

Hanseníase na comunidade da Rocinha: diagnóstico precoce de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal local para aumentar a eficiência das estratégias de controle da doença

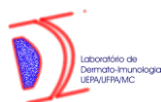
Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
Laboratório de Dermato-Imunologia Universidade Federal do Pará e
Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária 'Dr.
Marcello Candia'
Presidente da Sociedade Brasileira de Hansenologia

Palavras-chave

Hanseníase; epidemiologia; controle; treinamento; anti-PGL-I, PCR

Plano de trabalho operacional e
treinamento de pessoal em hanseníase

Apresentado a Secretaria de Saúde do município do Rio de Janeiro



maio

2019

1. Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo bacilo intra-celular obrigatório, álcool-ácido resistente *Mycobacterium leprae*. A doença se manifesta pela presença de manchas hipocrômicas ou eritematosas, isoladas ou disseminadas pelo tegumento, com uma característica peculiar, a alteração de sensibilidade (dormência) no local da lesão, identificada pela hipoestesia ou anestesia do local afetado (1).

O período de incubação da hanseníase é bastante variado e costuma ser definido entre 2 a 5 anos, mas trabalhos recentes demonstram que este período pode ser bem maior, chegando a décadas (2). A sua transmissão ocorre pelas vias aéreas superiores, e as pessoas que convivem com o doente, denominados contatos ou comunicantes, possuem até 8 vezes mais chances de desenvolver a hanseníase (3).

O diagnóstico é eminentemente clínico, e há poucos exames complementares que auxiliem no diagnóstico. O principal deles é a baciloscopia do raspado dérmico, que é positiva na maioria dos casos multibacilares. No entanto, a baciloscopia necessita ser coletada em 5 sítios diferentes na pele, e é difícil de ser realizada em trabalhos de campo. Outro exame é a detecção de anticorpos específicos contra o *M. leprae*, sendo o principal deles o anti-PGL-I, que se correlaciona bem com a baciloscopia e possui a vantagem de ser dosado no plasma, precisando apenas de uma coleta de sangue periférico (4).

Um dos pilares do controle da hanseníase é o exame dos contatos, que faz parte da estratégia de controle da doença tanto pelo Ministério da Saúde do Brasil como pela Organização Mundial da Saúde (5). O Brasil registra, oficialmente, mais de 80% dos contatos como examinados, no entanto, ao mesmo tempo, apenas 8% de todos os casos diagnosticados

são registrados como diagnosticados durante exames de contatos (dados do ministério da saúde, não publicados). Recentemente, durante treinamento para o projeto BDSF do Ministério da Saúde, visitei duas capitais, Cuiabá no Mato Grosso, e Recife em Pernambuco. Em Cuiabá, durante a semana de treinamento, em 32 contatos examinados, foram detectados 14 casos novos (43,75%), enquanto em Recife, de 54 examinados, 15 (27,7%) foram diagnosticados com hanseníase (dados do relatório BDSF, entregue ao Ministério da Saúde).

Diante dos números apresentados, é evidente que os exames de contatos registrados não estão sendo feitos do modo correto.

Além de examinar os contatos de casos antigos de hanseníase, coletamos o sangue dos indivíduos examinados para avaliar a presença de anticorpos IgM anti-PGL-I, e o raspado dérmico dos lóbulos auriculares para realizar a baciloscopia tradicional, com coloração para BAAR e para fazer o PCR para RLEP, uma sequência gênica do *M. leprae* que se repete várias vezes no genoma, aumentando as chances de amplificação.

Em diferentes municípios do estado do Pará, corroborando o alto índice de prevalência oculta destas populações, a positividade encontrada para o anti-PGL-I IgM foi altíssima ($\approx 45\%$) em comparação com outras regiões do Brasil ($\approx 20\%$), como no Rio de Janeiro, em torno de 15% em Duque de Caxias com o ML-Flow (6). Tivemos a oportunidade de retornar a um dos municípios visitados para uma segunda avaliação, um ano após a dosagem dos anticorpos (7). Selecionamos dois grupos de indivíduos para visitar, o primeiro com altos títulos de anticorpos e o segundo negativo. No primeiro grupo encontramos uma quantidade 3 vezes maior de casos de hanseníase, indicando que a presença de anti-PGL-I é um bom indicador de contato próximo com um caso de hanseníase, que seria então o caso-índice.

