

## Impacto da qPCR na avaliação diagnóstica de indivíduos com suspeição de hanseníase

Impact of qPCR on the diagnostic evaluation of individuals with suspected leprosy

Impacto de qPCR en la evaluación diagnóstica de individuos con sospecha de lepra

Recebido: 11/02/2023 | Revisado: 24/02/2023 | Aceitado: 25/02/2023 | Publicado: 02/03/2023

**Marcos Daniel Silva Pinheiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2278-4822>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil;  
E-mail: [mdspineiro@gmail.com](mailto:mdspineiro@gmail.com)

**Nathan Guilherme de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2407-5771>  
Instituto Lauro de Souza Lima, Brasil  
E-mail: [biomed.nathanoliveira@gmail.com](mailto:biomed.nathanoliveira@gmail.com)

**Daisy Cristina Monteiro dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8304-4986>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [daisy.monteiro@estudante.ufjf.br](mailto:daisy.monteiro@estudante.ufjf.br)

**Heloine Martins Leite**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0488-2923>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [heloine.leite@ufjf.br](mailto:heloine.leite@ufjf.br)

**Ida Maria Foschiani Dias Baptista**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1574-9490>  
Instituto Lauro de Souza Lima, Brasil  
E-mail: [ifoschiani@gmail.com](mailto:ifoschiani@gmail.com)

**Jessica K. Fairley**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4086-9272>  
Emory University, USA  
E-mail: [jessica.fairley@emory.edu](mailto:jessica.fairley@emory.edu)

**Lucia Alves de Oliveira Fraga**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9238-2960>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [luciaalvesfraga@yahoo.com.br](mailto:luciaalvesfraga@yahoo.com.br)

### Resumo

**Introdução:** A hanseníase é uma infecção crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* acometendo primariamente os nervos periféricos. Sabe-se que apesar da redução do número de casos novos, a transmissão continua ativa pela incidência de casos em menores de 15 anos. Assim, torna-se relevante a busca de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos para a detecção de infecção subclínica. **Objetivo:** verificar através da qPCR, a presença do *M. leprae* em raspados intradérmicos (RI) de indivíduos atendidos no CREDEN-PES/GV/MG. **Método:** Realizou-se coletas de amostras de raspado intradérmico (RI) de 411 participantes para determinação do índice baciloscópico (IB), extração e amplificação de DNA do *M. leprae*. Os participantes foram divididos em dois grupos: GRUPO 1, “Casos notificados”, registrados no SINAN; GRUPO 2, “Indivíduos não notificados”, que apresentavam quadro de suspeição diagnóstica para hanseníase. Do total de 411 amostras coletadas, 158 foram obtidas de casos notificados e 253 de indivíduos não notificados. **Resultados:** Verificou-se que do total de casos, 58,86% (masculino) e 41,14% (feminino). Entre os indivíduos não notificados, 53,36% (masculino) e 46,64% (feminino). Considerando a faixa etária, ambos os grupos apresentaram idade (40 a 69 anos). Quanto ao IB, 34,18% (casos) e 0% (não notificados) apresentaram IB positivo. Na qPCR, 82,28% dos casos e 47,43% dos indivíduos não notificados testaram positivo, com uma razão de chance de adoecimento de 5,14. **Conclusão:** É possível inferir, que os indivíduos com suspeição de hanseníase, com a qPCR positiva, podem ser portadores de infecção subclínica e potenciais transmissores do *M. leprae* para indivíduos mais susceptíveis.

**Palavras-chave:** Hanseníase; qPCR; Diagnóstico precoce.

### Abstract

**Introduction:** Leprosy is a chronic infection caused by *Mycobacterium leprae*, primarily affecting the peripheral nerves. It is known that despite the reduction in the number of new cases, transmission remains active due to the incidence of cases in children under 15 years of age. Thus, the search for more sensitive and specific diagnostic methods for the detection of subclinical infection becomes relevant. **Objective:** to verify, through qPCR, the presence of *M. leprae* in

intra-dermal scrapings (IS) of individuals treated at CREDEN-PES/GV/MG. Method: Intra-dermal scraping (IS) samples were collected from 411 participants to determine the bacilloscopic index (BI), extraction, and amplification of *M. leprae* DNA. Participants were divided into two groups: GROUP 1, "Notified cases," registered at SINAN; GROUP 2, "Individuals not notified," who had a suspected diagnosis of leprosy. Of the total of 411 samples collected, 158 were obtained from notified cases and 253 from not notified individuals. Results: It was found that of the total number of cases, 58.86% (male) and 41.14% (female). Among the not notified individuals, 53.36% (male) and 46.64% (female). Considering the age range, both groups were aged (40 to 69 years). As for the IS, 34.18% (cases) and 0% (not notified) had a positive IS. In qPCR, 82.28% of cases and 47.43% of not notified individuals tested positive, with an illness odds ratio of 5.14. Conclusion: It is possible to infer those individuals with suspected leprosy, with positive qPCR, may be carriers of subclinical infection and potential transmitters of *M. leprae* to more susceptible individuals.

