleta de espécimes de tecido; (B) amostra de biópsia de ponta de pele e tubo para transporte





Courtesy of Dr Béatrice Flageul

Base molecular da resistência à rifampicina, dapsona e ofloxacina e métodos de detecção.

Antes do estudo para mutações nos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*, recomendamos realizar uma PCR de diagnóstico utilizando a amplificação do gene *RLEP* para não ir adiante no caso de amostras de PCR negativas.

O mapeamento recente do genoma de *M. leprae* com resistência identificou sítios onde ocorrem mutações, conferindo resistência à dapsona, rifampicina e quinolonas.

A rifampicina liga a subunidade beta (codificada pelo gene *rpoB*) da ARN polimerase e certas mutações no gene *rpoB* conduzem à resistência à rifampicina em *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Mutações de falta de sentido que conduzem à substituição de qualquer uma das posições seguintes (posições 438, 441, 451, 456 e 458) ou uma inserção de aminoácidos entre as posições 439 e 440 confere resistência a rifampicina a *M. leprae*.

As mutações de falta de sentido na região de determinação da resistência às sulfonas do gene *folP1* (codifica dihidropteroatosintase), resultando em alterações dos aminoácidos nas posições 53 e 55, conferem resistência à dapsona a *M. leprae*.

A correlação entre a resistência à ofloxacina e a mutação missense no gene *gyrA* foi confirmada na posição 91 (Ala91), mas as mutações em 89, 92 e 95 também são

consideradas conferindo resistência à ofloxacina de acordo com os resultados de *M. tuberculosis*.

O DNA em amostras de pele será amplificado por PCR e as mutações serão procuradas por sequenciamento. Quaisquer que sejam as técnicas utilizadas pelo laboratório, é obrigatório poder detectar mutações que confirmam resistência

Figura 2: Principais mutações e resistência aos fármacos anti-hansênicos.

Genes	Alterações na proteína (Mutações no DNA)	Base Genética da alteração no DNA*
folP1	Thr53Ile (ACC→ATC)	Mudança de C por T no nucleotídeo 158
folP1	Thr53Ala (ACC→GCC)	Mudança de A por G no nucleotídeo 157
folP1	Thr53Val (ACC→GTC)	Mudança de AC por GT nos nucleotídeos 157 e 158
folP1	Thr53Arg (ACC→AGA)	Mudança de C por G no nucleotídeo 158
folP1	Thr53Arg (ACC→AGG)	Mudança de CC para GG nos nucleotídeos 158 e 159
folP1	Pro55Leu (CCC→CTC)	Mudança de C para T no nucleotídeo 164
folP1	Pro55Ser (CCC→TCC)	Mudança de C para T no nucleotídeo 163
folP1	Pro55Arg (CCC→CGC)	Mudança de C para G no nucleotídeo 164
folP1	Pro55Arg (CCC→CGT)	Mudança de CC para GT nos nucleotídeos 164 e 165
folP1	Thr88Pro	Necessita validação
folP1	Asp91His	Necessita validação
rpoB	Gln437Val (CAG→GTG)	Mudança de CA para GT nos nucleotídeos 1219 e 1220
rpoB	Asp440Tyr (GAT→TAT)	Mudança de G para T no nucleotídeo 1228
rpoB	Asp440Asn (GAT→AAT)	Mudança de G para A no nucleotídeo 1228
rpoB	Glu441His (CAG→CAT)	Mudança de G para T no nucleotídeo 1233
rpoB	Ala441Thr	Necessita validação
rpoB	His450Asp (CAC→GAC)	Mudança de C para G no nucleotídeo 1258

