

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПО ИЗУЧЕНИЮ ЛЕПРЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

АРНАУДОВА

Кристина Шотаевна

**ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕПРЫ И В МОНИТОРИНГЕ
ЛЕПРОЗНОГО ПРОЦЕССА**

14.01.10 – кожные и венерические болезни

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д.м.н. В.В. Дуйко

д.м.н. Л.В. Сароянц

Астрахань 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Ситуация по заболеваемости лепрой в мире	12
1.2. Характеристика рода микобактерий и молекулярно-генетические методы идентификации микобактерий	14
1.3. Лабораторная диагностика лепры	17
1.3.1. Молекулярно-генетические методы идентификации <i>M. leprae</i>	22
1.3.1.1. Специфичность и чувствительность ПЦР при лепре	24
1.3.1.2. Экстракция ДНК <i>M. leprae</i>	36
1.3.1.3. Роль ПЦР в диагностике лепры	39
1.3.1.4. ПЦР для оценки жизнеспособности <i>M. leprae</i> и мониторинга лечения	43
1.3.1.5. ПЦР для контроля за распространением лепры и наблюдения за контактными лицами	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Характеристика обследованных лиц	49
2.2. Методы исследования	51
2.2.1. Пробоподготовка и методы экстракции ДНК из исследуемого материала	51
2.2.2. Полимеразная цепная реакция. Амплификация выделенной ДНК	55
ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ	59
3.1. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных от больных лепрой	59
3.1.1. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных с кожи больных лепрой	60
3.1.2. Идентификация микробиоты содержимого трофических язв больных лепрой и сахарным диабетом	62
3.1.3. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий в соскобах со слизистой поверхности носа	65
3.2. Разработка методов лабораторной диагностики лепры с помощью ПЦР	67
3.2.1. Разработка метода идентификации возбудителя лепры с использованием праймеров к 16S рРНК	67
3.2.2. Разработка метода определения жизнеспособности <i>M. leprae</i> с помощью ПЦР для оценки эффективности лечения лепры	74
3.2.3. Разработка метода идентификации <i>M. leprae</i> с помощью ПЦР с использованием праймеров к RLEP-последовательности для скринингового обследования населения на лепру	83

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	89
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	108
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	109

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Лепра - хроническое инфекционное заболевание человека, вызываемое *Mycobacterium leprae*, приводящее к поражению кожи, периферической нервной системы и внутренних органов. После внедрения в практику лечения комбинированной противолепрозной терапии (MDT) отмечалось значительное снижение заболеваемости лепрой, которое после достижения определенного уровня плато остановилось [58]. Каждый год в мире регистрируются более 200 тыс. новых случаев заболевания лепрой, причем на момент постановки диагноза многие больные уже имеют инвалидизирующие последствия болезни. Во многом это обусловлено поздней постановкой диагноза, связанной как с длительностью инкубационного периода заболевания, так и с существующими методами диагностики.

В настоящее время диагностика лепры основывается на клиническом обследовании пациента, и только при подозрении на лепру осуществляются бактериоскопические и гистологические исследования. Чувствительность данных методов, особенно при малобактериальных формах болезни и на ранних стадиях заболевания, остается невысокой.

Возбудитель лепры является одним из очень немногих патогенов человека, который не растет на питательных средах. Все попытки культивирования *M. leprae* *in vitro*, имеющие длительную историю и продолжающиеся до настоящего времени, остаются безуспешными [89, 90]. *M. leprae* имеет характерные отличия от других видов микобактерий, в частности, по размерам генома, содержанию гуанина и цитозина, по уникальным биохимическим свойствам, таким, к примеру, как наличие в структуре специфического фенольного гликолипида-1 (ФГЛ-1), способность к усвоению ДОФА, в составе пептидогликана глицина вместо L-аланина [54]. Сравнительные исследования изолятов *M. leprae* разного происхождения, включая больных лепрой, броненосцев и мангобейских обезьян, показали, что они различались менее чем на 0,3% нуклеотидов [52].

Вместе с тем циркуляция *M. leprae* в окружающей среде в регионах, эндемичных по лепре, подтверждена многими исследованиями. Так, лепроподобная инфекция отмечена у броненосцев в нескольких южных штатах США и соседних регионах Мексики [197]. В Африке регистрировались случаи лепры у нескольких видов приматов [137]. Благодаря внедрению молекулярно-генетических методов *M. leprae* обнаружена в воде, в том числе в питьевой, и почве в эндемичных регионах по всему миру [118, 135]. Возбудитель лепры, как и другие микроорганизмы, из-за воздействия различных факторов может изменять биологические свойства, обеспечивающие устойчивость в меняющихся условиях пребывания в биоценозе. Такую изменчивость практически невозможно контролировать, а тем более прогнозировать ее результат даже для культивируемых возбудителей. Для возбудителей, не дающих роста на питательной среде и с чрезвычайно длительной генерацией, эта проблема представляется неразрешимой. Однако решение этой задачи стало возможным благодаря внедрению молекулярно-генетических методов, способствующих точной идентификации отдельных генов.

К настоящему моменту осуществлена полная расшифровка генома *M. leprae*, что позволило идентифицировать участки, связанные с синтезом специфических для *M. leprae* белков и разработать видоспецифические ПЦР-тесты [210].

Выбор подходящей ДНК-мишени очень важен для создания высокоспецифичного ПЦР-теста. На данный момент охарактеризованы и используются в качестве мишени различные специфические для *M. leprae* последовательности, позволяющие дифференцировать *M. leprae* от других видов. Опираясь на знания о последовательностях ДНК *M. leprae*, которые кодируют антигенные белки, разработаны тесты на основе ПЦР. К таким белкам относятся 18 кДа и 36 кДа, присутствующие исключительно у *M. leprae* [210], и консервативный белок 65 кДа, обнаруженный у прокариот в виде гомолога белка *Escherichia coli* GroEL [192]. В свою очередь, на основе специфических повторяющихся последовательностей ДНК *M. leprae* (RELP) [211], и участка генома, кодирующего супероксиддисмутазу *M. leprae* (праймеры SOD1 и SOD2) [145], были разработаны

ПЦР-тест для идентификации возбудителя. Одними из наиболее чувствительных ПЦР-тестов являются ПЦР-тесты на 16S рРНК [75,128,150]. При выявлении *M. leprae* в ПЦР-тесте с праймером к 16S рРНК было показано отсутствие перекрестной реакции со штаммами 22 других видов микобактерий [214]. Кроме того, рибосомальные гены используются для определения жизнеспособности микобактерий.

Таким образом, на сегодняшний день за рубежом ведутся, но еще далеки от завершения исследования, касающиеся методов экстракции ДНК/РНК из различного клинического материала, оптимального выбора праймеров для различных целей, использования ПЦР в идентификационных тестах на экспериментальных животных (модель Шепарда), определения места ПЦР среди других лабораторных тестов в диагностике лепры. Внедрение в практику молекулярно-генетических методов открывает новые возможности для быстрой и точной идентификации различных видов микобактерий. Было показано, что у больных лепрой из скарификатов кожи выявлялись, помимо микобактерии лепры, и другие виды микобактерий [172]. Кроме того, возможность определения жизнеспособности микобактерий может помочь в адекватной оценке эффективности проводимой терапии. Все это говорит об актуальности разработки диагностических тест-систем при лепре на основе, в частности таких методов исследования как ПЦР.

Несмотря на то, что заболеваемость лепрой в нашей стране имеет низкий спорадический характер, в последнее время заметно активизировался поток лиц, въезжающих в Россию по туристическим или рабочим визам из стран, в том числе высоко эндемичных по лепре. В 2017 году миграционный прирост населения России составил 220 тысяч человек, в том числе из стран, эндемичных по лепре. В связи с этим на основании постановления Правительства РФ от 29 июня 2015г. № 384н «О перечне инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих и являющихся основанием для отказа в выдаче либо аннулирования разрешения на временное проживание иностранным гражданам и лицам без гражданства, или вида на жительство, или разрешения на работу в РФ» все лица,

въезжающие в Россию, должны обследоваться, в том числе и на лепру. В настоящее время такое обследование включает клинический осмотр, и только при подозрении на лепру проводится бактериоскопическое или гистологическое исследование. Разработка и внедрение отечественных молекулярно-генетических тестов идентификации возбудителя лепры будет способствовать ранней диагностике заболевания, выявлению случаев завозной лепры при скрининговом обследовании мигрантов, дополнительным подтверждающим тестом в диагностике лепры и оценке эффективности лечения.

Степень разработанности. К настоящему времени накопилось достаточно исследований, посвященных молекулярной диагностике лепры [19,27,99,131]. Однако встречаются лишь единичные работы по ранней диагностике лепры и мониторингу противолепрозного лечения [154,131]. Вместе с тем, в России не существуют тест – систем для идентификации *M. leprae* при скрининговом обследовании населения на лепру и для оценки эффективности противолепрозной терапии.

Цель исследования: совершенствование диагностики лепры, мониторинга лепрозного процесса и оценки эффективности лечения на основе создания тест-систем с использованием идентификации возбудителя лепры методом полимеразной цепной реакции.

Задачи исследования:

1. Изучить возможность выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУМ), в том числе и *M. leprae*, в различном биологическом материале от больных лепрой с использованием молекулярно-генетических методов исследования.
2. Идентифицировать возбудителя лепры в клинических образцах с помощью разработанной тест-системы на основе ПЦР.
3. Разработать тест-систему для определения жизнеспособности *M. leprae* с использованием ПЦР для оценки эффективности противолепрозной терапии.

4. Разработать тест-систему с использованием ПЦР для скринингового обследования населения на лепру.

5. Провести сравнительный анализ результатов стандартных методов диагностики лепры с ПЦР-анализом.

Научная новизна исследования. Впервые разработан отечественный высокочувствительный метод детекции ДНК *M. leprae* в биоптатах и скарификатах кожи больных лепрой.

Впервые разработана отечественная тест-система с использованием ПЦР для скринингового обследования населения на лепру в соскобах со слизистой поверхности носа (патент на изобретение «Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции» №2641060).

Впервые разработана отечественная тест-система на основе ПЦР для определения жизнеспособности *M. leprae* с целью оценки эффективности противолепрозной терапии (патент на изобретение «Способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции» №2688156).

Практическая значимость. Разработанная тест-система для идентификации возбудителя лепры явится дополнительным диагностическим тестом при скрининговом обследовании мигрантов и контактных по лепре лиц, а также дополнительным подтверждающим тестом для диагностики лепры и мониторинге лепрозного процесса. Оценка эффективности проводимого лечения на основе определения жизнеспособности *M. leprae* дает возможность проводить адекватный контроль эффективности противолепрозной терапии. Идентификация *M. leprae* в различных биологических образцах будет способствовать уточнению механизмов передачи лепры и сохранения источников инфекции, что в итоге позволит усовершенствовать противоэпидемические мероприятия. Результаты исследования внедрены в практику работы клиники «НИИ по изучению лепры» Минздрава России.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Молекулярно-генетические методы на основе ПЦР обладают высокой чувствительностью, что позволяет дифференцировать *M. leprae* от других микобактерий в клиническом материале от больных лепрой.

2. Разработанные тест-системы с использованием ПЦР в режиме реального времени на основе амплификации участков генов к 16S рРНК *M. leprae* и RLEP-последовательностям *M. leprae* позволяют со 100% специфичностью идентифицировать возбудителя лепры как в различных клинических образцах от больных лепрой, так и при скрининговом обследовании населения на лепру.

3. Тест-система на основе ОТ-ПЦР, основанная на определении жизнеспособных *M. leprae* в процессе противолепрозной терапии, дает возможность получить объективные данные об ее эффективности и решать вопрос об индивидуальных сроках проведения курсов специфического лечения.

4. Разработанные тест-системы при сравнении со стандартными методами исследования (бактериоскопические, гистологические) и зарубежными аналоговыми тест-системами обладают более высокой специфичностью и чувствительностью.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов исследования подтверждается проведенной статистической обработкой с соблюдением принципов статистического анализа.

Внедрение результатов работы в практическое здравоохранение. Результаты исследования внедрены в работу клиники ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава России и ГБУЗ АО «Областной кожно-венерологический диспансер» Минздрава Астраханской области. Материалы диссертации используются для обучения студентов, ординаторов, аспирантов и врачей на рабочих местах на кафедре дерматовенерологии ФГБОУ ВО «АГМУ» Минздрава России.