**Keywords:** Leprosy; qPCR; Early diagnosis.

### Resumen

Introducción: La lepra es una infección crónica causada por *Mycobacterium leprae*, que afecta principalmente a los nervios periféricos. Se sabe que a pesar de la reducción en el número de casos nuevos, la transmisión se mantiene activa debido a la incidencia de casos en menores de 15 años. Por lo tanto, cobra relevancia la búsqueda de métodos diagnósticos más sensibles y específicos para la detección de la infección subclínica. Objetivo: verificar, mediante qPCR, la presencia de *M. leprae* en raspados intradérmicos (IR) de individuos atendidos en CREDEN-PES/GV/MG. Método: Se recolectaron muestras de raspado intradérmico (IR) de 411 participantes para determinar el índice bacilosκόpic (IB), extracción y amplificación de ADN de *M. leprae*. Los participantes fueron divididos en dos grupos: GRUPO 1, "Casos notificados", registrados en el SINAN; GRUPO 2, "Personas no notificadas", que tenían sospecha diagnóstica de lepra. Del total de 411 muestras recolectadas, 158 se obtuvieron de casos notificados y 253 de personas no notificadas. Resultados: Se encontró que del total de casos, el 58,86% (masculino) y el 41,14% (femenino). Entre los individuos no declarados, el 53,36% (hombre) y el 46,64% (mujer). Teniendo en cuenta el rango de edad, ambos grupos eran mayores (40 a 69 años). En cuanto al IB, el 34,18% (casos) y el 0% (no notificados) tuvieron IB positivo. En qPCR, el 82,28 % de los casos y el 47,43 % de las personas no notificadas dieron positivo, con una razón de probabilidad de enfermedad de 5,14. Conclusión: Es posible inferir que individuos con sospecha de lepra, con qPCR positiva, pueden ser portadores de infección subclínica y potenciales transmisores de *M. leprae* a individuos más susceptibles.

**Palabras clave:** Lepra; qPCR; Diagnóstico precoz.

## 1. Introdução

A hanseníase é uma infecção granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) acometendo primariamente os nervos periféricos. As manifestações clínicas da doença decorrem do padrão de resposta imunológica estabelecida frente à infecção (Scollard et al., 2006).

Considerando os dados epidemiológicos da hanseníase no Brasil e mais especificamente no Estado de Minas Gerais, sabe-se que apesar da redução do número de casos novos, a transmissão continua ativa pela incidência de casos em menores de 15 anos (Leite et. al, 2019; Minas Gerais, 2020). Dessa forma torna-se relevante a busca de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos para a detecção de uma infecção subclínica.

O emprego de técnicas moleculares por meio da amplificação de DNA para identificação do bacilo em diferentes amostras clínicas, confere a este método um alto potencial para o diagnóstico precoce da hanseníase. Assim, a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) tem sido utilizada como suporte alternativo aos métodos tradicionais de diagnóstico da doença (Kang et al., 2003; Goulart & Goulart, 2008).

O presente estudo teve como objetivo verificar através da qPCR, a presença do *M. leprae* em raspados intradérmicos de indivíduos atendidos no Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES) do município de Governador Valadares, Minas Gerais; bem como, analisar o perfil clínico-epidemiológico dos participantes.

## 2. Metodologia

### 2.1 Desenho do Estudo

Um estudo de caráter transversal, envolveu coleta de dados cadastrais dos indivíduos com suspeição de hanseníase atendidos no CREDEN-PES, entre os anos de 2017 a julho de 2021. Foram utilizados prontuários médicos e notificações do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) dos participantes (Pereira, et. al. 2018).

Foram atendidos 411 participantes pelo médico dermatologista e posteriormente coletadas amostras de raspado intradérmico por profissional treinado, para determinação do índice baciloscópico (IB) (Brasil, 2010), extração e amplificação de DNA do *M. leprae*. Os participantes foram separados em dois grupos: GRUPO 1, denominado “Casos notificados”, composto por indivíduos diagnosticados com a doença e devidamente registrados no SINAN; GRUPO 2, denominado “Indivíduos não notificados”, composto por indivíduos que apresentavam quadro de suspeição diagnóstica para hanseníase (contatos de casos, demanda espontânea, avaliação clínica, encaminhamentos etc.).