PROJETO DE RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA EM
HANSENÍASE - ILSL - MS

rpoB	His450Tyr (CAC→TAC)	Mudança de C para T no nucleotídeo 1258
rpoB	Arg454Glu (CGG→CAG)	Necessita validação
rpoB	Ser456Leu (TCG→TTG)	Mudança de C para T no nucleotídeo 1274
rpoB	Ser456Met (TCG→ATG)	Mudança de TC para AT nos nucleotídeos 1273 e 1274
rpoB	Ser456Trp (TCG→TGG)	Mudança de C para G no nucleotídeo 1274
rpoB	Ser456Phe (TCG→TTC)	Mudança de CG para TC nos nucleotídeos 1274 e 1275
rpoB	Ala457Ser (GCG→TCG)	Mudança de G para T no nucleotídeo 1276
rpoB	Leu458Pro (CTG→CCG)	Mudança de T para C no nucleotídeo 1280
rpoB	Val472Ile (GTC→ATC)	Mudança de G para A no nucleotídeo 1321
rpoB	Gly481Val (GGC→GTC)	Mudança de G para T no nucleotídeo 1349
rpoB	Arg505Trp	Necessita validação
gyrA	Gly89Cys (GGC→TGC)	Mudança de G para T no nucleotídeo 265
gyrA	Ala91Val (GCA→GTA)	Mudança de C para T no nucleotídeo 272
gyrA	Ala91Thr	Necessita validação
gyrA	Ser92Ala	Necessita validação
gyrA	Leu97Phe	Necessita validação
gyrA	Arg107Leu	Necessita validação

Relatando resultados da sequenciamento de DNA

Os resultados da PCR e sequenciamento serão relatados diretamente ao centro de referência / instituto que enviou o formulário (médico responsável pelo paciente) e o gerente nacional do programa de hanseníase no Ministério da Saúde (Anexos 4 e 5).

O resultado será relatado no documento formatado apresentado em anexo da seguinte forma:

- resultados de PCR: amplificação de DNA ou não para cada gene

- a presença ou ausência de mutações conhecidas como conferindo resistência aos fármacos deve ser relatada como:

- "tipo selvagem" se essas mutações não forem encontradas.
- Se uma destas mutações for encontrada, escreva a substituição (por exemplo, Ser456Leu) com base no sistema de numeração da cepa TN do genoma de *M. leprae*.
- Outra mutação: esta poderia ser uma nova mutação ou uma mutação descrita anteriormente, mas desconhecida para conferir resistência. As mutações devem ser escritas com respeito à substituição (por exemplo, Lys411Asn) com a alteração de nucleótidos (por exemplo, AAA para AAC) com base no sistema de numeração da cepa TN do genoma de *M. leprae*.
- Não relate mutações silenciosas.

Disseminação de informações sobre resistência a medicamentos

O laboratório de testes informará sobre a susceptibilidade de *M. leprae* à rifampicina, dapsona e ofloxacina aos respectivos centros onde foram coletadas amostras em cada país. Cada centro irá então tomar as medidas necessárias para informar o centro de saúde onde o paciente recidiva MB está atualmente a ser submetido a tratamento e, ao mesmo tempo, fornecer os medicamentos de segunda linha necessários para tratar o doente como recomendado.

Para os novos casos de hanseníase testados para resistência a medicamentos para fins de vigilância, cujas amostras foram coletadas em centros de vigilância, os relatórios laboratoriais serão enviados de volta para informar os resultados e uma cópia do relatório será enviada ao Coordenador do Programa Nacional de Hanseníase.

O Ministério da Saúde enviará relatórios sobre os resultados ao Programa Global de Hanseníase da OMS (BPL) para a compilação de dados, uma vez que a apresentação de dados sobre resistência a medicamentos fará parte do pedido anual de dados da OMS a partir de 2017. A BPL coordenará, a cada dois anos, o desenvolvimento de uma publicação mais detalhada sobre a resistência aos fármacos na hanseníase.

Controle de qualidade

O controle de qualidade dos laboratórios regionais ou nacionais será realizado pelo laboratório de referência que escolheram como parceiro. Este laboratório enviará DNA representativo de amostras bacilares (sem mutação, mutação conhecida) antes e durante o estudo. Por conseguinte, cada programa nacional terá de estar ligado ao laboratório de referência a nível nacional (para países com mais de um laboratório de ensaios) ou no estrangeiro (para países com apenas um ensaio laboratorial).