Методология и методы исследования. Методология исследования включала в себя оценку эффективности разработанных тест-систем на основе ПЦР для ранней диагностики лепры и мониторинга противолепрозного лечения. Исследование выполнено с соблюдением принципов доказательной медицины (отбор пациентов и групп сравнения, статистическая обработка результатов). Работа выполнена в дизайне контролируемого исследования с использованием клинических, инструментальных, лабораторных и статистических методов исследования.

Апробация работы. Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и обсуждены на: заседаниях Ученого совета ФГБУ «НИИЛ» (2012-2019 гг.); IX Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем здравоохранения» (г. Астрахань, 6-8 мая 2013 г.); XVIII International Leprosy Congress (г. Брюссель, 16-19 сентября 2013г.); конференции, посвященной 90-летию противолепрозной службы (г. Астрахань, 10-11 октября 2013 г.); конференции, посвященной 95-летию АГМА (г. Астрахань, 17-19 октября 2013г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (г. Москва, 18-20 марта 2014 г.); международном форуме «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (г.Казань, 14-17 мая 2014г.); XIX International Leprosy Congress (г. Пекин, 18-21 сентября 2016 г.); научно-практической конференции, посвященной 120-летию Астраханского клинического лепрозория (г. Астрахань, 6-7 октября 2016 г.); IX всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (г. Москва, 18-20 апреля 2017 г.); научно-практической конференции с международным участием, посвященной 95-летию противолепрозной службы России (г. Астрахань, 11 октября 2018 г.).

Личный вклад автора. Представленная диссертационная работа является результатом собственных научных исследований автора. Автором лично проведена работа по анализу клинико-лабораторных исследований, статистической обработке полученных данных и анализу результатов исследований.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Научные положения и результаты диссертации соответствуют формуле и области исследований специальностям 14.01.10 – «кожные и венерические болезни», 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология».

Публикации. По результатам работы опубликовано 18 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК, 2 статьи в Scopus, получено 2 патента на изобретения: №2641060, №2688156.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице компьютерного текста (текстовый редактор «Microsoft Word 2010») и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, собственные данные, обсуждение, выводы. Диссертация иллюстрирована 3 рисунками и 17 таблицами. Список литературы включает 218 источников, в том числе 15 отечественных и 203 зарубежных.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ситуация по заболеваемости лепрой в мире

В настоящее время лепра остается проблемой общественного здравоохранения для 145 стран мира. И хотя, по данным ВОЗ, количество новых случаев заболевания лепрой в мире за последние 10 лет снижается, в среднем на 2,8% каждый год (таблица 1), в высокоэндемичных по лепре странах, таких как Индия, Нигерия, Бразилия, Индонезия, Вьетнам и Мьянма, аналогичной тенденции не наблюдается [34, 59]. Распространенность лепры в этих странах составляет выше 1 на 10000 населения, причем высокоэндемичные регионы чередуются с регионами с низким уровнем распространенности лепры [147]. Новые случаи заболевания в мире (до 8,8%) наблюдаются и среди детского населения. Значимую роль в распространении заболевания играет неконтролируемая миграция. В США и странах Западной Европы спорадические случаи лепры [24] в основном выявляются у мигрантов из эндемичных регионов. Так, в Испании в 2013 г. новые случаи лепры в 76,2% диагностировались у иммигрантов из Бразилии, Парагвая и Боливии [158]. Такая же тенденция отмечается в Италии, во Франции [41], в Дании [17].

Основной стратегией, выдвинутой ВОЗ, для борьбы с лепрой остается раннее выявление болезни с применением комбинированной лекарственной терапии (MDT) [205], [36], [8, 104]. Однако все чаще сообщается о развитии резистентности *M. leprae* к MDT [58, 217]. Несмотря на снижение уровня распространенности лепры, параллельного снижения показателей выявляемости заболевания не наблюдается [179]. Это является серьезным препятствием для достижения цели ликвидации лепры в будущем [4, 5].

Таблица 1 – Количество новых случаев лепры за период 2008-2017 гг. по данным ВОЗ

Регион	Африка	Америка	Восточное Средиземноморье	Юго-Восточная Азия	Западная часть Тихого океана	Общее количество
Год	Количество новых случаев					
2008	29814	41891	3938	167505	5859	249007
2009	28935	40474	4029	166115	5243	244796
2010	25345	37740	4080	156254	5055	228474
2011	20213	36832	4357	160132	5092	226626
2012	20599	36178	4235	166445	5400	232857
2013	20911	33084	1680	155385	4596	215656
2014	18597	33789	2342	154834	4337	213899
2015	20004	28806	2167	156118	3645	210740
2016	19384	27356	2834	161263	3914	214751
2017	21465	26365	3102	115180	5820	171932

В России заболеваемость лепрой имеет устойчивый спорадический характер [3]. По данным за 2018 г., в Российской Федерации на учете состояли 212 больных лепрой. Из них 30% находятся в противолепрозных учреждениях, остальные на амбулаторном лечении либо под диспансерным наблюдением. Количество контактных лиц 295 [4].

Несмотря на то, что лепра известна человеку еще с библейских времен, и возбудитель заболевания *M. leprae* открыт G.H.A. Hansen в 1874 году [89,90], диагностика лепры по-прежнему остается сложной проблемой из-за невозможности культивирования *M. leprae* на искусственных питательных средах, а также полиморфности клинической картины, особенно на ранних стадиях болезни.

Сложность постановки диагноза лепры на ранних стадиях болезни связана как с длительным инкубационным периодом, так и с разнообразными клиническими проявлениями, маскирующимися под различные кожные и неврологические заболевания. Несвоевременная постановка диагноза в свою очередь приводит к развитию таких тяжелых осложнений лепрозного процесса, как трофические язвы, невриты, нейропатии и т.д.

1.2. Характеристика рода микобактерий и молекулярно-генетические методы идентификации микобактерий

Представители рода *Mycobacterium* известны человечеству как возбудители древнейших болезней, таких как лепра и туберкулез. Классификация микобактерий началась в 19 веке, когда J.J. Lehman и R. Neumann впервые предложили род *Mycobacterium*, с включенными в него видами *M. leprae* и *M. tuberculosis*, разместить в семействе *Mycobacteriaceae* порядке *Actinomycetales* и классе *Actinomycetes* [9]. Позже появились данные об остальных сапрофитных микобактериях. В настоящее время насчитывается более 100 видов микобактерий, относящихся к роду *Mycobacterium* [106].

Микобактерии представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки, 0,2-0,7x1,0-10 мкм, иногда ветвящиеся; напоминают мицелий, однако эти структуры легко распадаются на палочки либо кокки; хорошо заметных воздушных гриф не образуют; неподвижные; неспорообразующие; аэробы и хемоорганотрофы. Окрашиваются по Граму положительно [9].

Одним из основных свойств микобактерий является кислото-спиртоустойчивость. Поскольку микобактерии содержат большое количество липидов (от 30 до 39%), они окрашиваются только по Цилю-Нильсену при подогревании и обработке карболовым фуксином в малиново-красный цвет на голубом фоне. На этом основан метод окраски микобактерий.

По скорости роста на питательных средах микобактерии делятся на быстрорастущие, которые дают рост уже на 4-7 сутки, медленнорастущие – рост через 7-10 дней, а также микобактерии, не растущие на искусственных питательных средах.

Однако, если многие из видов быстрорастущих микобактерий довольно легко идентифицировать, то для дифференцирования медленнорастущих нужны специальные методы. Особую трудность в идентификации представляют некультивируемые микобактерии, к которым относится *M. leprae*.

Помимо безусловно патогенных для человека микобактерий *M. leprae*, *M. tuberculosis complex*, *M. ulcerans* и др, часто встречаются микобактерии *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, относящиеся к комплексу MAIS, способные вызывать микобактериозы. Проблема состоит в том, что различные виды микобактерий могут вызывать заболевания со схожей клинической картиной, что приводит к неверной постановке диагноза и некорректному лечению.

Поэтому проблема видовой идентификации микобактерий все еще остается актуальной и в наши дни.

Классическими методами идентификации микобактерий являются бактериоскопия, предварительно окрашенных по Циль-Нильсену мазков и микробиологические методы, основанные на росте микобактерий на плотной (яичной) питательной среде Левенштейна-Йенсена, модифицированной среде Левенштейна-Йенсена, на чашках с агаровой средой Миддлбука 7H11, модифицированной жидкостной питательной среде Миддлбука 7H9, среде Финна-11 и др., а также окрашивание родамин-аурином при люминесцентном методе.

При видовой идентификации микобактерий основную роль играют культуральные (пигментообразование, возможность и скорость роста) и биохимические свойства (ферментативная активность) [10]. Однако такая идентификация нетуберкулезных микобактерий довольно длительна и составляет более 6 месяцев [88].

К.В. Mullis в 1993 году была присуждена Нобелевская премия за открытие метода ПЦР, благодаря которому стали активно применяться молекулярно-генетические методы идентификации микобактерий. Особенно важно преимущество метода ПЦР перед стандартными методами из-за возможности осуществления идентификации микроорганизмов в латентной форме, в малых количествах, требующих специальных сред и длительного времени культивации [84], а также при обнаружении некультивируемых возбудителей [121], таких как *M. leprae*. Кроме того, важно отметить, что с помощью метода ПЦР возможно определять жизнеспособность возбудителей.

Метод ПЦР применяется в эпидемиологических исследованиях при типировании микобактерий. Так, обнаружение вариаций последовательностей гена белка 32 кДа и генов 16S и 23S рНК способствует идентификации разных видов *M.tuberculosis* [148].

Признанным стандартом при исследовании ДНК и РНК становится метод ПЦР с детекцией сигнала флуоресценции в RT, который позволяет судить не только о присутствии ДНК/РНК в исследуемом образце, но и о его количестве. Разработка такого метода способствует качественной и количественной оценке ДНК/РНК *M.leprae*, что необходимо для мониторинга MDT. Наиболее часто используются следующие молекулярно-генетические методы: ПЦР, ПЦР-рестрикционный анализ, основанный на способности ферментов рестрикции специфически расщеплять ДНК в определенных сайтах; метод ДНК-зондов, представляющих собой фрагменты нуклеиновых кислот из спейсерной области между генами 16S и 23S рНК для определения зубактериальных организмов методом гибридизации; метод ПЦР с последующей гибридизацией с ДНК-зондами, иммобилизованными на мембранах-стрипах. Также следует отметить метод ДНК-микрочипов, который находит самые разнообразные применения в современной биологии и медицине для анализа сложных смесей ДНК. ДНК-микрочипы используют для анализа изменения экспрессии генов, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирования или повторного секвенирования мутантных геномов.

Одним из современных методов идентификации микобактерий является метод ПЦР с гибридизацией. На этом методе основана тест-система, представленная компанией Hain Lifescience (Германия). Тест-системы Hain Lifescience для молекулярно-генетической диагностики микобактерий основаны на DNA•Strip® технологии (гибридизация с ДНК-зондами (MLPA)). Для проведения идентификации микобактерий разработаны несколько наборов реагентов для дифференцирования различных видов микобактерий. Для идентификации *M.leprae* и определения ее устойчивости к рифампицину, офлоксацину, дапсону этой же фирмой разработан набор реагентов GenoType *Leprae* DR. Однако данную тест-

систему затруднительно использовать в рутинной практике, так как она представляет собой «закрытую систему», проведение реакции длительно и трудоемко, а также возможна контаминация продуктами амплификации.

Важнейшим открытием стало создание секвенирования нового поколения [11], позволяющего считывать несколько последовательностей генома одновременно и определять имеющиеся мутации.

Все эти методы стали возможными после того, как был полностью расшифрован геном ряда микобактерий, что позволило разработать методы их идентификации и создать соответствующие диагностические тест-системы.

1.3. Лабораторная диагностика лепры

В клинической практике диагноз лепры базируется на клинических симптомах, бактериоскопическом анализе (окраска мазков по Цилю-Нильсену) скарификатов кожи и соскобов со слизистой носа и гистопатологическом исследовании биоптатов кожи.

Лепра представляет собой сложный спектр клинических форм, который развивается после инкубационного периода от нескольких месяцев до 30 лет [3]. По классификации Ridley-Jopling, базирующейся на 4 критериях: клиническом, бактериоскопическом, иммунологическом и гистологическом, лепру рассматривают как непрерывный иммунологический процесс от туберкулоидного (ТТ) полюса к полярно-лепроматозному (LL), с выделением 3 промежуточных (пограничных) групп – погранично-туберкулоидной (ВТ), пограничной (ВВ) и погранично-лепроматозной (ВL) – и трех дополнительных – недифференцированная лепра (I), субполярная туберкулоидная (ТТs) и субполярный лепроматоз (LLs). Для проведения МДТ по рекомендациям ВОЗ используют деление больных на группы много- (МВ) и малобактериальной (РВ) формами лепры [38].