Para o ensaio da qPCR as amostras de raspado intradérmico foram preservadas em microtubo tipo eppendorf (1,5ml) estéril, contendo 0,5ml de álcool a 70% e armazenadas a -20°C até o processamento. Após descongelamento e centrifugação a 13.200 RPM por 30 minutos, a extração de DNA do raspado foi realizada utilizando o kit PuriLink – *Thermo Fischer Scientific* seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para melhor rendimento do material, realizou-se 02 (dois) processos com 60 µL de solução de eluição no mesmo microtubo. A concentração de DNA no material eluído foi estimada por meio do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Amostras que apresentaram quantidade de DNA baixa foram concentradas utilizando um concentrador à vácuo por 35 minutos a 40°C. Após a dosagem, o DNA extraído foi congelado a -20°C. O ensaio de qPCR foi realizado utilizando o sistema de amplificação TaqMan® qPCR, tendo como alvo a região gênica RLEP do *M. leprae* de 449pb. As sequências dos iniciadores (*Primers*) e das sondas utilizadas foram descritas por Martinez et. al. (2009) e estão apresentadas na Tabela 1:

**Tabela 1** - Sequência dos primers e sonda utilizados na qPCR.

Gene	Descrição	Primer / Sonda	Sequência 5'---3'
RLEP	RLEP (Elemento repetitivo)	Forward	GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A
		Reverse	CGC TAG AAG GTT GCC GTA T
		Sonda	CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA

Fonte: Adaptado de Martinez et. al. (2009).

As reações foram otimizadas para um volume final de 20 µl, contendo 12,5µl de Master Mix (Luna® Universal Probe qPCR Master Mix, concentração 2x), 0,5µl a 25mM de cada par de iniciadores e 6µl do DNA alvo na concentração de 20ng/µl.

A ciclagem seguiu às seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos compreendendo cada ciclo a seguinte sequência: 95°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos e finalizando com uma extensão de 72°C por 10 minutos.

O resultado da qPCR foi dado pelo número de ciclos – *cycle threshold* (Ct) em que a curva de fluorescência acumulada ultrapassou a linha de corte detectada pelo aparelho. Foram considerados valores positivos aqueles em que os Ct's apresentaram valores menores que 37. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF - CAAE 56863016.6.1001.5147 CEP/UFJF.

### 2.2 Análise de Dados

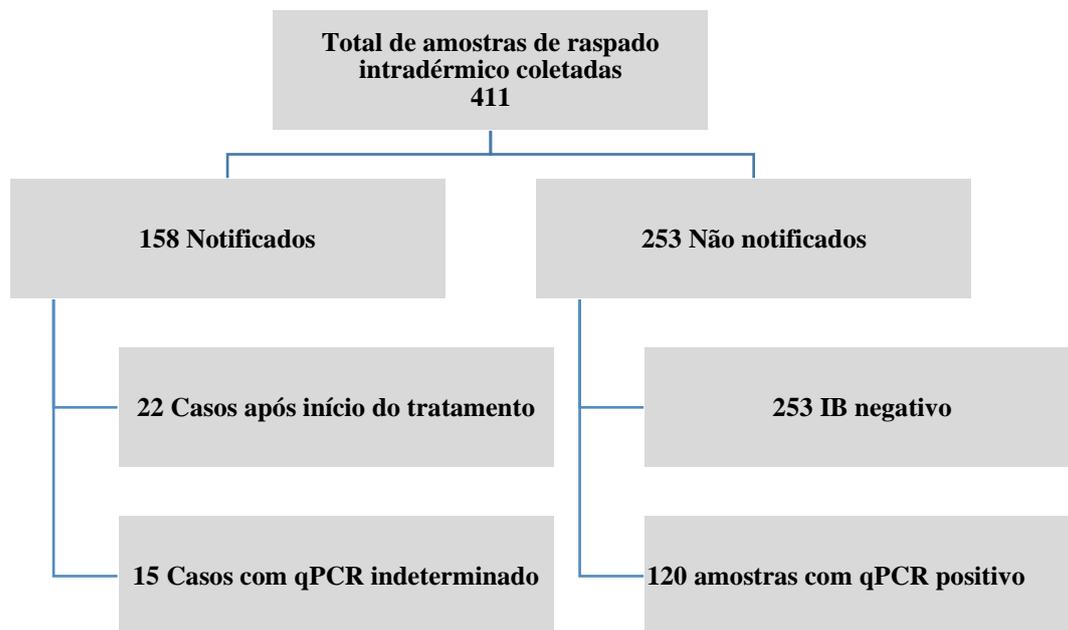
As informações clínicas, sociodemográficas e laboratoriais foram organizadas em uma planilha Microsoft Excel e

analisadas no Software Epi Info™ e apresentadas em frequências absolutas e relativas. Afim de avaliar quantitativamente essas variáveis em relação à positividade para a qPCR, foi empregado o teste qui-quadrado ( $X^2$ ), sendo adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