Após esta primeira experiência, repetimos a estratégia em vários municípios. No total, já foram 32 municípios visitados, todos com resultados semelhantes. Em outros estados brasileiros, colegas da SBH encontraram resultados semelhantes (8,9).

Durante este período, surgiram marcadores imunológicos, em especial as proteínas recombinantes produzidas pelo IDRI – *Infectious Diseases Research Institute*, dos EUA, um dos parceiros dos nossos atuais trabalhos, que possuem uma correlação excelente com a baciloscopia dos casos clássicos de hanseníase, e que poderiam, portanto, ser utilizados como uma ferramenta diagnóstica em campo, como um teste rápido, tipo *point of care*. Resolvemos aplicar os marcadores em campo e o resultado foi desanimador considerando a finalidade de serem utilizados como testes diagnósticos. Em nossas áreas hiperendêmicas para hanseníase, 40 a 60% da população foi positiva para o teste que, portanto, não pode ser usado para o diagnóstico da hanseníase, mas pode funcionar como um indicador de disseminação dos bacilos nas comunidades estudadas. Além de alguns dos nossos trabalhos já terem deixado isso exposto, estamos em fase de envio do resultado de um mestrado que demonstra que ainda buscamos um teste diagnóstico para a hanseníase.

Nesse sentido, recebemos no nosso laboratório colegas da Universidade de Leiden, da Holanda, que estão com um possível teste rápido em desenvolvimento, UCP-LFA, e temos participado ativamente do desenvolvimento do teste que, apesar de sugerir maior sensibilidade em relação àquele desenvolvido pelo IDRI, também ainda tem dificuldades com os pacientes paucibacilares (10,11), que compõem o grupo de mais difícil diagnóstico atualmente, e que deve ser priorizado cada vez mais para o

diagnóstico precoce se nós quisermos realmente controlar a epidemia no mundo.

Além de chamar a atenção do mundo para a diferença importante entre o número de casos oficialmente registrados e o número de casos realmente observados e diagnosticados quando especialistas vão à campo, seguimos também com experimentos de laboratório que pudessem nos subsidiar com mais informações sobre os doentes e a suas diferentes formas clínicas.

Ao mesmo tempo em que fizemos essas observações de diagnóstico e de laboratório, seguimos analisando a distribuição espacial da hanseníase por meio do Sistema de Informações Geográficas (SIG), identificamos clusters de alta taxa de detecção em uma escala espacial muito fina (setor censitário). Atualmente, usamos essas ferramentas para melhorar nossa eficiência na detecção precoce de novos casos, visando a triagem na maioria das áreas de risco (12,13), como foi feito com a Rocinha.

A ex-colônia de hanseníase localizada em Marituba, inaugurada em 1942, recebeu cerca de 2.000 pacientes que foram institucionalizados e colocados em quarentena nessa área, até o fechamento em 1980, embora alguns antigos ex-pacientes ainda vivam no local e como em outras ex-colônias, a cidade cresceu no entorno, e muitas das famílias de pacientes continuam habitando as proximidades da ex-colônia. Uma das consequências dessa segregação, foi o aumento dos fatores de risco genéticos, resultando em maior suscetibilidade à hanseníase na população (14,15). A análise espacial da distribuição dos casos de hanseníase no município de Marituba, relatada de 2004 a 2016 (953 casos; 806 mapeados), revelou um padrão de agrupamento. O principal aglomerado de casos foi encontrado exatamente na mesma área da antiga colônia de

hanseníase, que permaneceu em quarentena de 1942 a 1980, e que ainda abriga várias das pessoas que foram exiladas por esse período (Figura 1). Atualmente, cerca de 11.000 pessoas vivem neste bairro específico (10% da população total de Marituba e 23,5% de todos os casos de hanseníase registrados de 2004 a 2016), a maioria deles são familiares dos pacientes portadores de hanseníase exilados.