Для постановки диагноза лепры необходим дерматологический и неврологический осмотр [169], проведение функциональных проб (проба Минора,

проба с никотиновой кислотой, гистамином, диамином, пилокарпином) и лабораторных исследований. При лабораторной диагностике обнаружение микобактерий лепры в тканевом соке, соскобах со слизистых оболочек носа или в гистологических препаратах позволяет с высокой долей вероятности поставить диагноз лепры. В то же время отрицательный бактериоскопический анализ не означает, что человек не заражен лепрой, а может указывать на то, что концентрация кислотоустойчивых микобактерий ниже 10^4 микобактерий/мл [43]. Это особенно актуально для диагностики больных с РВ формой [71], при которой концентрация микобактерий может быть ниже указанной границы. С другой стороны, при микроскопической визуализации все микобактерии фенотипически неотличимы. А с учетом увеличения числа микобактериозов в мире и сглаженностью клинической симптоматики актуальной остается проблема дифференциальной диагностики микобактериозов и лепры.

К сожалению, метод культивирования на искусственных питательных средах не применим в лепрологии, хотя попытки культивирования *M. leprae* начались сразу после открытия возбудителя и продолжаются до настоящего времени.

Особое место среди экспериментальных моделей лепрозной инфекции на животных заняла модель, предложенная С.С. Shepard в 1960 году [181], которая применяется в лепрологии до настоящего времени. Моделирование заключается в заражении мышей дозированным количеством *M. leprae* в подушечки лапок и их дальнейшем размножении в месте инокуляции. После завершения эксперимента (период 8-12 месяцев) по методу С.С. Shepard, D.H. McRae подсчитывается число микобактерий в лапке [182]. По разнице между введенным количеством микобактерий и количеством, оказавшемся в лапке после заражения, судят о размножении *M. leprae*, в среднем число микобактерий возрастает на 2-4 порядка с 10^4 до 10^6 микробных тел.

Недостатками данной модели является медленное и только локальное размножение микобактерий в подушечке лап мышей. В 1966 г. R. Rees удалось добиться генерализации процесса путем подавления клеточного иммунитета у

мышей тимэктомией и сублетальным облучением (дозой до 900 рентген) [160], что доказывало основное участие клеточного иммунитета в развитии заболевания.

Несмотря на то, что модель С.С.Shepard не является патогенетической, так как отсутствует генерализация процесса, размножение возбудителя происходит только в месте инокуляции, она общепризнана и занимает значимое место в экспериментальной лепрологии. Это связано с тем, что благодаря ей продолжается изучение жизнеспособности *M.leprae* и оценка активности противолепрозных препаратов.

Золотым стандартом лабораторной диагностики лепры является бактериоскопия скарификатов кожи, соскобов со слизистой носа, пунктатов подкожных лимфатических узлов, реже – нервных стволов, а также гистологического исследования биоптатов кожных поражений, а в необходимых случаях периферических нервов [1]. При МВ форме микобактерии легко обнаруживаются в скарификатах из очагов поражения на коже, а при распространенном длительном процессе и в соскобах со слизистой поверхности носа. Скарификаты кожи и соскобы со слизистой носа окрашиваются по методу Циль-Нильсена для обнаружения кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) [39], которые выявляются в виде гомогенных палочек или зернистых форм, единичными экземплярами и типичными скоплениями в виде шаров (глобул), «пачек сигар». Следует отметить, что в настоящее время такие типичные скопления встречаются редко, что затрудняет диагностику заболевания.

Количество КУМ в мазках оценивается по 6-балльной системе и вычислением бактериоскопического индекса (БИН) каждого мазка (таблица 2) и среднего арифметического БИНов (6-ти мазков с разных участков кожи).

Таблица 2 – Оценка бактериоскопического индекса по десятибалльной шкале

БИН	Количество КУМ
6+	1000 и более КУМ в поле зрения
5+	100-1000 КУМ в поле зрения
4+	10-100 КУМ в поле зрения
3+	1-10 КУМ в поле зрения
2+	1-10 КУМ в 10 полях зрения
1+	1-10 КУМ в 100 полях зрения
0	Отсутствие КУМ в 100 полях зрения

Для ранней диагностики лепры наибольшую ценность представляет обнаружение КУМ не только в биоптатах кожи, но и в соскобах со слизистой поверхности носа [198], что свидетельствует как о далеко зашедшем процессе, так и о возможном носительстве возбудителя лепры. Это может явиться причиной распространения заболевания. Для оценки эффективности лечения обследование на наличие КУМ и расчет БИН проводят через 3, 6, 12, 18, 24 месяца лечения. Кроме того, для оценки результатов лечения подсчитывается морфологический индекс – соотношение гомогенных и зернистых форм *M. leprae*.

Для установления диагноза лепры, уточнения клинических форм заболевания, а также с целью контроля за эффективностью лечения проводится гистологическое исследование биоптатов кожи с активных, регрессирующих и разрешившихся элементов. Вероятность обнаружения *M. leprae* в гистологических срезах выше, чем при обычном бактериоскопическом исследовании. Важную информацию о состоянии процесса могут дать также исследования биоптатов периферических нервных стволов, поверхностных кожных нервов, печени, яичек. Однако к этим исследованиям прибегают очень редко.

При гистологическом исследовании каждая форма заболевания характеризуется особой структурой гранулемы. Так, для ТТ характерно развитие гранулемы, достигающей непосредственно эпидермиса, состоящей из лимфоцитов, окружающих эпителиоидные клетки, с глубокой эрозией эпидермиса и наличием многоядерных гигантских клеток Пирогова–Лангханса. Поражение некрупных

нервов в виде инфильтрации или полного разрушения. *M. leprae* при такой форме практически никогда не обнаруживается обычными методами. Сходная картина наблюдается и при ВТ. Отличием является присутствие непораженной субэпидермальной зоны, а также утолщенных нервов и единичных микобактерий.

При ВВ обнаруживается большое количество *M. leprae* в грануле, содержащей эпителиоидные клетки и редко лимфоциты и гигантские клетки Пирогова–Лангханса. Субэпидермальная зона при этом не инфильтрирована. За счет пролиферации шванновских клеток нервы выявляются относительно легко.

При ВL возбудитель лепры диффузно в большом количестве находится в грануле, в которой в основном обнаруживаются макрофаги с вакуолизацией, а также не часто эпителиоидные клетки и лимфоциты. Нервы местами инфильтрированы, периневрий имеет расслоение. Микобактерии лепры присутствуют в большом количестве и расположены в грануле диффузно.

При LL гранулематозное воспаление с большим количеством макрофагов и редко включенных лимфоцитов. Нервные окончания, как правило, не имеют инфильтрации. Гранулема содержит скопления *M. leprae* в виде шаров.

Гистологическое исследование является лабораторным методом, позволяющим классифицировать лепру по типам (формам) заболевания, прогнозировать течение процесса, а также служит одним из основных критериев излеченности.

Таким образом, существующие методы лабораторной диагностики лепры являются эффективными при развернутой картине заболевания, в то время как в диагностике ранних проявлений болезни и при РВ эти методы малоэффективны. Все это диктует необходимость создания новых методов идентификации *M. leprae*, что стало возможно после расшифровки генома *M. leprae* и внедрения в клиническую практику технологии амплификации участков ДНК и основанных на ней различных молекулярно-генетических методов.

1.3.1. Молекулярно-генетические методы идентификации *M.leprae*

Геном *M.leprae* был расшифрован в 2001 году на материале штамма TN, выделенного в штате Тамилнад (Индия) [108]. Значительный прогресс в понимании молекулярной биологии *M.leprae* появился после завершения секвенирования генома, описанного S.T. Cole с соавторами [53], что позволило в дальнейшем произвести сравнение с другими микобактериальными геномами. Это стало прорывом в понимании генетического разнообразия микобактерий [143,142]. Удивительно, что *M.leprae* имеет стабильный геном в течение очень долгого времени. Образцы, извлеченные из древних скелетов, генетически схожи с современными штаммами [177,186].

На основании результатов молекулярно-генетических методов идентификации микобактерий был проведен сравнительный анализ, который показал, что все микобактерии, произошедшие от общего предка, на первоначальном этапе имели геном аналогичного размера. При сравнении последовательностей генома и протеома *M.leprae* и *M.tuberculosis* [191], только 49,5% генома *M.leprae* содержат белок-кодирующие гены, в то время как 27% содержат псевдогены (неактивные гены, являющиеся функциональными аналогами генов *M.tuberculosis*). Оставшиеся 23,5% генома, по всей видимости, могут соответствовать регуляторным генам или являться остатками мутировавших до неузнаваемости генов. Значения генома *M.leprae* оказались существенно ниже, чем соответствующие значения возбудителя туберкулеза [155].

На сокращение генома с 4,42 миллионов пар оснований, как у *M.tuberculosis*, до 3,27 миллионов пар приходится потеря около 1200 генных последовательностей. Значительная редукция генетического материала у *M.leprae* сопровождалась генетическими перестройками и появлением псевдогенов из прежде функционировавших генов: лишь 50% генома кодирует белки (у *M. tuberculosis* этот показатель составляет 91%) [155].

По всей видимости, геном *M.leprae* был когда-то топологически эквивалентен и аналогичен по размеру всем другим микобактериям (около 4.4 Mb)

[155, 42, 188], а затем произошло его обширное сокращение и перегруппировка, что подтверждает эволюционные процессы, которым, возможно, подверглась *M. leprae*. Если все гены (около 3.3 Мб) генома *M. leprae* были активны, можно было бы ожидать 3000 белков по сравнению с 4000 у *M. tuberculosis*. Сравнительный анализ протеом обнаружил только 391 растворимый вид протеинов [129] по сравнению с 1800 у *M. tuberculosis* [98], что указывает на инертные псевдогены. Таким образом, от общего предка микобактерий *M. leprae*, возможно, утратили более 2000 генов.

Содержание G+C генов у *M. leprae* 57,6%, что значительно ниже, чем у *M. tuberculosis* (63%). Такое низкое содержание G+C *M. leprae*, по-видимому, обусловлено активными генами, в то время как дезаминирование цитозина в некодирующих регионах может привести к более нейтральному содержанию G + C [155].

На основе изучения микобактериального генома лепры разрабатываются различные молекулярно-генетические методы идентификации *M. leprae*, что необходимо для создания быстрого, чувствительного и специфического диагностического метода для ранней диагностики лепры, а также раннего прогнозирования прогрессирования заболевания и осложнений лепрозного процесса.

Первые методы амплификации ДНК *M. leprae* на основе ПЦР были разработаны из-за невозможности культивирования *M. leprae* [47,84,212]. Многие белки *M. leprae* с антигенными характеристиками идентифицированы с помощью рекомбинантных библиотек [209]. Одно из первых исследований было проведено в 1990 г. D.L. Williams et al, которые обнаружили ДНК *M. leprae* в биопсиях от больных лепрой с помощью ПЦР [207]. В дальнейшем метод ПЦР был применен и для других образцов (скарификаты и биоптаты кожи, биоптаты нервов, соскобы со слизистых полости рта и носа, кровь, моча), как от активных больных лепрой, так и во время и после лечения [94,167].

В начале развития технологии ПЦР для детектирования специфического ПЦР-продукта использовалось электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов на окрашенном бромистым этидием геле. На сегодняшний день этот метод является

стандартным при идентификации ДНК. Однако электрофоретическая детекция продуктов амплификации имеет высокий риск контаминации и вследствие этого получение ложноположительных результатов.

Эта проблема решается внедрением флуоресцентных методов при детекции ДНК. Одним из таких методов является метод ПЦР в RT, основанный на принципе детекции ДНК уже во время амплификации. Преимущество ПЦР в RT по сравнению с другими методами идентификации микроорганизмов неоспоримо [126].

Размер участка ДНК для амплификации имеет большое значение [65,79] и требует более коротких длин ампликонов в ПЦР в RT [114]. С помощью ПЦР в RT появилась возможность проводить качественную и количественную оценку *M. leprae* в образцах кожи, полученных от больных РВ [130,168] и определять соотношение общего содержания ДНК с бактериальной нагрузкой, что может быть полезно для определения клинической формы болезни [195]. При проведении ПЦР в RT отмечается прямая зависимость флуоресцентного сигнала от количества исходной ДНК [157].