Do total de 411 amostras de raspado intradérmico coletadas, 158 amostras foram obtidas de indivíduos considerados casos notificados e 253 de indivíduos considerados não notificados ou suspeitos. As amostras foram analisadas conforme Figura 1.

**Figura 1** - Fluxograma de análise das amostras.



Fonte: Autores (2022).

A Tabela 2 apresenta a caracterização dos participantes do estudo considerando as seguintes variáveis: sexo, grupo etário, exame de baciloscopia e qPCR. Verificou-se que do total de casos notificados, 58,86% eram do sexo masculino e 41,14% do sexo feminino. Entre os indivíduos não notificados (253) verificou-se que 53,36% eram do sexo masculino e 46,64% do sexo feminino. Considerando a faixa etária, observou-se maior número de casos e de não notificados com idade entre 40 e 69 anos.

É importante observar que entre os casos apenas 34,18% apresentaram baciloscopia positiva. Como esperado, todos os indivíduos não notificados apresentaram baciloscopia negativa, com significância de  $p < 0,0001$ . Os resultados da qPCR mostraram que 82,28% dos casos notificados apresentaram qPCR positivo. Interessantemente, 47,43% dos indivíduos não notificados apresentaram resultado positivo para qPCR com significância de  $p < 0,0001$ . Vale ressaltar que a análise de razão de chance (*odds ratio*) mostrou que a probabilidade de adoecimento desses indivíduos não notificados com qPCR positivo foi de 5,14. Vale observar que 130 indivíduos classificados como casos apresentaram qPCR positivo, interessadamente entre os suspeitos (não notificados), 120 foram positivos para o teste da qPCR, conforme dados da Tabela 2.

**Tabela 2** - Frequência das variáveis sexo, faixa etária, baciloscopia e qPCR entre os indivíduos notificados e suspeitos de hanseníase.

		Indivíduos Notificados		Suspeitos		<i>p-value</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Sexo	<b>Masculino</b>	<b>93</b>	<b>58.86</b>	<b>135</b>	<b>53.36</b>	0.275
	<b>Feminino</b>	<b>65</b>	<b>41.14</b>	<b>118</b>	<b>46.64</b>	
Grupo etário*	0-14	10	6.33	4	1.75	0.2138
	15-19	7	4.43	9	3.93	
	20-29	11	6.96	12	5.24	
	30-39	19	12.03	30	13.1	
	<b>40-49</b>	<b>28</b>	<b>17.72</b>	<b>39</b>	<b>17.03</b>	
	<b>50-59</b>	<b>26</b>	<b>16.46</b>	<b>56</b>	<b>24.45</b>	
	<b>60-69</b>	<b>31</b>	<b>19.62</b>	<b>52</b>	<b>22.71</b>	
	70-79	19	12.03	20	8.73	
>80	7	4.43	7	3.06		
Baciloscopia	Positiva	54	34.18	0	0	<0.0001
	<b>Negativa</b>	<b>104</b>	<b>65.82</b>	<b>253</b>	<b>100</b>	
Amplificação no qPCR	<b>Positivos</b>	<b>130</b>	<b>82.28</b>	120	47.43	<0.0001
	<b>Negativos</b>	<b>28</b>	<b>17.72</b>	<b>133</b>	<b>52.57</b>	