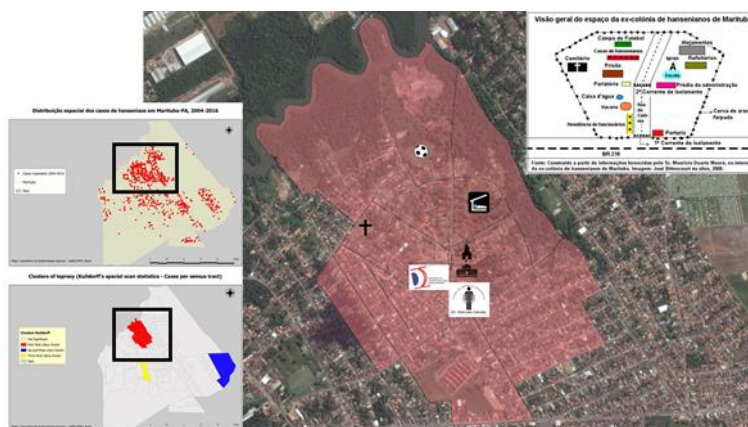


Figura 1 - O principal cluster da hanseníase na cidade de Marituba, casos de 2004 a 2016, se situa exatamente na mesma área da antiga colônia de hanseníase, que permaneceu em quarentena de 1942-1980. Nosso laboratório de pesquisa também foi estabelecido nesta área, em 2001.

De forma similar, realizamos um levantamento preliminar de dados no estado do Rio de Janeiro, e iniciamos o trabalho de mapeamento dos casos notificados entre 2007 e 2017, (Figura 2). Dos 19.914 casos notificados, 5,3% foram em crianças e 33,6% tinham algum tipo de incapacidade física. O grau 2 de incapacidade, que são as deformidades visíveis, foram identificadas em 11,3% dos pacientes diagnosticados, percentual considerado alto pelo Ministério da Saúde.

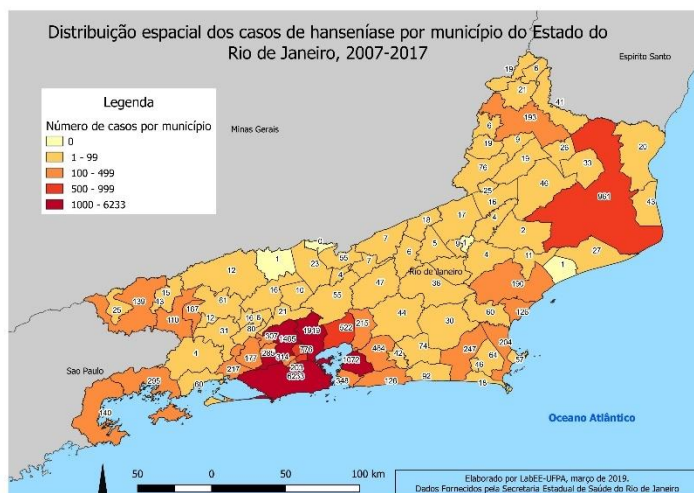


Figura 2 - Resultado preliminar do mapeamento dos casos de hanseníase no estado do Rio de Janeiro. Verifica-se uma concentração maior de casos nas fronteiras norte e sul e na região metropolitana.

Do total de casos diagnosticados no estado do Rio, 6.233 (31,3%) estavam localizados no município do Rio de Janeiro, com a maioria dos casos concentrados na zona oeste (Figura 3). Deste total, 4,8% dos casos foram diagnosticados em crianças, 33,9% tinham algum grau de incapacidade física, e 11,5% apresentaram deformidades visíveis (grau 2 de incapacidade física).