Однако до сих пор не определена наиболее высокочувствительная и высокоспецифичная ДНК-мишень в геноме *M. leprae*, что препятствует внедрению ПЦР для идентификации *M. leprae* в практическое здравоохранение.

1.3.1.1. Специфичность и чувствительность ПЦР при лепре

ПЦР не только позволяет быстро идентифицировать *M. leprae*, но и провести дифференциальную идентификацию от других КУМ, что невозможно при бактериоскопическом исследовании. При исследовании *M. leprae* из разных источников показано присутствие идентичных по 16S РНК межгенных областей [54]. Генетическое разнообразие *M. leprae* на основе различий в гене *groT* показано в 51 изоляте *M. leprae* от больных лепрой из 12 географически отдаленных регионов мира. Так, выделено два генотипа на основе отличий изолятов *M. leprae*, полученных от населения из разных стран, и третий генотип от броненосцев и

мангобейских обезьян [137]. Скорее всего, это обусловлено миграцией народов, аналогично распределению генотипа у *Helicobacter pylori* в японской и корейской популяции [201]. Также сообщалось о преобладании единственного генотипа у *M.tuberculosis* в Восточной Азии [136]. Аналогично в странах Латинской Америки при изучении распределения генотипа groT-гена изоляты *M.leprae* имеют три tandemных повтора в Парагвае и Перу, а большинство изолятов из Мексики четыре tandemных повтора. Предположительно, это связано с занесением лепры в Латинскую Америку мигрировавшими древними монголоидами [136].

В Бразилии также представлены изоляты *M.leprae*, полученные от больных лепрой, которые имеют разное количество TTS-повторов [73]. В участках геномов различных штаммов возбудителя лепры обнаружен полиморфизм. Вышесказанное свидетельствует о разнообразии *M.leprae* генетическом и генотипоспецифическом, обуславливающим распространение заболевания в мире.

Для разработки высокоспецифичного теста на основе ПЦР очень важен выбор участка генома для амплификации ДНК. *M.leprae* существенно отличаются от других микобактерий, подтверждением чему являются: низкое содержание в геноме G+C и размер генома, наличие фенольного гликолипида-1 (PGL-1) и глицина вместо L-аланина в пептидной части пептидогликана [54].

Поскольку у *M.leprae* расшифрован геном, акцент сдвинут на определение белков, специфичных для *M.leprae* [210]. На основе экспрессии ДНК *M.leprae* в *E.coli* с помощью генно-инженерных методов получены рекомбинантные ДНК, позволяющие разрабатывать тесты, опирающиеся на выявление специфических последовательностей [116,218].

Так, на основе последовательностей ДНК *M.leprae*, кодирующих специфические белки 18 кДа и 36 кДа, обнаруженные только у *M.leprae* [65,77,116,207], разработаны ПЦР-тесты для идентификации возбудителя лепры. Так, по данным многих авторов, показана высокая чувствительность белка *M.leprae* 18 кДа при проведении ПЦР [37,46,68,103,178,207,208,]. С помощью белка 36 кДа, обогащенного пролином (pra) [65,66,84,102,122,195], в ПЦР можно обнаружить единичные бактерии в исследуемом образце [84,195]. В работе по обнаружению

микобактерий в различных источниках показана специфичность белка 36 кДа *M. leprae* от броненосцев с экспериментальной лепрой [84]. Также M.Y.L. de Wit с соавторами при амплификации фрагмента 530-bp белка 36 кДа идентифицировали в 100% ДНК *M. leprae* в замороженных биопсиях от нелеченых пациентов, что подтверждалось бактериоскопическим методом, и в 56% образцов от пролеченных больных с БИН=0 [65]. Авторы полагают, что по положительным результатам ПЦР можно судить о жизнеспособности микобактерий во время и после лечения.

В Аргентине отмечена идентичность *M. leprae*, полученной от броненосца и человека, по фрагментам белка 65 кДа, таким как *Naе III* и *BstE II* [218]. В качестве ДНК-мишени используется и антигенный белок 85кДа [130,132,165,167]. При ПЦР штаммов *M. leprae*, пассируемых на *nude*-мышях, также была показана высокая специфичность праймеров к белку 36 кДа [67].

В качестве мишени предложена и супероксиддисмутаза *M. leprae*, на основе которой созданы праймеры SOD1 и SOD2. Благодаря данным праймерам на острове Сотра проведено исследование по обнаружению некультивируемых микобактерий, полученных из мха, в результате которого показано, что выделенные микобактерии и *M. leprae*, полученные от броненосцев с экспериментальной лепрой, имеют одинаковый фрагмент гена, кодирующий супероксиддисмутаза [145].

В целом, оценка ПЦР-тестов в исследованиях показала, что метод ПЦР может иметь 100% специфичность (таблица 3). Кроме того, поскольку обнаружение *M. leprae* играет решающую роль в ранней диагностике лепры, а также в случаях РВ и невритической лепрой (PNL), ПЦР-тест является целесообразным и важным в постановке диагноза [94,161].

Таблица 3 – Специфичность ПЦР при лепре

ДНК-мишень	ПЦР-метод	Результаты	Ссылка
18 кДа	ПЦР в RT	100%	[178]
Ag85B	ПЦР в RT	73%	[132]
16S рРНК	ПЦР	100%	[132]
16S рРНК	ПЦР в RT	100%	[132]

Так как встречаются мутации как в типо-, так и видоспецифических ДНК-участках микобактерий, ложноотрицательные результаты ПЦР вполне возможны. Для предотвращения таких результатов следует учитывать последовательности консервативных генов микобактерий, ответственных за родовую специфичность. Таким образом, не следует ограничиваться имеющимися ДНК-мишенями и продолжать развивать ПЦР-диагностику лепры.

Для обнаружения микроорганизмов, требующих длительного времени культивации и специальных условий или не культивирующихся, таких как *M. leprae*, необходим высокочувствительный ПЦР-тест.

Чувствительность ПЦР при лепре превосходит стандартный уровень. Чувствительность микроскопии гораздо ниже ПЦР и составляет 10^4 бактерий/мл. Так показана положительная амплификация во всех образцах, полученных от броненосцев с экспериментальной лепрой, даже с содержанием бактерий 10^3 на 1 г ткани [84].

Методы гибридизации НК микобактерий предшествовали ПЦР и активно использовались для обнаружения комплекса *Mycobacterium avium* и *Mycobacterium tuberculosis* [171]. Однако данные методы неприменимы для идентификации не растущих *in vitro* микобактерий, таких как *M. leprae*.

Современный метод гибридизации ДНК для идентификации *M. leprae* разработан J.E. Clark-Curtiss и M.A. Docherty и имеет чувствительность до 4×10^3 бактерий/г [51]. Высокая чувствительность получена при использовании праймера RLEP. Однако в биоптатах кожи, полученных от больных с МВ, нижний предел чувствительности составил 10^5 микобактерий. Хотя методы гибридизации ДНК в

высшей степени специфичны, необходимо повышать уровень их чувствительности для достижения рутинного выявления микроорганизмов в биологических образцах.

С.К. Job et al. обследовали биоптаты от 39 человек с подозрением на раннюю лепру. Часть биоптата использовали для гистопатологического исследования, а другую - для постановки ПЦР на наличие *M.leprae* [97]. Кислотоустойчивые микобактерии были обнаружены при микроскопическом исследовании только у 2-х из них, а с помощью ПЦР *M.leprae* выявлены у 11 человек. У одного обследуемого диагноз лепры был поставлен только благодаря обнаружению *M.leprae* посредством ПЦР. D.M. Scollard, T.P. Gillis et al. показали, что микобактерии лепры можно идентифицировать с помощью ПЦР в одной трети случаев биопсий, в которых гистопатологическими методами *M.leprae* не выявлялись [178]. Однако авторами не исключается необходимость проводить ПЦР вместе с гистопатологическим исследованием с целью выявления *M.leprae*.

Исследования, проведенные в Таиланде, показали преимущества ПЦР по сравнению с бактериоскопией и серологическим обследованием, особенно в случаях с РВ, когда БИН равен нулю, а серопозитивность была в пределах 6,25% [206]. По другим данным, ПЦР повышает результативность обнаружения возбудителя лепры при РВ в 5-6 раз [175].

При использовании праймеров, кодирующих видоспецифическую последовательность рРНК, а также белки 18 кДа и 36 кДа [152], для идентификации *M.leprae* в образцах, полученных из лап мышей и кожных биоптатов от больных лепрой, показана чувствительность ПЦР с нижним пределом 3×10^4 бактерий. Отмечена высокая чувствительность белка 65 кДа в ПЦР [157,24,36,38]. A.N. Martinez, R. Lahiri et al. в 2009 г [131], а затем R.P. Turankar, S. Pandey et al. в 2015 г. [198] использовали праймер *sodA* для ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), при этом тест показал высокую чувствительность. Однако по сравнению с мишенями к 16S rRNA и RLEP *M.leprae* чувствительность была ниже. Также недостатком методов было использование электрофореза.

Результаты ПЦР с использованием различных праймеров, чувствительность ПЦР в диапазоне от 33% до 80% отмечается у пациентов с РВ формами лепры и 87-100% у пациентов с МВ лепрой (таблица 4).

Таблица 4 – Оценка чувствительности метода ПЦР с использованием различных праймеров при лепре

ДНК-мишень	ПЦР-метод	Чувствительность		Авторы
		МВ	РВ	
36 кДа	ПЦР-гибридизация	87%-100%	36%-60%	[65,102,206]
	ПЦР в RT	89%	33%	[114]
18 кДа	ПЦР-гибридизация	99%	74%	[37]
	ПЦР в RT	-	50%-83%	[178]
RLEP	ПЦР-гибридизация	100%		[175]
	ПЦР	100%	73%	[79,216]
	ПЦР в RT	91%		[132]
RLEP	ПЦР в RT	100%	83%	[29]
Ag85B	ПЦР в RT	100%	80%	[130]
	ПЦР	-	56%	[132]
16S рРНК	ПЦР в RT	100%	50-51%	[132,168]

Рядом авторов показана более высокая чувствительность ПЦР по сравнению со стандартными методами идентификации *M. leprae* (таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительная чувствительность ПЦР с бактериоскопическим методом

№	Вид образца	Кол-во образцов	ПЦР		Бактериоскопия	Страна	Ссылка
			Праймер	+			
1	Биопсия кожи	102	RLEP	63	59	Бразилия	117
2	Биопсия кожи	220	RLEP	164	122	Индия	47
3	Биопсия кожи	220	Мультиплексная ПЦР	205	122	Индия	47
4	Скарификаты кожи	102	Фрагмент 372 п.н.	95	62	Филиппины	216
5	Биопсия кожи	102	Фрагмент 372 п.н.	95	87	Филиппины	216
6	Скарификаты кожи	25	Фрагмент 530 п.н.	18	5	Индия	100
7	Скарификаты кожи	73	RLEP		17	Индия	99
8	Скарификаты кожи	439	Фрагмент 372 п.н. и 201 п.н.	371	223	Индия	29
9	Скарификаты кожи	50	RLEP	36	9	Непал	187
10	Скарификаты кожи	91	PCR-LP	22	21	Бразилия	127
11	Скарификаты кожи	91	PCR-R	17	21	Бразилия	127
12	Скарификаты кожи	53	Pra-ген	17	-	Бангкок	206
13	Биопсия кожи	53	Pra-ген	35	-	Бангкок	206
14	Биопсия кожи	50	16S рРНК	41	33	Эфиопия	165
15	Биопсия со слизистой носа	60	16S рРНК	47	24	Бангкок	154
16	Биопсия кожи	110	RLEP	81	43	Бразилия	79
17	Биопсия кожи	110	Фрагмент 372 п.н.	58	43	Бразилия	79
18	Биопсия кожи	69	16S рРНК	53	0	Вьетнам	31
19	Биопсия кожи	47	RLEP	38	-	Бразилия	132
20	Биопсия кожи	47	16S рРНК	24	-	Бразилия	132
21	Биопсия кожи	47	sodA	22	-	Бразилия	132
22	Биопсия кожи	47	85B	26	-	Бразилия	132
23	Биопсия кожи	165	Фрагмент 372 п.н. и 201 п.н.	111	84	Индия	162
24	Биопсия кожи	51	RLEP и 372 п.н.	38	18	Китай	215

25	Биопсия кожи	51	RLEP и 372 п.н.	37	18	Китай	215
26	Биопсия кожи	55	Фрагмент 530 п.н.	40	9	Бразилия	18
27	Моча	73	Pra-ген	34	0	Бразилия	45
28	Биопсия нерва	35	Фрагмент 375 п.н.	22	13	Индия	194
29	Скарификаты кожи	43	16S рРНК	18	13	Бразилия	75
30	Скарификаты кожи	43	16S рРНК	6	0	Бразилия	75
31	Скарификаты кожи	164	Фрагмент 372 п.н.	135	65	Индия	30
32	Скарификаты кожи	66	16S рРНК	52	36	Бангкок	168
33	Биопсия кожи	20	Фрагмент 530 п.н.	12	2	Индия	62
34	Скарификаты кожи	122	Pra-ген	86	49	Бангкок	102
35	Биопсия кожи	180	RLEP	114	122	Индия	48
36	Биопсия кожи	180	ML1545	164	122	Индия	48
37	Скарификаты кожи	52	Фрагмент 372 п.н.	36	36	Бразилия	151

Таким образом, для разработки тестов на основе ПЦР необходимы данные о последовательностях ДНК и соответствующих специфических проб. На сегодняшний день наиболее специфичными и чувствительными участками ДНК *M.leprae* при проведении ПЦР, как показано в таблицах 4 и 5, являются RLEP-последовательности и 16S рРНК, с чувствительностью в диапазоне от 57% до 80% для RLEP и от 13% до 82% для 16S рРНК. [143,190].