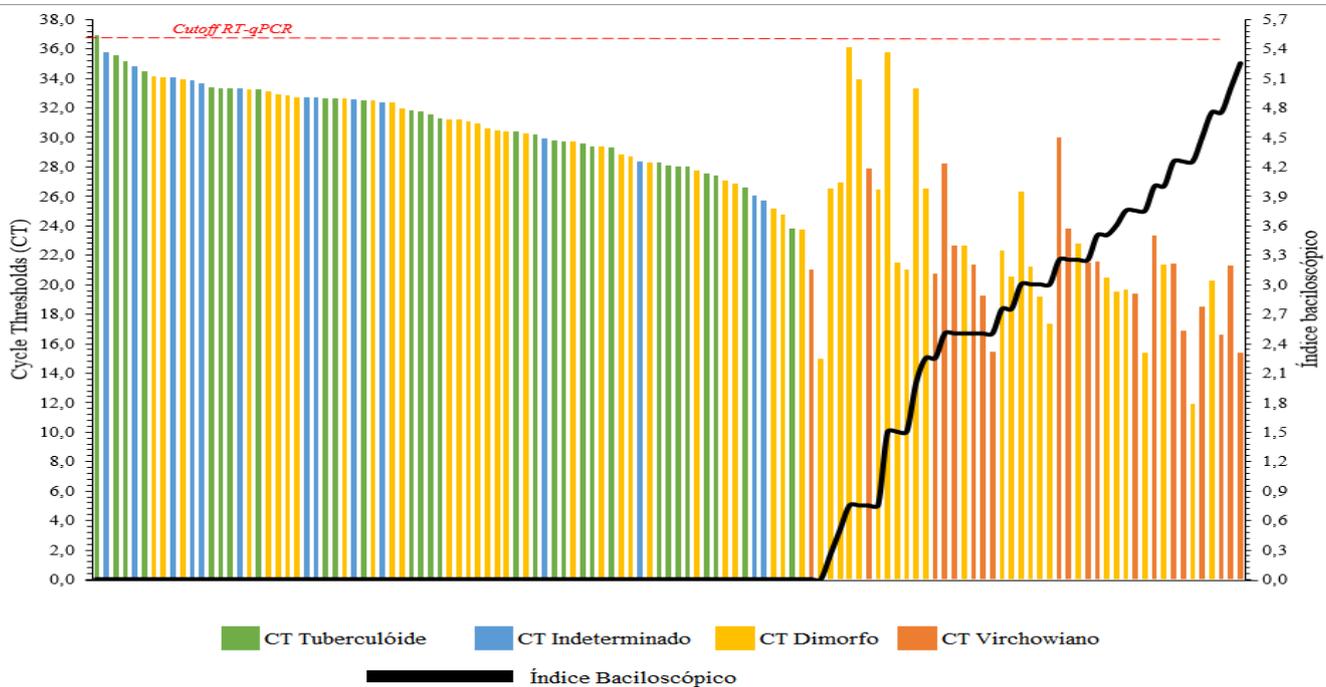
\*\*No grupo dos indivíduos não notificados (suspeitos), 24 não possuem informação sobre idade. Fonte: Autores (2022).

A Figura 2, apresenta a análise entre os parâmetros *Ct* da qPCR, baciloscopia e forma clínica da hanseníase. Para a construção desse gráfico, foram utilizados os dados de 121 amostras de indivíduos considerados casos notificados, que não haviam iniciado tratamento no momento da coleta e que apresentaram resultado positivo no ensaio da qPCR.

Os resultados mostraram que 100% das 56 amostras provenientes de casos das formas clínicas tuberculóide e indeterminada apresentaram IB negativo, enquanto que 82,14% dessas amostras tiveram resultados positivos para qPCR. Entre os indivíduos classificados como Virchowianos, 95% das amostras apresentaram os testes duplamente positivos, ou seja, para IB e qPCR. Observou-se que entre os 60 casos classificados como dimorfos, 91,67% apresentaram qPCR positiva contrastando com apenas 43,33% desses indivíduos com resultado de IB positivo.

É importante notar que embora 01 caso classificado como forma clínica dimorfa tenha apresentado resultado de baciloscopia negativo, o valor de *Ct* foi igual a 16 para o teste da qPCR, conforme a Figura 2.

**Figura 2** - Análise dos parâmetros: Ct na qPCR, índice baciloscópico e forma clínica em indivíduos notificados com hanseníase.



Fonte: Autores (2022).

#### 4. Discussão

O diagnóstico precoce da hanseníase é uma estratégia importante para interromper a cadeia de transmissão do *M. leprae* e prevenir a incapacidade física, considerada uma consequência grave do diagnóstico tardio.

Na hanseníase, o diagnóstico ainda é essencialmente clínico, e em muitos casos os sintomas são sutis e, às vezes passam despercebidos mesmo por especialistas. Os exames de baciloscopia e histopatologia, são utilizados como auxílio do diagnóstico clínico e são úteis na categorização espectral e no tratamento da doença (Worobec, 2012; Brasil, 2021).