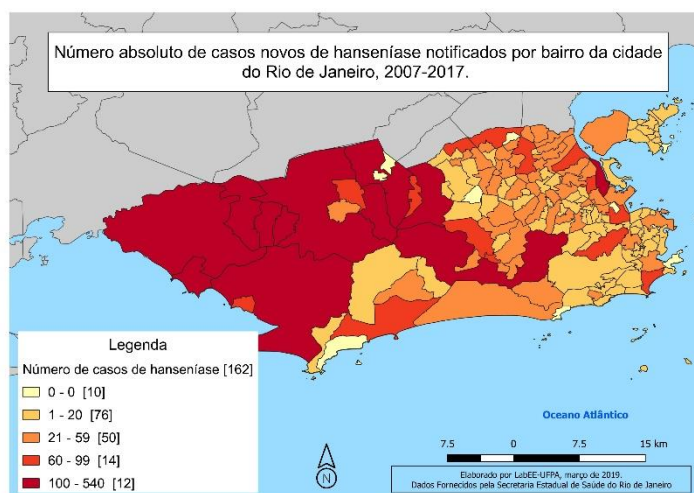


Figura 3 – Mapeamento dos casos do município do Rio de Janeiro demonstram uma maior concentração de casos na zona oeste.

Já na Rocinha, foi possível mapear apenas 44 casos no período de 2007 a 2017. É importante considerar as limitações técnicas para o

mapeamento remoto em função da qualidade do dado e dos desafios urbanísticos do lugar. Mesmo assim, foi possível identificar pelo menos duas áreas de maior concentração de casos, conforme demonstrado na figura 4.



Figura 4 – O mapeamento de 44 casos da Rocinha diagnosticados de 2007 a 2017 demonstram uma distribuição por toda a comunidade, porém, com uma maior concentração de casos em Barcelos e Macega (marcadas em vermelho). É importante ressaltar que a quantidade pequena de casos dificulta a análise espacial.

Vários estudos demonstraram que o contato com uma pessoa com hanseníase sem tratamento está associado com um aumento significativo para desenvolver hanseníase, sendo que o contato que vive em maior proximidade com o caso apresenta um risco maior (16,17). Embora o exato mecanismo de transmissão do *M. leprae* ainda não esteja bem esclarecido, se acredita que a maior possibilidade de transmissão é pelas vias aéreas (18), como acontece com a tuberculose. Pacientes com alta carga bacilar liberam bilhões de bacilos diariamente pelas vias respiratórias, podendo infectar os contatos. Se o bacilo consegue entrar e se multiplicar no interior dos macrófagos da mucosa nasal, o *M. leprae* é transportado através do sangue ou dos vasos linfáticos se disseminando em locais preferidos como a pele e os nervos periféricos, onde o bacilo tem como alvo preferido a célula de Schwann. A detecção do *M. leprae* em doadores de sangue saudáveis corroboram esta rota de migração transitória, que pode levar a

infecção pela transfusão de sangue (19,20). Alguns estudos detectaram a presença do DNA do *M. leprae* na cavidade nasal de pacientes e contatos, usando PCR (21,22), e o PCR tem se mostrado uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de casos difíceis, como hanseníase primariamente neural, formas paucibacilares oligossintomáticas, e pacientes com apresentações clínicas atípicas, porém, com histopatologia característica de hanseníase (23).

Em um estudo mais recente, utilizando técnicas mais sensíveis, como PCR em tempo real (qPCR), 54% dos contatos saudáveis (56/104) apresentaram qPCR+ na biópsia da concha nasal, enquanto quase 7% foram qPCR+ no sangue, e 6,7% (7/104) evoluíram para hanseníase doença em 7 anos de acompanhamento (18).

A positividade do PCR para o DNA do *M. leprae*, seja no sangue, na lesão da pele, na biópsia da concha nasal ou no raspado dérmico do lóbulo auricular, e a positividade do anti-PGL-I são fatores de risco independentes para hanseníase, e alguns estudos demonstraram que a positividade para ambos os marcadores coloca o indivíduo em um risco ainda maior de desenvolver a doença (18–20). Para o qPCR nós temos utilizado a sequência repetitiva de RLEP porque o genoma do bacilo possui 37 cópias, o que resulta em uma possibilidade de amplificação muito mais robusta em comparação a genes que possuem apenas uma cópia (24).

Uma vez que um caso índice é detectado em uma casa visitada, nossa estratégia é obter o raspado dérmico do lóbulo auricular e uma amostra de sangue de cada contato daquele paciente, para podermos determinar a situação do qPCR para o RLEP, bem com a titulação do anti-PGL-I.