ПЦР-тест для идентификации *M.leprae*, основанный на специфической для *M.leprae* повторяющейся последовательности (RLEP) разработали S.A. Woods и S.T. Cole [212], после чего данные праймеры стали активно использоваться [55,80,103,152,200,212]. Хромосома *M.leprae* содержит семейство из 29 мультикопийных повторов (RLEP) с переменной структурой и неизвестной функцией [211]. Исследование проводилось при использовании праймеров к 129-bp фрагменту RLEP-повторяющейся последовательности и 360-bp фрагменту гена, кодирующему белок *M.leprae* 18 кДа [103]. Было показано, что чувствительность и

специфичность ПЦР выше при использовании праймера RLEP по сравнению с праймерами к гену, кодирующему белок M.lepae 18 кДа. Так, положительная амплификация отмечалась даже при минимальных количествах ДНК с помощью ПЦР с RLEP-мишенями.

При использовании праймеров к 372 bp [151] и 455-bp [91] фрагментам RLEP-последовательностей M.lepae показана высокая степень чувствительности и специфичности метода ПЦР при идентификации M.lepae. Однако материалом для исследования являлись образцы (биопсии со слизистой поверхности носа), полученные инвазивным способом, взятые только у больных лепрой. Таким образом, данный метод не может использоваться при скрининговом исследовании.

H.D. Donoghue et al. использовали в качестве мишени повторяющуюся и специфическую область RLEP для обнаружения M.lepae в образцах биопсий кожи от больных лепрой [68]. Позже R.W. Truman et al. в 2008 г. разработали способ идентификации M.lepae в экспериментальной модели лепрозной инфекции на мышах, где в качестве праймеров и зондов использовали последовательность RLEP M.lepae [196]. В своей работе авторы показали, что праймер к RLEP более чувствительный и специфичный для M.lepae, и с его помощью возможно идентифицировать единичные бактерии по сравнению с бактериоскопическим исследованием.

W. Yan et al. сообщили о 72% ПЦР-положительных биопсиях при использовании RLEP-мишени, тогда как при бактериоскопии положительными были только 35% [215].

F.G. Maltempe et al. показали, что ПЦР к RLEP участкам M.lepae имеет одинаковую чувствительность с бактериоскопией при исследовании скарификатов кожи от больных лепрой и составляет 24% [127].

M.C. Azevedo et al. отметили высокую чувствительность праймеров RLEP при всех формах заболевания с процентом позитивности ПЦР: TT-21/38 (55,2%); BT-20/21 (95,2%); BB-18/18 (100%); BL-12/12 (100%); LL-13/13 (100%) [27].

V.S. Chaitanya et al. также сообщили об аналогичных результатах мультиплексной ПЦР к RLEP: IL-31/41 (75.6%); TT-03/03 (100%); BT-40/42

(95,2%); BV-03/03 (100%); BL-58/59 (98%); LL-70/72 (97%) [47]. ПЦР показала высокую чувствительность и специфичность при диагностике туберкулоидной формы и недифференцированной лепры, которые, как правило, являются КУМ-отрицательными. Это указывает на то, что ПЦР может быть использована при выявлении РВ лепры.

T. Sushma et al. сравнивали результаты бактериоскопии и ПЦР к RLEP образцов, взятых от больных РВ [190]. Согласно исследованию в 19% случаев при стандартных методах лепру ошибочно классифицировали как РВ, в связи с чем больной получал несоответствующее лечение. Также в 10% случаев образцы от пролеченных больных были положительны при ПЦР, когда бактериоскопия была отрицательна.

Таким образом, рядом исследований показана высокая чувствительность и специфичность RLEP в качестве ДНК-мишени для идентификации ДНК *M. leprae*. Скорее всего, это связано с тем, что данные участки присутствуют в нескольких местах геномной ДНК *M. leprae*.

Многократно повторяющиеся рибосомальные гены 16S рРНК, количество которых до нескольких тысяч на одну бактерию, в настоящее время также активно используются при проведении ПЦР для обнаружения бактерий [50]. 16S рРНК — один из трёх основных типов рРНК, образующих основу рибосом прокариот, находятся в их малой (30S) субъединице. Константа седиментации равна 16 S (единиц Сведберга); константы двух других молекул равны 5 и 23 S. Длина 16S рРНК — около 1600 нуклеотидов. У эукариот существуют аналогичные рибонуклеиновые кислоты 18S рРНК, состоящие приблизительно из 2500 нуклеотидов [81]. Исследования с использованием этого гена внесли большой вклад в открытие новых видов микобактерий, и продолжает служить в качестве важного инструмента как альтернатива фенотипическим методам идентификации. С помощью метода ПЦР с последующим секвенированием участка гена 16S рРНК исследовано 100 микобактериальных культур [14]. Ген 16S рРНК имеет специфичные для каждого вида бактерий последовательности, но также и общие [63]. Использование мишени 16S рРНК при ПЦР имеет преимущество, так как

входит в состав микобактериальных рибосом и транскрибируется в огромном количестве копий (10^3 - 10^4 на клетку). Также для идентификации *M.tuberculosis* используется метод РНК-амплификации 16S рРНК.

Идентифицировались виды микобактерий, которые невозможно разделить классическими биохимическими и бактериологическими методами. При ПЦР и секвенировании данного участка гена выявлена генетическая гетерогенность штаммов микобактерий, относящихся к видам *M.avium*, *M.fortuitum* и *M.gordoniae* [110].

Исследования для идентификации микобактерий с использованием праймеров к 16S рРНК на основе метода ПЦР показывают, что этот метод является быстрым и точным [150]. Он также предоставляет информацию о таксономической связанности новых видов, что невозможно другими методами. Участок гена 16S рРНК *M.leprae* не имеет перекрестной реакции с 22 другими штаммами микобактерий при проведении ПЦР [214].

L.É.C. Marques et al. в своей работе использовали ПЦР к 16S рРНК *M.leprae* [128], при этом в 89,7% соскобах со слизистой носа от больных с МВ лепрой и в 73,3% от РВ идентифицировалась *M.leprae*. В биопсиях от больных с МВ *M.leprae* обнаруживалась в 100% образцов. Таким образом, праймер 16S показал высокую чувствительность как при МВ, так и при РВ лепре. Также R.S. Gama et al. использовали ПЦР к 16S рРНК, при этом *M.leprae* идентифицировалась у 48,8% больных лепрой, в то время как бактериоскопически положительными были только 30,2% больных [75].

С помощью гена 16S рРНК возможно не только идентифицировать возбудителя лепры, но и определять жизнеспособность *M.leprae*. В. Boddinhaus et al. показали, что при ОТ-ПЦР к 16S рРНК образуется от 10^3 до 10^4 копий. R.A. Cox et al. [55] и J. Arnoldi et al. [23] обнаружили единичные *M.leprae* в образцах биопсий кожи больных лепрой с использованием праймеров к 16S рРНК.

R. Sharma et al. [179] при проведении ОТ-ПЦР к 16S рРНК показали высокую чувствительность теста, *M.leprae* идентифицировалась в 88,9% скарификатах от больных лепрой.

B. Phetsuksiri, J. Rudeeaneksin et al. [154] применяли метод ОТ-ПЦР с использованием праймеров к 171 bp фрагменту, охватывающему позиции 69-239, гена 16S рРНК *M. leprae*. Установлено, что даже через 6 месяцев от начала лечения *M. leprae* обнаруживались с помощью ПЦР в среднем в 28,3% случаев в зависимости от типа лепры, хотя БИН был отрицательным.

A.N. Martinez et al. предложили метод ПЦР к 16S рРНК *M. leprae* в RT, основанный на соотношении РНК/ДНК для определения жизнеспособности [131], то есть оценивали уменьшение *M. leprae*-специфических РНК от общего содержания ДНК *M. leprae*. Результаты показали, что значительное снижение жизнеспособности наступало уже через 48 часов после лечения рифампицином. Кроме того, анализ биопсий от больных лепрой подтвердил корреляцию лечения MDT и снижения уровня экспрессии генов. Этот подход помогает в определении эффективности лечения и определении лекарственной устойчивости [61,133]. Другие исследователи стали использовать этот метод для оценки жизнеспособности *M. ulcerans*, а также патогенных грибов [33,213].

В эндемичных регионах у многих контактных с больными лепрой лиц без явных клинических симптомов заболевания в назальном секрете идентифицируются *M. leprae* [22,71]. Скорее всего, это связано с тем, что основным путем передачи лепры является воздушно-капельный. Все это приводит к бессимптомному носительству и дальнейшему распространению лепры. Таким образом, существует необходимость совершенствования скринингового обследования населения на лепру. При таком обследовании особое внимание должно уделяться именно разработке неинвазивного, а также высокочувствительного и высокоспецифичного способа обнаружения *M. leprae*.

Таким образом, рядом исследований показана высокая чувствительность и специфичность праймеров к RLEP и 16S рРНК в качестве ДНК-мишени для идентификации ДНК *M. leprae*. Скорее всего, это связано с тем, что данные участки присутствуют в нескольких местах геномной ДНК *M. leprae*.

1.3.1.2. Экстракция ДНК *M. leprae*

Для создания высокоэффективного ПЦР-теста, помимо подбора специфичных и чувствительных праймеров, необходимы соответствующие пробоподготовка и экстракция ДНК в зависимости от клинического образца (биоптаты, скарификаты, соскобы со слизистой носа, соскобы с трофических язв, сыворотка крови и др.). Успешная амплификация ДНК во многом зависит от количества и качества нуклеиновых кислот, выделенных из биологических образцов [28]. Выделение ДНК из клинических образцов может быть трудной задачей, когда содержание геномной ДНК мало и/или она повреждена. Комплекс микобактериальной клеточной стенки водонепроницаем, что препятствует ее лизису и последующему высвобождению генетического материала [113]. Эффективность лизиса клеток зависит от отношения ДНК/РНК, экстрагированных и остаточных реагентов экстракции [86]. Также на этот процесс влияют загрязняющие вещества и ингибиторы ПЦР, способствующие частичной деградации ДНК [156].

Методы экстракции, используемые для выделения нуклеиновых кислот, не всегда подходят для выделения ДНК *M. leprae* [32] и требуют предварительной обработки образцов: замораживания/оттаивания [202], растирание [68], гомогенизации, добавления протеиназы К [72], инкубации минимум 16 часов [195], использования tris-HCl или tris-EDTA [216], детергентов, таких как triton X-100 [25] и SDS [87].

Кроме того, для выделения ДНК во многих работах используют фенол-хлороформ [149], который способствует получению очищенной ДНК, хотя данный метод имеет несколько стадий обработки проб, что может привести к увеличению риска контаминации [183]. Исследователи используют коммерческие наборы: QIAamp DNA Mini Kit и DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), для получения высокой концентрации ДНК, даже в образцах с сильно деградированной ДНК [156] или в образцах с единичной ДНК [203].

Экстракция ДНК из различных клинических образцов, а именно скарификаты и биоптаты кожи, соскобы со слизистой носа, имеет свои особенности.

Высокая чувствительность и специфичность ПЦР показана при экстракции ДНК *M. leprae* из скарификатов кожи [26,101]. Впервые Kyeong-Nan Yoon в 1993 году сообщил об обнаружении *M. leprae* при ПЦР в скарификатах кожи, взятых от больных лепрой [216]. Далее многими авторами получены аналогичные результаты [16]. Также показано, что в скарификаты кожи от больных лепрой *M. leprae* идентифицировалась при ПЦР, хотя бактериоскопически образцы были отрицательными [189].