Além disso, serão efetuados controles periódicos de qualidade no que diz respeito à seleção de doentes, à introdução de dados e ao transporte de espécimes pelo programa nacional de luta contra a hanseníase em colaboração com a OMS durante a missão de revisão do programa e / ou acompanhamento ad hoc.

O controle de qualidade dos laboratórios será conduzido de acordo com procedimentos padrão. O laboratório que irá conduzir o controle de qualidade será identificado em consulta com todos os parceiros.

Todas as amostras de pele positiva e negativa de cada caso devem ser arquivadas.

Para garantia de qualidade e testes adicionais. Os espécimes deverão ser mantidos congelados pelo laboratório durante pelo menos dez anos.

Lista de laboratórios de ensaio

Foram identificados os seguintes laboratórios de referência no mundo para a detecção molecular de resistência na hanseníase:

- (1) Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil.
- (2) Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- (3) Fundação Alfredo da Matta, Manaus, AM, Brasil.(4) Centro Nacional de Referência sobre Micobactérias e Resistência a Medicamentos Anti-Tuberculose, APHP, Paris, França.
- (5) Instituto Global de Saúde, EcolePolytechnique Federal de Lausanne, Suíça.
- (6) Instituto de Dermatologia e Centro Nacional de Controle da Hanseníase, Nanjing, China.

- (7) Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidade, CES, Medellín, Colômbia.
- (8) Laboratório Stanley Brown, Delhi, Índia.
- (9) JALMA, Agra, Índia.
- (10) Blue Peter Research Center, Hyderabad, Índia.
- (11) Centro de Doenças Tropicais, Universidade de Airlangga, Surabaya, Indonésia.
- (12) Departamento de Microbiologia, Universidade da Indonésia, Jacarta, Indonésia.
- (13) Leprosy Research Center, Tóquio, Japão.
- (14) Hospital Anandaban, Katmandu, Nepal.
- (15) National Hansen's Disease Programs Laboratory Research Branch, Baton Rouge, EUA.
- (16) Grupo de Pesquisa sobre Tuberculose e Hanseníase Centro de Doenças Transmissíveis, icddr, b. Dhaka, Bangladesh.

ANEXOS

Anexo 1: Formulário clico epidemiológico dos pacientes (sistema informação)

Anexo 2: Protocolo envio amostras

PROTOCOLO PARA COLETA E ENVIO DE BIÓPSIA PARA SEQUENCIAMENTO

(teste de sensibilidade a drogas da PQT)

Contato: fachinlu@gmail.com, eqpato@ilsl.br, prosa@ilsl.br

Lavar bem o local da coleta da biópsia, realizando em seguida a antissepsia com álcool 70° GL ou álcool-iodado.

Com auxílio de um punch de 5 ou 6mm, coletar um pequeno fragmento da borda da lesão, que alcance até a hipoderme, retirando o excesso de sangue com uma gaze.

Transferir a biópsia para um pequeno frasco estéril (TUBO EPPENDORF, TUBO FALCON), contendo pelo menos 1ml de álcool 70° gl. Certificar-se que o tubo esteja devidamente rosqueado para que o álcool não derrame.

Vedar a tampa do frasco com esparadrapo e identificá-lo com dados do paciente (nome, prontuário, idade).

Colocar o frasco dentro de uma luva cirúrgica, amarrando a sua abertura da luva com um nó.

Em seguida, colocar a luva dentro de uma caixa para não quebrar ou rachar durante o transporte; vedar a caixa com fita adesiva e enviá-la para o Instituto Lauro de Souza Lima, via SEDEX.

O material deverá ser enviado para o Instituto Lauro de Souza Lima, rodovia Comandante João Ribeiro de Barros km 225, CEP 17034-971, aos cuidados de Luciana Fachin – Equipe Técnica de Patologia.