Em regiões onde a endemicidade é maior, métodos sorológicos e moleculares podem ser empregados, principalmente em contatos domiciliares de pacientes no intuito de identificar indivíduos com possibilidade de adoecimento (Martinez et. al., 2006; Duthie et. al., 2007; Banerjee et. al., 2010; Caleffi et. al., 2012; Cabral et. al., 2013; Amorim et. al., 2016; Frade et. al., 2017).

Em nosso estudo, dentre os casos de hanseníase, homens pardos com idade de 40 a 69 anos com baixa escolaridade, classificados como Multibacilares (MB), foram os mais frequentes. Nossos resultados corroboram com os dados do Ministério da Saúde em que indivíduos pardos e do sexo masculino prevaleceram entre os casos de hanseníase diagnosticados entre os anos de 2015 a 2019 e que a faixa etária de 40 a 79 anos concentrou maior número de casos no ano de 2019 (Brasil, 2021). Ribeiro et. al., (2019), avaliaram a prevalência e distribuição do *M. leprae* em um município de média endemicidade em Minas Gerais e constataram que todos os casos eram adultos ou idosos.

Os dados da Tabela 2, mostraram que 120 indivíduos do grupo não notificados (47,43%), apresentaram qPCR positivo para o gene RLEP do *M. leprae*. Dessa forma torna-se relevante realizar avaliações periódicas desses participantes por meio de um estudo de acompanhamento. Considerando o alto risco de adoecimento calculado no presente estudo de (5,14 OD), torna-se essencial investigar possíveis casos de hanseníase no meio familiar e buscar formas de controle da transmissão da doença no ambiente domiciliar.

Sabe-se que o risco de adoecimento em contatos domiciliares é elevado. Segundo Sales et.al. (2016), esse risco foi quase 10 (dez) vezes maior em contatos domiciliares de indivíduos com alguma incapacidade relacionada a hanseníase (Bakker, et. al., 2006). E ainda mais, de acordo com Reis et. al. (2014) os contatos que apresentaram DNA do *M. leprae* na mucosa nasal elevou ainda mais o risco de adoecer e Araújo et. al. (2016) verificaram que, o risco atingia valores maiores chegando a 14 vezes quando DNA era identificado na corrente sanguínea.

De acordo com Niitsuma et. al. (2021), o adoecimento por hanseníase em contatos está relacionado com questões sociais, susceptibilidade individual bem como pelas dificuldades ao acesso às ações de controle da doença.

No presente estudo, identificou-se maior número de casos MB, com predominância da forma clínica dimorfa. Sabe-se que o diagnóstico e a classificação dos casos dimorfos são dificultados, uma vez que a baciloscopia desses indivíduos pode ser positiva ou negativa. Dessa forma, é possível que alguns casos passem despercebidos pelo serviço de saúde, tornando necessário maior investimento na capacitação das equipes, bem como na implementação de técnicas mais sensíveis e específicas para diagnóstico, como por exemplo a qPCR.

Em concordância com os dados encontrados neste estudo, tem sido relatada maior prevalência da forma clínica dimorfa, especialmente em indivíduos idosos (Pêgo et. al., 2020, Rocha, Nobre & Garcia, 2020).

É importante ainda ressaltar que foram encontradas 120 amostras de raspado dérmico com IB zero que apresentaram resultado positivo para qPCR, destacando a necessidade de implementação dessa técnica para melhorar o diagnóstico e o monitoramento de casos e contatos de hanseníase. Esta conduta seria bastante relevante entre os casos que apresentassem a forma clínica dimorfa, com resultado de IB negativo.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa avaliaram o desempenho da qPCR comparando com a baciloscopia, em casos classificados como PB e MB (Gama et. al., 2019). Os autores observaram que 25% dos pacientes PB apresentaram DNA de *M. leprae* tanto em amostra de sangue como de raspado dérmico, enquanto que no grupo MB, a qPCR foi positiva para 69,6% dos pacientes e baciloscopia positiva em 56,5%. Estes autores observaram que 48,8% de todas as amostras investigadas foram positivas para DNA do *M. leprae* contrastando com apenas 30,2% de resultados positivos para a baciloscopia, ressaltando a superioridade do método molecular para o diagnóstico. Notavelmente, destaca-se o kit NAT hanseníase como primeiro teste molecular comercial desenvolvido no Brasil e o segundo teste diagnóstico autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Fiocruz, 2021).

Da mesma forma, nossos resultados mostraram uma elevada porcentagem de qPCR positiva (91.67%) entre os pacientes da forma clínica dimorfa comparando com o IB que foi positivo em apenas 43,3% dos indivíduos, reforçando, a importância da utilização de métodos moleculares para auxílio no diagnóstico da hanseníase.