Слизистые верхних дыхательных путей считаются основными входными воротами для *M. leprae* [35,134], поэтому выделение и амплификация ДНК возбудителя из соскобов со слизистой носа очень полезна в скрининговом обследовании контактных лиц и, следовательно, имеет важное значение в борьбе с распространением лепры [21]. Так, M.Y. de Wit et al. еще в 1993 г. сообщили об использовании ПЦР к *pra*-гену 531 п.н., при которой 79,6% соскобов со слизистой носа от больных лепрой были положительны [64]. С другой стороны, использование данного клинического образца важно для выявления заболеваемости среди субклинических носителей [29]. В эндемичных странах, ряд исследований показали, что в соскобах со слизистой носа нет различий в частоте идентификации ДНК *M. leprae* у контактных и не контактных с больными лепрой (контрольной группой) [153]. Но ни в одном из этих исследований не прослежена связь между наличием *M. leprae* с дальнейшим развитием болезни, что может указывать на носительство и распространение лепры [120].

Затем J. Wichitwechkarn et al. в 1995 г. в качестве образца исследовали биопсии кожи от больных лепрой и идентифицировали *M. leprae* в 66% случаев [206]. Проанализировав работы в период с 2000 по 2019 гг, наиболее часто исследуемыми образцами при ПЦР являются биоптаты кожи [18,117]. Несмотря на то, что биоптаты имеют самый высокий процент выявляемости *M. leprae* [175], данный метод требует особой пробоподготовки Идентификация *M. leprae* может

осуществляться в свежих биоптатах кожи [154], замороженных [56], биоптатах хранившихся в формалине [65], фиксированных в парафине [215], в 70% этаноле [97].

Исследователи также идентифицировали *M. leprae* в ПЦР в образцах мочи. K.R. Caleffi et al. в 2012 г. использовали 151 п.н. рга-гена *M. leprae* для обнаружения возбудителя в образцах мочи от больных с активной лепрой [45]. ПЦР-положительными оказались 34 из 73 (46,58%) образцов. Использование для идентификации *M. leprae* образцов мочи, по мнению ряда авторов, позволит улучшить диагностику, главным образом, при туберкулоидной форме или в тех случаях, когда результаты исследования скарификатов кожи отрицательные (пациенты с PNL, I и PB) [45].

V. Tiwari et al. [194] применяли ПЦР для исследования биоптатов нервов у 35 больных с PNL. При бактериоскопии 13 (37,14%) случаев были положительными, а ПЦР-позитивность наблюдалась в 22 (62,86%) случаях [194]. Однако данный образец получен инвазивным методом, что не дает возможности использовать метод в рутинной практике.

При экстракции ДНК из слюны и соскобов со слизистой полости рта показаны положительные результаты ПЦР, что предполагает полезность данных образцов, особенно у больных с MB лепрой [144]. Однако ПЦР при этом имеет низкую чувствительность.

Идентифицировали возбудителя лепры и в цельной крови. Так, в исследовании R.S. Gama et al. приняли участие 43 больных с активной лепрой, ПЦР-позитивность отмечалась в 13,95% случаев, при этом в скарификатах в 41,86% [75]. При исследовании образцов крови, полученных от контактных лиц и от больных лепрой во время и после лечения, E.C. Almeida et al. также идентифицировали *M. leprae* в некоторых образцах [19]. В работе A.R. Santos et al. показано, что *M. leprae* обнаруживались с помощью ПЦР даже через 8 лет после лечения [174].

Также отмечено, что контактные лица с больными MB и ПЦР-положительные на лепру при анализе крови подвержены более высокому риску

развития заболевания в дальнейшем [161]. Предлагается для раннего выявления лепры в качестве исследуемого образца использовать кровь [153]. Однако чаще всего возбудитель лепры не идентифицируется в крови.

Необходимо отметить, что существующие методы экстракции не являются совершенными и имеют ряд недостатков: длительность метода выделения, состоящего из многих этапов с использованием дорогостоящих готовых зарубежных наборов реагентов, включающих гомогенизацию на льду, обработку реагентом TRIzol, осаждение ДНК изоамиловым спиртом, многократные отмывки; проведение экстракции ДНК и РНК только из биоптатов и скарификатов кожи больных лепрой и из подушечек лап атимусных мышей, зараженных *M. leprae* по методу Shepard и McRae [4], а также риск контаминации достаточно высокий. В большинстве работ авторами проводилась экстракция ДНК из образцов, полученных инвазивным способом, таких как биоптаты кожи, что препятствует созданию скринингового теста. Поэтому в настоящее время необходимость в разработке методов экстракции для различных образцов особо актуальна.

1.3.1.3. Роль ПЦР в диагностике лепры

В настоящее время в некоторых эндемичных странах структура контингента больных лепрой меняется в сторону РВ, и обнаружение лерозных поражений на ранних стадиях становится все более актуальной проблемой. Известно, что микобактерии легко обнаруживаются морфологически в кожных биоптатах и нервах больных только МВ. При РВ и у некоторых больных, находящихся на лечении или в стадии реверсивной реакции, микобактерии выявить очень трудно.

Эффективность лечения лепры, как и любой болезни, определяется возможностью ее наиболее ранней диагностики. Наличие кожных проявлений, лежащих в основе постановки диагноза лепры на настоящем этапе, является явным признаком генерализации процесса. Выявление субклинической инфекции могло бы создать условия для значительного повышения эффективности лечебных и профилактических мероприятий. Кроме того, наличие устойчивости у возбудителя

лепры к химиопрепаратам диктует необходимость разработки тестов для ее быстрой и адекватной оценки.

Используя в качестве мишени фрагмент 530-вр гена, кодирующего антиген M.leprae 36 кДа с помощью двух видов праймеров (813 и 862), был исследован материал (носовая слизь и биоптаты кожи) от 44 длительно леченых больных лепрой, бактериоскопически негативных более 10 лет. В ПЦР M.leprae обнаруживались у 25% больных, причем чаще при РВ (38%), чем при МВ (13%). Авторы предполагают, что более щадящий режим лечения больных РВ чаще ведет к появлению персистирующих форм M.leprae, чем при МВ [137]. K.S. Lee et al., используя аналогичные праймеры, выявили ДНК M.leprae в периферической крови у 5 нелеченых больных и двух больных с лепрозной узловатой эритемой, что, по всей видимости, объясняется продолжительным периодом существования микобактерий в периферической крови у активных больных [122]. При сравнении нескольких методов диагностики (амплификация фрагмента 531-вр, серодиагностика с PGL-1 и Dis-BSA, бактериоскопия) была выявлена хорошая корреляция всех тестов у больных МВ. У МВ больных все тесты оставались негативными. Из 43 контактных лиц у двоих выявлены микобактерии [195]. Таким образом, применение ПЦР способствует выявлению резервуара инфекции и, следовательно, формированию групп потенциально высокого риска заболевания.

Используя в качестве мишени ген LSR, кодирующий антиген M.leprae 15 кДа, исследовался материал от больных с РВ. Праймеры, основанные на последовательности этого гена, давали положительную ПЦР у 5 из 8 больных с БИН = 0. Чаще всего антитела к этому антигену обнаруживаются у больных с реверсивной реакцией [140].

ПЦР может использоваться также в случаях, когда пациент имеет атипичную клиническую картину или с отрицательными бактериоскопическим и гистологическим методами. В первую очередь, это касается больных с неврологическими нарушениями, которые легко пропустить, так как нет характерных кожных поражений [94]. Своевременное лечение является обязательным в таких случаях, так как при возникновении фиброза нервной ткани

развиваются тяжелые необратимые осложнения. Неврологи не должны забывать о лепре как о возможной причине периферической нейропатии [95], так как нервные поражения при туберкулоидной лепре лишены специфичности из-за схожести поражений, наблюдающихся при других воспалительных нейропатиях, таких как саркоидоз и хроническая воспалительная и демиелинизирующая полинейропатия неизвестного происхождения. Для таких поражений было бы чрезвычайно полезно иметь чувствительный метод обнаружения генома *M. leprae*.

D.S Ridley и W.H. Jopling предположили, что PNL может развиваться по всему спектру болезни от BL до TT форм [164], но ряд авторов относят PNL к BT [139]. На самом деле, эти пациенты не могут быть классифицированы в соответствии с системой Ридли и Джоуплинга из-за отсутствия поражений кожи и четких гистологических признаков повреждения нервов. Тип нейропатии при лепре зависит от клеточного иммунитета хозяина на *M. leprae*. Реверсивные реакции могут привести к дальнейшему поражению нервов без морфологически обнаруживаемых микобактерий. Тщательное гистопатологическое исследование биопсии кожи (участки гипестезия) при PNL [139] не показало каких-либо патологических отклонений и соответствует нормальной коже. Однако анализ биопсий нервов в ряде работ показывает наличие *M. leprae*. Авторы предполагают, что лепра обязательно протекает с кожными поражениями. Поэтому довольно сложно диагностировать случаи PNL [20]. В клинической практике ПЦР эффективна при выявлении ДНК *M. leprae* в образцах нервов, которые при гистологическом и бактериоскопическом анализе были отрицательны. M.R. Jardim et al. показали, что *M. leprae* в случаях PNL идентифицируется чаще с помощью ПЦР, чем при серологических методах (определение анти-PGL-1) и при прямом обнаружении КУМ [95].

P. Chemouilli et al. разработали и применили чувствительную ПЦР-методику для обнаружения *M. leprae* в биоптатах нервов от больных лепрой различной формы [49]. Во всех биоптатах нервов от больных лепроматозной лепрой идентифицировалась *M. leprae*, в то же время позитивные результаты были получены в 50% срезов нервов, где бактерии не обнаруживались при оптической и

электронной микроскопии. У одного больного туберкулоидной лепрой ни один из биоптатов не давал положительных результатов в ПЦР. M.Y.L. de Wit et al. показали, что в 56% случаев кожные биоптаты от больных туберкулоидной лепрой давали позитивные результаты в ПЦР [65].

S.L. Antunes et al. при исследовании 17 биоптатов нервов от больных с PNL выявили *M. leprae* с помощью ПЦР в 11 случаях, тогда как морфологически микобактерии выявлялись только в 5 биоптатах [20]. Применение метода ПЦР у больных РВ позволило выявить присутствие кислотоустойчивых микобактерий в 48,2% образцах, хотя морфологически все образцы были негативны [57]. Идентификация *M. leprae* в нервах при помощи ПЦР является более чувствительным методом, чем микроскопия, хотя у больных с РВ имеет место некоторая вариабельность результатов.

При реверсивных реакциях обнаружение бактериальной ДНК в отсутствие морфологически обнаруживаемых бактерий не обязательно означает наличие жизнеспособных микобактерий, поскольку у недавно леченых больных ДНК *M. leprae* сохраняется еще долгое время после гибели микроорганизмов [65].

Обнаружение с помощью ПЦР ДНК *M. leprae* в трудных для диагностики случаях способствует правильной и ранней постановке диагноза. Развитие и постоянное совершенствование молекулярных тестов для диагностики лепры показало, что PNL более распространена, чем первоначально предполагалось [20]. Следовательно, ПЦР должна использоваться в качестве подтверждающего метода в труднодиагностируемых случаях, в частности, таких как PNL [128,166], а также может способствовать дифференциальной диагностике лепры от воспалительных нейропатий.

Кроме того, ПЦР можно использовать в дифференциальной диагностике лепры с другими кожными заболеваниями, такими как отрубевидный лишай, лейшманиоз, витилиго, кожный туберкулез, саркоидоз и др. При использовании различных мишеней *M. leprae*, таких как Ag 85B [130], *sodA* и 16S рРНК [131], RLEP [196], в ретроспективном анализе показано, что у больных с различными

дерматологическими заболеваниями, выявленными в течение последних 10 лет, при ПЦР обнаруживались *M. leprae* [132].

1.3.1.4. ПЦР для оценки жизнеспособности *M. leprae* и мониторинга лечения

Жизнеспособность *M. leprae* определяется с помощью модели С.С. Shepard, однако применение затруднено из-за длительности эксперимента. Флуоресцентные и радиометрические методы являются подходящими для определения жизнеспособности *M. leprae* в образцах из подушечек лапок мышей *nu/nu*, так как эти образцы содержат большое количество *M. leprae* (10^9 бактерий/мл). Однако высокая эффективность этих анализов для мониторинга жизнеспособности *M. leprae* сомнительна. Следовательно, существует большая потребность в быстром и чувствительном анализе жизнеспособности *M. leprae*.