Enviar o formulário em anexo preenchido com dados da Unidade de Saúde e do paciente.

É recomendável realizar baciloscopia antes da coleta da biópsia, para se ter certeza da presença de bacilos no local de coleta. O índice bacilar deverá ser positivo. Avisar o nosso laboratório a data do envio do material, informando o nº do documento de envio (nº de conhecimento) caso o transporte for aéreo, através do telefone (14)3103-5911 (Patrícia), (14)3103-5910 ou 3103-5888 (Luciana), ou por e-mail.

OBS: O material mantido em álcool pode ser mantido por algumas semanas à temperatura ambiente.

Anexo 3. Transporte.

Anexo 4. Modelo de Laudo do laboratório de referencia



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
Instituto "Lauro de Souza Lima"
Bauru - São Paulo - Brasil



LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

NOME: [] N. SUS: [] N.DNA^{an}local-nº
DATA NASC.: [] REGISTRO: [] SEXO: [] COR: []
MEDICO: []
DATA DE ENTRADA: [] DATA DE PROCESSAMENTO: []

Laudo resistência - análises de mutações no DNA de *M. leprae*

MATERIAL: []

RESUMO CLÍNICO: []

RESULTADOS DE SEQUENCIAMENTO:

a) Gene rpoB

- PCR negativa Sem Mutação (não reportar mutação silenciosa)
 Sem leitura no seqüenciamento Mutação associada a resistência a rifampicina:

b) Gene folP

- PCR negativa Sem Mutação (não reportar mutação silenciosa)
 Sem leitura no seqüenciamento Mutação associada a resistência a dapsona:

Gene gyrA

- PCR negativa Sem Mutação (não reportar mutação silenciosa)
 Sem leitura no seqüenciamento Mutação associada a resistência a ofloxacina:

Observações:

Assinatura do Responsável Técnico

Bauru, 14/11/2016

Endereço: Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km. 225/226
Telefone: PABX (14) 3103-5900 Patologia (14) 3103-5888 – FAX: (14) 3103-5914
Caixa Postal 3021 - CEP 17034-971
e-mail: eqpato@ilsl.br

Anexo 5: Formulários de Relatórios para MS e OMS

[..\WHO Nepal\Data collection tables DRS meeting 2015.xlsx](#)

Anexo 6. Termo de Consentimento

Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ recebi informações para a participação voluntária da rede de vigilância de resistência a antimicrobianos utilizados na hanseníase no Brasil. Este estudo tem como objetivo a melhor compreensão da hanseníase, e ajudar a conhecer a magnitude de resistências e esclarecer as causas das recidivas e assim propor estratégias para o seu controle. Recebi informação dos pesquisadores que esta avaliação faz parte da rotina do serviço de saúde para o programa de controle da hanseníase.

Para esta participação me submeterei a:

- A) Exame clínico com médico especializado em hanseníase;
- B) Coleta de amostras para exames de laboratórios:
 - 1) Coleta de biópsia de pele de lesão específica da hanseníase para ver se a bactéria presente neste local apresenta resistência aos medicamentos utilizados para tratar a doença e/ou
 - 2) Coleta de raspado dérmico de orelhas, cotovelos, joelhos e lesão de pele com o mesmo objetivo.

Afirmo que entendi que o meu nome não será revelado, assim como não serei identificado em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Entendo que não terei despesas e não receberei qualquer benefício material por participar do estudo.

Fui informado, que posso receber qualquer tipo de explicação do pesquisador responsável e que terei acesso aos resultados se assim o desejar. Receberei uma cópia deste consentimento informado e outra cópia será arquivada.

Declaro também que fui informado que o material coletado será armazenado e que caso necessite ser utilizado em nova pesquisa serei comunicado para nova autorização.

Devidamente informado e esclarecido, manifesto aqui meu consentimento em participar do estudo.