Considerando os dados descritos acima, propomos este plano de trabalho para ser realizado em 5 dias, quando espera-se o diagnóstico de, pelo menos, 10 casos novos entre, pelo menos, 60 contatos de casos antigos de hanseníase, que serão visitados pelos agentes comunitários de saúde, e convocados a comparecer nas diferentes estruturas de saúde da Rocinha durante os dias de treinamento, ou serão visitados em suas residências pela equipe no último dia, 7 de junho.

2. Hipóteses

- a. A comunidade da Rocinha apresenta um alto número de casos não detectados, mais que 10% dos contatos intradomiciliares de hanseníase notificados entre 2007 e 2017 apresentam hanseníase detectável pelo exame clínico.
- b. A média de exame dos contatos é menor que a média oficial encontrada no Brasil, que é de mais de 80% dos contatos examinados.
- c. O treinamento dos profissionais de saúde nesta metodologia pode manter a detecção de casos novos em elevação pelos próximos 5 anos.

3. Objetivos

a. Geral:

Diagnosticar casos novos de hanseníase entre contatos de casos notificados na Rocinha, juntamente com o treinamento de pessoal local para aumentar a eficiência das estratégias de controle da doença na comunidade.

b. Específicos:

- i. Diagnosticar e encaminhar para tratamento os casos novos de hanseníase atendidos durante a semana de treinamento em serviço.
- ii. Realizar o treinamento em serviço (manhã e tarde) de pelo menos 30 profissionais de saúde das diferentes categorias, em especial médicos e enfermeiras, durante a semana de treinamento em serviço.

- iii. Coletar plasma sanguíneo de todos os pacientes e comunicantes examinados para a realização de sorologia anti-PGL-I, e raspado dérmico dos lóbulos auriculares para a realização de qPCR do genoma bacteriano, com base na amplificação do RLEP.
- iv. Realizar treinamento em serviço de coleta de raspado dérmico para baciloscopia, e das técnicas de coloração e leitura da baciloscopia.

4. Metas

- a. Apresentar para os profissionais de saúde da Rocinha, com ênfase nos médicos e enfermeiras divididos em duas turmas (manhã e tarde), nos dois períodos do primeiro dia de treinamento, aula teórica sobre todos os aspectos da hanseníase.
- b. Realizar treinamento em serviço para, pelo menos, 30 profissionais de saúde da Rocinha, com o exame de aproximadamente 60 contatos dos 44 casos diagnosticados na comunidade no período de 2007 a 2017.
- c. Treinar os técnicos de laboratório que atendem à Rocinha para a coleta e coloração de BAAR no raspado dérmico.

5. Metodologia

- a. Casuística

Serão avaliados aproximadamente 60 contatos de pacientes de hanseníase, conforme definido no item “4. Metas”, acima. Será realizada a coleta de sangue de todos estes indivíduos para a

dosagem de anti-PGL-I no plasma, e raspado do lóbulo auricular para a realização do PCR para RLEP. Os pacientes que forem diagnosticados durante esta semana deverão iniciar o tratamento imediatamente, logo após o diagnóstico e a notificação.

b. Coleta das amostras biológicas

Os indivíduos avaliados serão diagnosticados clinicamente de acordo com o espectro da hanseníase proposto por Ridley e Jopling. Além disso será coletado sangue para realização de sorologia anti-PGL-I de todos os sujeitos avaliados, e coleta de raspado dérmico para exame baciloscópico, sempre que possível. Na mesma ocasião, já será coletado também material para o PCR do raspado dérmico. Questionários eletrônicos já produzidos pela nossa equipe serão aplicados a fim de se conhecer e avaliar hábitos e costumes dos pacientes e de seus familiares, caracterizando principalmente aspectos sociais e ambientais. As fichas eletrônicas serão catalogadas e os dados avaliados por técnicas de inteligência artificial.

c. Busca ativa de contatos

Com base na análise realizada pela epidemiologia espacial, serão realizadas visitas domiciliares no último dia do treinamento. Os pacientes e contatos deverão ser avisados da visita, com a solicitação de que aguardem a chegada da equipe em horário previamente definido.