Стандартным методом оценки эффективности лечения является подсчет БИН, тем не менее, БИН снижается очень медленно во время лечения (1 БИН/год терапии), а в некоторых случаях БИН остается неизменным во время и после лечения, что не дает возможности оценить эффективность терапии и диагностики рецидива инфекции [27]. Кроме того, с помощью бактериоскопии нельзя идентифицировать живые *M. leprae*.

Исследования биопсий пациентов с помощью ПЦР подтвердили, что количество жизнеспособных *M. leprae* снижается во время лечения по схеме ВОЗ. Так, обнаружение ДНК *M. leprae* у больных с МВ лепрой снизилось на 54,3% и у больных РВ лепрой на 61,8% в сравнении с результатами до лечения [102]. Тем не менее, ПЦР в некоторых случаях остается положительна длительное время после эффективного лечения [105,185]. Аналогичным образом, A.R. Santos et al. [174] тестировали метод ПЦР с использованием праймера RLEP на различных образцах от больных лепрой (волосные луковицы, кровь, соскобы со слизистой носа, лимфа, биопсии кожи), которые завершили лечение MDT. Результаты показали, что 54,5% исследуемых образцов были ПЦР-положительными на протяжении 8 лет

после окончания МДТ. Однако, не было возможности сделать окончательные выводы о клинической значимости ПЦР позитивности, так как анализы были основаны на выявлении ДНК и не отражали жизнеспособности микобактерий.

N. Lini et al. разработали метод для мониторинга эффективности химиотерапии с использованием гена-мишени hsp18 [125]. Число копий ДНК бактерий и hsp18 мРНК оценивалась у 47 больных лепрой во время лечения с использованием образцов биопсий, залитых парафином. Наблюдалось снижение ДНК и мРНК во время химиотерапии, и мРНК hsp18 не определялась у пациентов после 2-х лет МДТ. ВОЗ рекомендовала сократить лечение до 12 месяцев, хотя значительное количество ДНК *M. leprae* остается в коже даже после 2 -х лет. Недавние молекулярно-эпидемиологические данные указывают на то, что повторное заражение встречается чаще, чем рецидивы [184].

Выявление ДНК не позволяет судить о жизнеспособности, поэтому исследования были направлены на экстракцию РНК для дальнейшей постановки ОТ-ПЦР. Было отмечено, что с помощью ОТ-ПЦР определяются только нуклеиновые кислоты из живых организмов, так как скорость оборота РНК высока, особенно у прокариот. Следовательно, методы, основанные на количественной оценке уровня РНК в тканях могут быть полезны для мониторинга эффективности лечения [154].

После того как при детекции жизнеспособных микобактерий туберкулеза была показана перспективность использования ОТ-ПЦР, этот метод нашел свое применение и в лепрологии. С целью определения жизнеспособных *M. leprae* чаще всего используют ОТ-ПЦР с праймерами к 16S рРНК. Ген 16S рРНК *M. leprae* был выбран в качестве мишени для ОТ-ПЦР, так как ранее было показано, что она применима для обнаружения живых *M. leprae* в клинических образцах [179].

Метод на основе ОТ-ПЦР и использование участка, кодирующего 16S рРНК, разработан с колориметрической идентификацией *M. leprae* на микротитровальных платах [83]. Чувствительность данного метода составляла 91,3%. Метод основан на выделении РНК, амплификации с использованием праймера к 16S рРНК и электрофорезе в агарозном геле с дальнейшей колориметрической гибридизацией.

R. Sharma et al. при использовании ОТ-ПЦР к 16S рРНК обнаруживали в 46,4% скарификатов и 68,7% биопсий кожи жизнеспособные *M. leprae* у больных лепроматозной лепрой [179].

В настоящее время методы оценки жизнеспособности возбудителя лепры и мониторинга лечения имеют ряд недостатков: для исследования брались образцы в основном от нелеченых больных; использование дорогостоящих готовых зарубежных наборов реагентов; трудоемкость получения гомогената из биоптатов с использованием ультразвукового дезинтегратора; увеличение времени осаждения ДНК до 2 часов при -200°C ; использование нескольких пар праймеров; использование в качестве детекции продуктов амплификации электрофореза, делающих процесс идентификации возбудителя лепры более трудоемким и долгим. Следовательно, есть необходимость в разработке простого и быстрого метода для оценки жизнеспособности возбудителя лепры и оценки эффективности лечения.

1.3.1.5. ПЦР для контроля за распространением лепры и наблюдения за контактными лицами

Существуют доказательства того, что *M. leprae* поступают в окружающую среду от больных лепрой как из носовой полости [60], так и из кожных поражений [74,96]. G. Ramu показал, что один больной лепроматозной лепрой может иметь до 1,6 миллионов микобактерий в ротовой полости [159]. Есть подтверждения того, что *M. leprae* способна выживать в окружающей среде в течение многих дней [118,141]. Как известно, почва является оптимальной средой для сохранения жизнеспособности многих микроорганизмов [141].

Исследования в районах с высоким уровнем распространенности заболевания выявили наличие *M. leprae* в пробах воды в Индонезии [118] и почвы в Индии [135] в качестве потенциальных источников непрерывной передачи заболевания. С.К. Job et al. предположили, что распространению *M. leprae* в окружающей среде способствуют микобактерии, находящиеся на коже и слизистой носа нелеченых больных лепрой, что, в свою очередь, увеличивает риск

заболевания у контактных лиц [96]. R.W. Truman et al. использовали метод секвенирования генома и показали, что дикие броненосцы и больные лепрой, проживающие в Южной Америке заражены идентичным штаммом *M.leprae*. Авторы утверждают, что около трети новых случаев заражения лепрой являются результатом прямого контакта или употребления в пищу мяса инфицированного броненосца [197].

Передача *M.leprae* в основном происходит воздушно-капельным путем [40], поэтому важна идентификация *M.leprae* именно в носовой полости у здоровых и контактных лиц из эндемичных и неэндемичных регионов, что будет способствовать пониманию субклинической инфекции. Результаты различных исследований показывают, что большинство больных МВ имеют *M.leprae* на слизистой носа, а также *M.leprae* встречается у контактных и здоровых людей, живущих в районе, где лепра является эндемическим заболеванием [35,120]. Однако выявление ДНК *M.leprae* у лиц, контактных с больными лепрой, с помощью ПЦР в соскобах со слизистой носа не подразумевает обязательного развития болезни. Частота обнаружения ДНК в соскобах со слизистой носа у контактных лиц, проживающих в эндемичных регионах, варьирует от 1 до 31%, что зависит от клинической формы. Эти данные не являются окончательными, так как перспективные исследования большого количества контактных отсутствуют.

С помощью тест-системы с использованием ПЦР и ELISA-PCR/PNA-ELISA удалось доказать, что в неэндемичной по лепре стране - Норвегии, микобактерии не выявлялись в носовой полости у 219 обследованных [170].

Имеются сообщения об обнаружении *M.leprae* в назальных секретах больных лепрой, контактных с ними лиц, проживающих в эндемичном по лепре регионе [64,67,112]. Было показано, что 1 из 55 проб от лиц, контактных с больными РВ, и 13 из 164 проб от индивидуумов, контактных с больными МВ, позитивны в ПЦР на наличие *M.leprae* [64].

У здоровых семейных контактных лиц, проживающих в Колумбии, в носовой слизи микобактерии выявлялись в 12,8% случаев. Были предложены праймеры, комплементарные к сегменту LSP/A15 гена, который кодируется в белке 15 кДа

M.lerprae. Проводились исследования с применением ПЦР для выявления ДНК M.lerprae в соскобах со слизистой носа, взятых от больных лепрой, контактных с ними лиц и здорового населения [19,64,120,35]. В таблице 6 представлены результаты исследований по идентификации M.lerprae в соскобах со слизистой носа. Самая высокая чувствительность была показана при использовании праймера к RLEP, что подтверждает целесообразность выбранного праймера в проведении скрининговых исследований в нашей работе.

Таблица 6 – Результаты ПЦР соскобов со слизистой носа, полученных от контактных и здоровых лиц

ДНК-мишень	ПЦР-метод	Группа обследуемых лиц	Результаты		Литература
			МВ	РВ	
Пролин-антиген (pra-36 KDa)	ПЦР-Гибридизация	Здоровые	7,8%		[44]
Пролин-антиген (pra-36 KDa)	PCR-ELISA	Здоровые	7,8%		[35]
RLEP	PCR	Здоровые	31%		[120]
RLEP	PCR	Контактные	5,2%	3,8%	[120]
RLEP	PCR	Контактные	10%	6%	[44]
RLEP и TTC повторы	Multiplex-PCR	Контактные	11%	1,3%	[29]
ML0024	Real-time PCR	Контактные	1,2%		[161]
RLEP	Nested PCR	Контактные	6,25%		[203]

Наблюдение за контактными лицами является определяющим фактором в решении проблемы распространения заболевания [82,176]. Для этого необходим быстрый и малоинвазивный метод идентификации M.lerprae для раннего выявления болезни.

Таким образом, ПЦР в лепрологии на современном этапе является методом, позволяющим решить целый ряд диагностических задач.

Во-первых, исследования, прослеживающие связь между присутствием ДНК M.lerprae у контактных лиц с дальнейшим развитием заболевания отсутствуют, поэтому необходима разработка такого метода. Во-вторых, в клинической практике обнаружение M.lerprae с помощью ПЦР у пациентов с отрицательной бактериоскопией и/или гистопатологией будет иметь большое значение при

постановке диагноза. В-третьих, ранняя диагностика будет способствовать предотвращению развития осложнений, которые приводят к инвалидности. В-четвёртых, мониторинг эффективности лечения приведет к индивидуальному подходу к продолжительности антибактериальной терапии. В-пятых, использование ПЦР помогает в дифференциации *M. leprae* от других видов микобактерий.

Для решения этих задач необходимо создание высокочувствительного и высокоспецифичного теста на основе ПЦР, что требует отработки методов экстракции РНК/ДНК из различного клинического материала, выбор подходящей ДНК-мишени и метода достоверной регистрации результатов.

До сих пор нет отечественной тест-системы для обнаружения ДНК *M. leprae* из различных образцов. Поэтому многие исследователи продолжают сообщать результаты, используя свои собственные методы определения чувствительности и специфичности ПЦР, и, в большинстве случаев, эти результаты противоречат друг другу. Таким образом, необходимость разработки отечественных тест-систем для идентификации возбудителя лепры и оценки эффективности терапии на основе ПЦР является актуальной проблемой современной лепрологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика обследованных лиц

Всего обследовано 275 человек как больных лепрой с различными формами заболевания и активностью процесса, так и здоровых доноров, здоровых контактных лиц с больными лепрой и мигрантов (таблица 7). Кроме того, в качестве группы сравнения с больными лепрой, имеющими трофические язвы, была обследована группа больных сахарным диабетом (СД), осложненным трофическими язвами.

Таблица 7 – Численный состав исследуемых групп

№	Группа	Численность	Количество образцов
1	Больные лепрой	87	203
2	Контактные по лепре лица	42	42
3	Больные сахарным диабетом	13	13
4	Мигранты	67	67
5	Контрольная группа	66	98
Всего обследовано		275	423

В группах обследованных лиц исследовали следующие клинические образцы: 48 биоптатов кожи, 232 соскоба со слизистой носа, 86 скарификатов с поверхности кожи, 28 соскобов с трофических язв и 29 сывороток крови. Кроме того, у больных с активными проявлениями лепрозного процесса для идентификации *M. leprae* брали биоптаты кожи как непосредственно после взятия биопсии (5), так и из коллекции замороженных биоптатов (43), полученных от больных лепрой в активной стадии болезни, так и в стадии регресса заболевания. Всего исследовано 48 биопсий.

Обследовано 87 больных лепрой, из них 45 (51,7 %) мужчин и 42 (48,3 %) женщины, в возрасте от 46 до 82 лет, с давностью заболевания от 6 до 57 лет, в среднем 31,5 года \pm .

Диагноз лепры устанавливался на основании клинического обследования, бактериоскопического исследования скарификатов кожи и соскобов со слизистой оболочки носа и гистологического биоптатов кожи. Больные находились под диспансерным наблюдением или на стационарном лечении в ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава России (г. Астрахань).