## 5. Conclusão

Os resultados desse trabalho levam a inferir, que os indivíduos com suspeição de hanseníase, que apresentaram o teste qPCR positivo, podem ser portadores de infecção subclínica, sendo potenciais transmissores do *M. leprae* para indivíduos mais susceptíveis.

Acredita-se que esses dados possam contribuir para potencializar o diagnóstico precoce e assim auxiliar no controle da hanseníase no município de Governador Valadares e entorno, onde essa endemia permanece ainda como problema de saúde pública.

Sugere-se o delineamento de novos estudos que busquem acompanhar esses indivíduos com suspeição diagnóstica e seus contatos, com objetivo de avaliar a taxa de adoecimento bem como a possibilidade de transmissão da doença.

## Agradecimentos

Agradecemos à equipe do CREDEN-PES em Governador Valadares pela parceria, especialmente ao Dr. Alexandre Castelo Branco pelo diagnóstico dos participantes e Regina L. B. Cipriano pelo apoio administrativo.

Somos gratos ao Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru – SP, pela infraestrutura cedida no decorrer desse trabalho.

Apoio financeiro: FAPEMIG, CNPq, Emory University/Atlanta/USA.

## Referências

- Amorim, F. M., Nobre, M. L., Ferreira, L. C., Nascimento, L. S., Miranda, A. M., Monteiro, G. R. G., Dupnik, K. M., Duthie, M. S., Reed, S. G., & Jeronimo, S. M. B. (2016). Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(9), e0004934. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004934>.
- Araujo, S., Freitas, L. O., Goulart, L. R., & Goulart, I. M. B. (2016). Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(11), 1412–1420. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>.
- Bakker, M. I., Hatta, M., Kwenang, A., Van Mosseveld, P., Faber, W. R., Klatser, P. R., & Oskam, L. (2006). Risk factors for developing leprosy—a population-based cohort study in Indonesia. *Leprosy Review*, 77(1), 48–61. <https://doi.org/10.47276/lr.77.1.48>.
- Banerjee, S., Sarkar, K., Gupta, S., Mahapatra, P. S., Gupta, S., Guha, S., Bandhopadhyay, D., Ghosal, C., Paine, S. K., Dutta, R. N., Biswas, N., & Bhattacharya, B. (2010). Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts—a pilot study from India. *BMC Infectious Diseases*, 10(1), 252. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-252>.
- Brasil. (2010). *Guia de procedimentos técnicos Baciloscopia em Hanseníase*; Brasília: Ministério da Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.
- Brasil, (2021). Ministério da Saúde. *NOTA TÉCNICA Nº 16/2021-CGDE/DCCI/SVS/MS*. Recuperado 20 de fevereiro de 2023, de [https://www.conass.org.br/wp-content/uploads/2021/07/SEI\\_MS-0020845770-Nota-Te%CC%81cnica-16.pdf](https://www.conass.org.br/wp-content/uploads/2021/07/SEI_MS-0020845770-Nota-Te%CC%81cnica-16.pdf)
- Cabral, P. B. e., Júnior, J. E. C., Macedo, A. C. de, Alves, A. R., Gonçalves, T. B., Cabral, T. C. B. e., Gondim, A. P. S., Pinto, M. I. M., Oseki, K. T., Camara, L. M. C., Rabenhorst, S. H. B., & Nagao-Dias, A. T. (2013). Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 17(11), e1005–e1010. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.011>.
- Caleffi, K. R., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H., Caleffi, E. R., Siqueira, V. L. D., & Cardoso, R. F. (2012). Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium leprae* in urine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(2), 153–157. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500011>.
- Duthie, M. S., Goto, W., Ireton, G. C., Reece, S. T., Cardoso, L. P. V., Martelli, C. M. T., Stefani, M. M. A., Nakatani, M., de Jesus, R. C., Netto, E. M., Balagon, M. V. F., Tan, E., Gelber, R. H., Maeda, Y., Makino, M., Hofst, D., & Reed, S. G. (2007). Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 14(11), 1400–1408. <https://doi.org/10.1128/cvi.00299-07>.
- Frade, M. A. C., de Paula, N. A., Gomes, C. M., Vernal, S., Bernardes Filho, F., Lugão, H. B., de Abreu, M. M. M., Botini, P., Duthie, M. S., Spencer, J. S., Soares, R. C. F. R., & Foss, N. T. (2017). Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), e0005375. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005375>.
- Fiocruz. (2021). *Fiocruz cria teste molecular para hanseníase inédito no Brasil*. Recuperado 20 de fevereiro de 2023, de <https://www.unasus.gov.br/noticia/fiocruz-cria-teste-molecular-para-hanseníase-inedito-no-brasil>.
- Gama, R. S., Souza, M. L. M. de, Sarno, E. N., Moraes, M. O. de, Gonçalves, A., Stefani, M. M. A., Garcia, R. M. G., & Fraga, L. A. de O. (2019). A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007400. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007400>.
- Goulart, I. M. B., & Goulart, L. R. (2008). Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Archives of Dermatological Research*, 300(6), 269–290. <https://doi.org/10.1007/s00403-008-0857-y>
- Kang, T.-J., Kim, S.-K., Lee, S.-B., Chae, G.-T., & Kim, J.-P. (2003). Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*: PCR for diagnosis of *M. leprae*. *Clinical and Experimental Dermatology*, 28(4), 420–424. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01300.x>.
- Leite, M. L. C., Miranda, M. C. R., Pugedo, A. C., Grossi, M. A. F., Ramalho, K. C., & Costa, J. V. (2009). *Situação Epidemiológica da Hanseníase Minas Gerais – Municípios Silenciosos – 2009-2018; 10º Simpósio Brasileiro de Hansenologia*.
- Martinez, A. N., Britto, C. F. P. C., Nery, J. A. C., Sampaio, E. P., Jardim, M. R., Sarno, E. N., & Moraes, M. O. (2006). Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3154–3159. <https://doi.org/10.1128/jcm.02250-05>.
- Martinez, A. N., Lahiri, R., Pittman, T. L., Scollard, D., Truman, R., Moraes, M. O., & Williams, D. L. (2009). Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2124–2130. <https://doi.org/10.1128/jcm.00512-09>.
- Minas Gerais (2020). *Plano Estadual de Saúde 2020-2023*; Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Saúde De Minas Gerais. Recuperado 20 de fevereiro de 2023, de [https://www.saude.mg.gov.br/images/1\\_noticias/09\\_2021/01\\_jan-fev-marc/08-02-Plano-Estadual-de-Saude%20-de-Minas-Gerais%20%202020-2023.pdf](https://www.saude.mg.gov.br/images/1_noticias/09_2021/01_jan-fev-marc/08-02-Plano-Estadual-de-Saude%20-de-Minas-Gerais%20%202020-2023.pdf).