_____, _____ de _____ de _____

Assinatura do responsável legal do paciente

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

Instituto Lauro de Souza Lima

Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros km 225-226

CEP: 17034-971 Bauru – São Paulo

Telefone: (14) 3103-5911

Anexo 7. Protocolo para tratamento de casos resistentes detectados

Todos os casos incluídos no estudo de vigilância devem ser imediatamente submetidos a tratamento com MDT padrão sem esperar pelos resultados do laboratório de referência sobre o estado de resistência aos fármacos.

- Se o resultado voltar como sensível à rifampicina, o tratamento com MB-MDT deve ser continuado em conformidade.

- Para os doentes que são relatados como resistentes à dapsona apenas, a MB-MDT padrão pode ser continuada, mas o doente deve ser seguido no final do tratamento e regularmente examinado para suspeita de recidiva

- Para pacientes com resistência apenas a quinolonas, a PQT deve ser continuada com segurança. No entanto, o paciente, sua família e médico devem ser questionados para a prescrição anterior de quinolonas.

- Caso o laboratório de referência informe que o doente está a receber *M. leprae* resistente à rifampicina, deve ser administrado o seguinte tratamento I:

- administração de 400 mg de ofloxacina e 100 mg de minociclina, mais 50 mg de clofazimina, em conjunto diariamente durante seis meses;
- administração de 400 mg de ofloxacina diariamente ou 100 mg de minociclina, mais 50 mg de clofazimina, ou durante pelo menos mais 18 meses.

O regime de tratamento acima mencionado é obrigatório para ser utilizado em doentes que se sabe estarem portadores tanto de rifampicina como de *M. leprae* resistentes à dapsona. Nos casos com cepa resistente à rifampicina mas susceptível à dapsona, o regime de tratamento acima pode ser utilizado. Além disso, um regime de tratamento incluindo dapsona pode ser discutido com o centro de referência nacional.

Para todos os casos para os quais um caractere de resistência é detectado, um formulário específico deve ser preenchido solicitando a prescrição anterior deste antibiótico para o Pacientes ou sua família, hanseníase prévia (para dapsona), tuberculose anterior (para rifampicina) ou outras infecções recentes (para quinolonas).

Referencias

AdamsLB,JobCKandKrahenbuhlJL.Roleofinduciblenitricoxidesynthas
einresistancetoMycobacteriumlepraeinmice.InfectImmun2000;
68:5462-5.

CambauE,PeraniE,GuilleminI,JametPandJiB.Multidrug-resistance
todapsone,rifampicin,andofloxacininMycobacteriumleprae.Lancet 1997;
349:103-4.

CambauE,BonafousP,PeraniEetal.Moleculardetectionofrifampicin
andofloxacinresistanceforpatientswhoexperiencearelapseofmultibacillary
leprosy.ClinInfectDis,2001;34:39-45.

CambauE,CarthagenL,ChauffourAetal.Dihydropteroatesynthasemutati
onsin the *folP1* gene predictdapsone resistance in
relapsedcasesofleprosy.ClinInfectDis,2006;42:238-241.

Cambau E, Chauffour-Nevejans A, Tejmar-Kolar L, Matsuoka M,
Jarlier V.Detection of antibiotic resistance in leprosy using
GenoTypeLepraeDR, a novelready-to-use molecular test.
PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(7):e1739

GillisTP,WilliamsDL.Dapsoneresistancedoesnotappeartobeassociated
withamutationinthedihydropteroatesynthase-
2geneofMycobacteriumleprae.IndianJLepr1999;71:11-8.

GillisTP,WilliamsDL.DapsoneresistanceinMycobacteriumleprae.Lepr
Rev2000;71 Suppl:S91-5.

Ginsberg,AnnMandSpigelman,Melvin.Challengesintuberculosisdrug
researchanddevelopment.NatureMedicine2007,Vol13,No3:290-4.