d. Georreferenciamento

Serão registradas as coordenadas geográficas, longitude e latitude, das residências dos indivíduos incluídos no estudo, utilizando-se um equipamento de GPS portátil (Garmin® eTrex Legend). As coordenadas serão inseridas no software Quantum GIS (<http://www.qgis.org/>) com a finalidade de elaboração dos mapas de distribuição espacial da hanseníase, bem como análise da distribuição das características clínicas, epidemiológicas, ambientais e socioeconômicas avaliadas.

e. Disseminação da informação na comunidade

Será realizada a campanha #todoscontraahanseníase, com a distribuição de 10.000 cartilhas na comunidade, e apoio do pessoal local. Apesar do treinamento estar focado no exame dos contatos de pacientes antigos, algumas das pessoas que se identificarem com os sinais e sintomas apresentados poderão ser encaminhadas pelos agentes comunitários de saúde para exame durante o treinamento.

6. Prazo de execução

O prazo para execução do projeto é de 5 dias, sendo 1 dia de apresentação teórica e 4 dias de treinamento prático em serviço, inicialmente nas unidades de saúde da Rocinha e, no último dia, em visitas domiciliares às famílias de pacientes diagnosticados e previamente agendados.

7. Cronograma de atividades

DIA	PERÍODO	EQUIPE
Semanas anteriores à visita	Manhã e Tarde	Reuniões com o pessoal local da Secretaria de Saúde do Município e com os agentes comunitários de saúde. Preparação logística e documental.
Segunda-feira	Manhã	Teoria
	Tarde	Teoria
Terça-feira	Manhã	Treinamento em serviço
	Tarde	Treinamento em serviço
Quarta-feira	Manhã	Treinamento em serviço
	Tarde	Treinamento em serviço
Quinta-feira	Manhã	Treinamento em serviço
	Tarde	Treinamento em serviço
Sexta-feira	Manhã	Visita domiciliar
	Tarde	Visita domiciliar
Semanas posteriores à visita	Manhã e Tarde	Análise dos dados e procedimentos laboratoriais.

8. Disponibilidade de Infra-estrutura básica e apoio técnico para o desenvolvimento do projeto

Os exames sorológicos e moleculares aqui descritos serão realizados no Laboratório de Dermato-Imunologia, em Marituba (Pará), que possui infraestrutura necessária para a realização dos exames.

Os exames de raspado da derme para pesquisa de BAAR serão realizados pelos técnicos da nossa equipe, em um local apropriado, disponibilizado pela Secretaria de Saúde do Município durante a semana, com a participação dos técnicos que realizam o exame, para o treinamento em serviço.

Diariamente, todo o material biológico coletado será processado e armazenado. Para realizar todos os procedimentos aqui propostos e armazenar o material coletado, será necessário o município disponibilizar um espaço em laboratório com estrutura mínima de análises clínicas.

9. Equipe

NOME	INSTITUIÇÃO	FUNÇÕES
Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado	Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/Marcello Candia Instituto de Ciências Biológicas, UFPA	Coord. Geral, Gerência Clínica, treinamento clínico em serviço Presidente SBH
Dra. Laila de Laguiche	Instituto Alliance Against Leprosy (AAL) Sociedade Brasileira de Hansenologia	Fundadora e diretora geral do AAL Treinamento clínico em serviço
Dr. Sérgio Paulo Aguilera Machado	Sociedade Brasileira de Hansenologia	Treinamento clínico em serviço
Profa. Dra. Patricia Fagundes da Costa	Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/Marcello Candia Instituto de Ciências Biológicas, UFPA	Inserção de dados no tablet, coleta de material biológico e treinamento laboratorial
Prof. MSc. Sâmela Miranda da Silva	Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/Marcello Candia Instituto de Ciências Biológicas, UFPA	Treinamento de prevenção de incapacidades
Biomédica Erika Oliveira Jorge	Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/Marcello Candia	Coleta de material biológico e treinamento laboratorial
Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto	Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/Marcello Candia Laboratório de Epidemiologia Espacial – UFPA/Castanhal.	Epidemiologia Espacial
Blanche Amâncio	Jornalista Texto e Companhia Comunicação Assessora de imprensa da SBH	Divulgação do evento Comunicação com parceiros locais