Niitsuma, E. N. A., Bueno, I. de C., Arantes, E. O., Carvalho, A. P. M., Xavier Junior, G. F., Fernandes, G. da R., & Lana, F. C. F. (2021). Fatores associados ao adoecimento por hanseníase em contatos: revisão sistemática e metanálise. *Revista brasileira de epidemiologia [Brazilian journal of epidemiology]*, 24. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210039>.

Pêgoa, F., Procópioj, P. M., & Condév, A. S. ([s.d.]). Hanseníase: correlação entre o número de lesões hansênicas, nervos afetados e o diagnóstico precoce no estado de Minas Gerais. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v, 12(9).

Pereira A. S. *et. al.* (2018). Metodologia da pesquisa científica. UFSM. [https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/358/2019/02/Metodologia-da-Pesquisa-Cientifica\\_final.pdf](https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/358/2019/02/Metodologia-da-Pesquisa-Cientifica_final.pdf).

Reis, E. M., Araujo, S., Lobato, J., Neves, A. F., Costa, A. V., Gonçalves, M. A., Goulart, L. R., & Goulart, I. M. B. (2014). Mycobacterium leprae DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(5), 447–452. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12349>

Ribeiro, G. de C., Barreto, J. G., Bueno, I. de C., Vasconcelos, B. F., & Lana, F. C. F. (2019). Prevalence and spatial distribution of Mycobacterium leprae infection in a medium endemicity municipality. *Rev Rene*, 20, e39497. <https://doi.org/10.15253/2175-6783.20192039497>

Rocha, M. C. N., Nobre, M. L., & Garcia, L. P. (2020). Características epidemiológicas da hanseníase nos idosos e comparação com outros grupos etários, Brasil (2016-2018). *Cadernos de saude publica*, 36(9). <https://doi.org/10.1590/0102/311x00048019>

Sales, A. M., Ponce de Leon, A., Düppre, N. C., Hacker, M. A., Nery, J. A. C., Sarno, E. N., & Penna, M. L. F. (2011). Leprosy among patient contacts: A multilevel study of risk factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), e1013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001013>

Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 338–381. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.2.338-381.2006>

Worobec, S. (2012). Current approaches and future directions in the treatment of leprosy. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 79. <https://doi.org/10.2147/rrtm.s27395>