Hirawati,KatochK,ChauhanDS,etal.DetectionofM.lepraebyreversetrans
cription-PCRinbiopsy specimens from leprosy cases: a preliminary
study. JCommunDis2006;38:280-7

HonoreN,ColeST.MolecularbasisofrifampinresistanceinMycobacter
iumleprae.AntimicrobAgentsChemother1993;

HonoreN,PerraniE,TelentiA,GrossetJandColeST.Asimpleandrapidtechniqu
eforthedetectionofrifampinresistanceinMycobacteriumleprae.IntJLeprOt
herMycobactDis1993;61:600-4.

JiBaohong.Newmulti-drug regimens are needed for better

leprosy control. Paper presented at the 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India 30th January to 4th February 2008.

Kai M, Matsuoka M, Nakata N, et al. Diaminodiphenyl sulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 177:231-5.

Kai M. [Diaminodiphenyl sulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene]. *Nihon Hansen byo Gakkai Zasshi* 2004; 73:221-6

Katoch VM, Lavania M, Chauhan DS, Sharma R, Hirawati and Katoch K. Recent advances in molecular biology of leprosy. *Indian J Lepr* 2007; 79:151-66.

Kim SK, Lee SB, Kang TJ and 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* 2003; 36:27-32.

Lavania M, Katoch K, Sachan P et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences. *J Commun Dis* 2006; 38:269-73.

Lee SB, Kim SK, Kang TJ, et al. The prevalence of folP1 mutations associated with clinical resistance to dapson, in *Mycobacterium leprae* isolates from South Korea. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95:429-32.

Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, et al. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3635-9.

Matrat S, Cambau E, Jarlier V and Aubry A. Are all the DNA gyrase mutations found in *Mycobacterium leprae* clinical strains involved in resistance to fluoroquinolones? *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:745-7

Matsuoka M, Kashiwabara Y, Namisato M. A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapson, rifampin, ofloxacin and sparfloxacin. *Int J Lep*, 2000; 68:452-455.

Matsuoka M, Kashiwabara Y, Zhang L et al. A second case of multidrug resistant *Mycobacterium leprae* isolated from a Japanese patient with relapsed lepromatous leprosy. *Int J Lep*, 2003; 71:240-243.

Matsuoka M, Budiawan T, Aye KS, et al. The frequency of drug resistance mutations in *Mycobacterium leprae* isolates in untreated and relapsed leprosy patients from Myanmar, Indonesia and the Philippines. *Lepr Rev* 2007; 78:343-52.

ParasharD, ChauhanDS, SharmaVD and KatochVM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res* 2006; 124: 385-98.

RamasootaP, WongwitW, SampunachotP, UnnaratK, NgamyinM and SvensonSB. Multiple mutations in the *hsp65* gene of *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31: 493-7.

RochePW, ShresthaN, ThomasA, HonoreN and ColeST. Rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 2000; 71(Suppl): S96-7; discussion S97-9.

Sapkota BR, Ranjit C and MacdonaldM. Reverse line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Nepal Med Coll J* 2006; 8: 122-7.

SapkotaBR, RanjitC, NeupaneKD and MacdonaldM. Development and evaluation of a novel multiple-primer PCR amplification refractory mutations system for the rapid detection of mutations conferring rifampicin resistance in codon 425 of the *hsp65* gene of *Mycobacterium leprae*. *J Med Microbiol* 2008; 57: 179-84.

WilliamsDL, WaguespackC, EisenackK et al. Characterization of rifampicin resistance in pathogenic *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 2380-2386.

WilliamsDL, SpringL, HarrisE, RocheP and GillisTP. Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsoner resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1530-7.

WilliamsDL, GillisTP. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 2004; 75: 118-30.

You EY, Kang TJ, Kim SK, Lee SB and Chae GT. Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea. *J Infect* 2005; 50: 6-11.

Zhang L, Namisato M and Matsuoka M. A mutation at codon 516 in the *poB* gene of *Mycobacterium leprae* confers resistance to rifampin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004;72:468-72.2.