10.Referências Bibliográficas

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. 2006;19(2):338–81.
2. Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Miyamura T, Ishii N. Chimpanzees used for medical research shed light on the pathoetiology of leprosy. *Future Microbiol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2017 Sep 11];6(10):1151–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004034>
3. Vijayakumaran P, Jesudasan K, Mozhi NM, Samuel JD. Does MDT arrest transmission of leprosy to household contacts? *Int J Lepr Other Mycobact Dis* [Internet]. 1998 Jun [cited 2017 Sep 11];66(2):125–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728444>
4. Geluk A, Klein R, Franken KLMC, Meijgaarden KE Van, Wieles B, Pereira KC, et al. Postgenomic Approach To Identify Novel Mycobacterium leprae Antigens with Potential To Improve Immunodiagnosis of Infection. 2005;73(9):5636–44.
5. Bazan-Furini R, Motta ACF, Simão JCL, Tarquínio DC, Marques W, Barbosa MHN, et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(5):536–40.
6. Calado KLS, Da Gloria Vieira A, Durães S, Sékula SB, De Oliveira MLWDR. PP008 - Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. *An Bras Dermatol*. 2005;80(SUPPL. 3):301–6.
7. Salgado CG, Ferreira DVG, Frade MAC, Guimarães L de S, da Silva MB, Barreto JG. High anti-phenolic glycolipid-I IgM titers and hidden leprosy cases, Amazon region. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 May [cited 2017 Jun 13];18(5):889–90. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/5/11-1018_article.htm
8. Frade MAC, de Paula NA, Gomes CM, Vernal S, Bernardes Filho F, Lugão HB, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. Johnson C, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Feb 23 [cited 2017 Sep 11];11(2):e0005375. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005375>
9. Filho FB, Paula NA De, Leite MN, Abi-rached TLC, Vernal S, Batista M,

- et al. Evidence of hidden leprosy in a supposedly low endemic area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2017;112:1–7. Available from: http://memorias.ioc.fiocruz.br/issues/past-issues/item/6339-0173_evidence-of-hidden-leprosy-in-a-supposedly-low-endemic-area-of-brazil
10. van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Batista da Silva M, Carvalho Bouth R, Cunha Messias AC, Gobbo AR, et al. Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia. *Sci Rep*. 2018 Dec 18;8(1):17920.
 11. Corstjens PLAM, van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Alam K, Vrolijk LB, Dlamini S, et al. Fingerstick test quantifying humoral and cellular biomarkers indicative for *M. leprae* infection. *Clin Biochem*. 2019 Jan 26;01(007).
 12. Barreto JG, Bisanzio D, Guimarães LDS, Spencer JS, Vazquez-Prokopec GM, Kitron U, et al. Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Feb;8(2):e2665.
 13. Barreto JG, Bisanzio D, Frade MAC, Moraes TMP, Gobbo AR, de Souza Guimarães L, et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 [cited 2016 Oct 13];15:527. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26573912>
 14. Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome*. 2011;22(1–2):19–31.
 15. Fitness J, Tosh K, Hill AVS. Genetics of susceptibility to leprosy. *Genes Immun*. 2002 Dec;3(8):441–53.
 16. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical Distance, Genetic Relationship, Age, and Leprosy Classification Are Independent Risk Factors for Leprosy in Contacts of Patients with Leprosy. *J Infect Dis*. 2006 Feb 1;193(3):346–53.
 17. Goulart IMB, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Jan 1;15(1):101–5.
 18. Araujo S, Freitas LO, Goulart LR, Goulart IMB. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. *Clin Infect Dis*. 2016 Dec 1;63(11):1412–20.
 19. Reis EM, Araujo S, Lobato J, Neves AF, Costa A V, Gonçalves MA, et

- al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clin Microbiol Infect.* 2014 May 1;20(5):447–52.
20. Goulart IMB, Araujo S, Filho AB, de Paiva PHR, Goulart LR. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. *J Clin Microbiol.* 2015 Oct;53(10):3345–8.
21. Patrocínio LG, Goulart IMB, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 Jun 1;44(3):311–6.
22. Martinez TS, Figueira MM, Costa A V, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1653–8.
23. Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery JA da C, Moreira SJM, et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Nov;109(7):944–7.
24. Donoghue H, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol.* 2001;50(2):177–82.