По классификации Ridley-Jopling [164] 55 человек (63,2%) – больные МВ с БИН >2+ с учетом рекомендаций ВОЗ [204]. Среди них лепроматозный тип (LL) встречался у 40 больных, погранично-лепроматозной (BL) – у 18, а пограничный (BB) – у 2 пациентов. Группа больных РВ лепрой (БИН<2) состояла из 32 (36,8%) человек: из них 20 больных полярным (ТТ) и пограничным туберкулоидом (ВТ) и 7 – с недифференцированным типом лепры.

Больные были разделены на 2 группы в зависимости от активности лепрозного процесса. Первую группу составили 68 больных лепрой в стадии регресса: клинические проявления заболевания на коже отсутствовали, при гистологическом исследовании возбудители лепры отсутствовали. У 19 больных с активной стадией заболевания на коже отмечалась очаговая или диффузная инфильтрация с наличием различных элементов: депигментированных или пигментированных пятен, плоских папул, подкожных узлов (лепром) размером от спичечной головки до горошины. В гистологической картине определялись инфильтраты, состоящие из набухших или разрушающихся макрофагов, лимфоцитов, полинуклеарных лейкоцитов, встречались тучные клетки, в цитоплазме макрофагов обнаруживались гомогенные или зернистые формы микобактерий лепры.

Осложнения лепры многообразны и основаны на повреждении *M. leprae* периферических нервов, что приводит к развитию полиневритов, контрактур, мутиляций, остеомиелитов и трофических язв. Для большинства больных были характерны признаки поражения нервных стволов с нарушением болевой, температурной и тактильной чувствительности, утолщением и болезненностью нервных стволов. У 15 больных LL лепрой в стадии регресса на подошвенных поверхностях стоп имелись нейротрофические язвы.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Пробоподготовка и методы экстракции ДНК из исследуемого материала

Биоптат кожи после предварительной местной анестезии получали путем иссечения скальпелем ткани на границе здоровой и пораженной кожи. Затем ножницами или скальпелем мелко нарезали образец и помещали полученный биоптат размером 10-25 мм³ в пробирку, содержащую 0,5 мл транспортной среды. Для выделения ДНК кожный биоптат гомогенизировали, встряхивали на вортексе 1 мин, отбирали надосадочную жидкость и переносили в чистую пробирку.

Для взятия скарификатов кожи скальпелем делали небольшой разрез (глубиной 1-2 мм). Стерильным одноразовым зондом проводили по коже на месте разреза. Зонд переносили в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой, аккуратно перемешивали, извлекали зонд, прижимая к стенке пробирки и отжимая избыток жидкости. Пробирку плотно закрывали, центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость.

Соскоб со слизистой поверхности носа выполняли с помощью стерильных одноразовых зондов. Зонд переносили в пластиковую пробирку и далее, как описано выше.

Соскоб с трофических язв брали стерильными одноразовыми зондами с периферии и из центра язв в отдельные пробирки с транспортной средой. Дальнейшие манипуляции осуществляли аналогично описанным выше.

Крови брали утром натощак. После взятия крови пробирку переворачивали 2-3 раза и затем центрифугировали, отбирали плазму и переносили в пластиковые пробирки типа Эппендорф.

Весь исследуемый материал доставляли в молекулярно-генетическую лабораторию для выделения ДНК.

Экстракцию ДНК проводили различными методами (M1-M8). В связи с тем, что ни один из применяемых наборов не предназначен для выделения ДНК из всего

комплекса исследуемого биологического материала, а именно, соскобы со слизистой носа, скарификаты кожи, биопсии и сыворотки крови, то для сравнительного изучения эффективности различных методов экстракции ДНК M.lergrae часть образцов выделяли параллельно несколькими методами. Экстракций ДНК осуществляли 8 методами 402 образцов от больных лепрой, контактных, мигрантов, больных СД и здоровых лиц.

Метод «М1» – экстракция ДНК данным методом основана на лизисе НК, преципитации и дальнейшей многократной отмывке полученного препарата ДНК («Проба-НК» НПФ «ДНК-технология», Москва); № ФСР 2008/02938. Метод предназначен для выделения ДНК/РНК из периферической крови, слюны, мокроты, молока, мочи, спермы, секрета предстательной железы, ликвора, соскоба с задней стенки глотки, содержимого цервикального канала и уретры, мазков и смывов из полости носа и ротоглотки, материалов от падших и больных животных. Подготовка клинического материала осуществлялась центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин и частичным удалением надосадочной жидкости. При выделении ДНК соблюдали все этапы согласно инструкции, прилагаемой к набору. Препарат НК готовый для проведения ПЦР (ДНК) и ОТ-ПЦР (РНК).

Для проведения реакции обратной транскрипции: маркировали необходимое количество пробирок объемом 0,5 мл с учетом пробирок «К-». Размораживали содержимое пробирок «ОТ-буфера» и «праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции (ООО «НПФ ДНК-технология», Москва) при комнатной температуре, затем встряхивали пробирки на вортексе в течение 3-5сек и центрифугировали. В отдельной пробирке готовили ОТ-смесь путем смешивания 2,0 x (N+1) мкл «ОТ-буфера», 1,0x(N+1) мкл «Праймеров ОТ-RANDOM+дНТФ» и 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы, где (N+1) – количество анализируемых на наличие РНК образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец. Далее по 3,5 мкл ОТ-смеси вносили в промаркированные пробирки и переносили их в рабочую зону, предназначенную для выделения РНК; где в пробирки добавляли по 16,5 мкл образца РНК, встряхивали и центрифугировали

несколько секунд. Затем пробирки помещали в термостат на 30 мин при температуре 40°C и 5 мин – 95°C и осаждали конденсат при 13000 об/мин 30 сек.

Метод «М2» – «Проба ГС» (НПФ «ДНК-технология», Москва); № ФСР 2010/08696. С помощью данного комплекта реагентов возможно выделять ДНК из мокроты, сыворотки и плазмы крови, слюны, молочной сыворотки, урогенитальных мазков. При использовании этого метода происходит лизис клеток гуанидина тиоционата (GuSCN) и адсорбции на ДНК-носителе. Метод довольно удобен в использовании и технологичен, но имеет и ряд недостатков: потеря ДНК из-за многочисленных отмывок и необратимой адсорбции на ДНК-носителе; ингибирование ПЦР из-за следовых количеств GuSCN; многоэтапность и большое количество реактивов в наборе для выделения, что может способствовать перекрестной контаминации в пробирках. Все это приводит к ложноотрицательным результатам при изначально небольшой концентрации ДНК. Таким образом, данный метод требует тщательного соблюдения всех этапов. Экстракцию ДНК выполняли согласно, прилагаемой к набору инструкции.

Метод «М3» – выделение ДНК набором "ДНК-сорб-С" (ООО «Интерлабсервис», ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Комплект реагентов предназначен для выделения: тотальной ДНК из микробиоптатов кожи и слизистых оболочек (мочеполовой системы, ЖКТ, бронхов) и паренхиматозных органов (пунктаты печени, селезенки), а также из гомогенизированных тканей. Принцип метода основан на лизисе НК лизирующим буфером с дальнейшей сорбцией на универсальном сорбенте, промывками и элюцией ДНК в ТЕ-буфере. Выделение ДНК проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Метод «М4» - метод основан на использовании набора реагентов (GXT DNA/RNA GenoExtraction Kit, «HainLifescience», Германия) и прибора GenoXtract, который позволяет в автоматическом режиме выделять НК из клинических образцов различного происхождения. Для выделения НК могут быть использованы: легочные и внелегочные образцы, стул, кровь, моча, сыворотка, бронхоальвеолярный лаваж, культуры. 700 мкл образца помещали в пробирку объемом 2 мл с закручивающейся крышкой. Пробирки и картриджи устанавливали

в прибор и запускали программу. Встроенный термоблок нагревает образцы до 100° С, гарантируя элюирование НК.

Метод «М5» – выделение ДНК набором реагентов «GenoLyse» («HainLifescience», Германия), принцип которого заключается в осаждении клеток с последующим лизисом в щелочной среде при повышенной температуре и нейтрализацией осадка. Набор реагентов предназначен для выделения бактериальной ДНК из клинического образца или культуры. Вся процедура состоит из трёх этапов: осаждение клеток для удаления жидкости из образца, лизис клеток в щелочной среде при повышенной температуре и нейтрализация. Метод можно использовать и при выделении ДНК из сухого мазка, но лучше всего этот метод применять при использовании жидкой или плотной культуры, т.е. при работе с культивируемыми патогенами. Мы применили этот метод для выделения ДНК некультивируемой микобактерии лепры. Экстракцию ДНК производили согласно прилагаемой к набору инструкции.

Метод «М6» – выделение ДНК с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА). Этапы выделения: к 100 мкл исследуемого образца добавляли 100 мкл физиологического раствора и 40 мкл 5% раствора БСА, пробирка встряхивается, образец отстаивается в течение 2-5 мин и затем инкубируется при температуре 95°С 1 мин и охлаждается 1 мин при температуре -20° С. Эту процедуру повторяли 4 раза, после чего образец термостатировали 20 мин при 95° С и центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин. Метод удобен и прост в выполнении и дает достаточный выход ДНК, пригодной для амплификации.

Метод «М7» – выделение ДНК с использованием протеиназы К. При анализе данных зарубежной литературы по созданию подобных тест-систем было установлено, что наиболее часто выделение ДНК *M.leprae* проводилось с использованием протеиназы К. Нами также был применен данный вариант экстракции ДНК. Для этого был модифицирован метод выделения ДНК из ядерных клеток периферической крови (НПФ «ДНК-технология», Москва): отбирали 200 мкл предварительно гомогенизированного биоптата в пробирку типа «Эппендорф», добавляли 500 мкл лизирующего буфера, центрифугировали и

удаляли надосадочную жидкость. Повторяли эту процедуру до 5 раз до осветления осадка. Далее добавляли буфер и протеиназу К, инкубировали при температуре 55° С – 60 мин и 95° С – 10 мин, центрифугировали несколько секунд.

Метод «М8» – модифицированный метод «Пробы-НК», который направлен на выделение РНК из биологического материала. При экстракции данным методом выполняли следующие этапы: инкубировали исследуемый материал 2-3 часа при температуре 21° С; инкубировали при 65° С – 10 мин, центрифугировали и вносили в пробирки сначала 400 мкл фенола, а затем 160 мкл смеси из изоамилового спирта и хлороформа, перемешивали 3-5 сек и центрифугировали при 13000об/мин 10 мин; отбирали верхнюю фракцию в новую пробирку вместимостью 1,5 мл. Далее выделение выполняли согласно методу «М1».

При всех методах экстракции очищенную ДНК хранили при температуре 2-8°С не более 7 суток или же при температуре -20° С в течение 1 года. Независимо от метода экстракции 5 мкл выделенной ДНК отбирали на дальнейшую постановку в ПЦР.

В каждой постановке, помимо пробирок с исследуемыми образцами, ставились 3 пробирки для проверки этапов пробоподготовки и постановки ПЦР: 1 пробирка – отрицательный контрольный образец (ОКО), прошедший все этапы пробоподготовки; 2 – отрицательный контроль «К-», в который добавлялось 5мкл стерильного физиологического раствора; 3 – положительный контроль «К+» – 5мкл положительного контрольного образца.

2.2.2. Полимеразная цепная реакция. Амплификация выделенной ДНК

ПЦР проводили на термоциклерах «Терцик» с дальнейшим электрофорезом и в RT на амплификаторе «ДТ-96» («НПФ-ДНК-Технология», Россия). В зависимости от выбранных праймеров применяли от 30 до 50 циклов амплификации. Реакционная смесь состояла из следующего: 35 мкл PNM, 5 мкл 10-кратного полимеразного буфера для инкубации, 25 мМ раствора MgCl₂, 0,2 мкл HotStartTag ДНК полимеразы, 3 мкл воды, 5 мкл выделенной ДНК.

При проведении электрофореза в каждую из слунок 3% агарозного геля под буфер отдельным наконечником вносят по 5 мкл окрашенного амплификата. Электрофорез осуществляли при напряжении 200-250V. Время электрофореза: после окончания I этапа – 10 минут, после окончания II этапа – 20 минут. После проведения электрофореза гель просматривали на трансиллюминаторе в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Окрашивание геля проводили бромистым этидием. Продукт амплификации виден в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета. В качестве маркера длин использовали перевар плазмиды pUC19 рестриктазой Msp I.

С целью проверки чувствительности и специфичности разрабатываемой нами тест-системы для детекции возбудителя лепры все образцы идентифицировались с применением набора «GenoType Leprae DR» («HainLifescience», Германия), с помощью которого возможно обнаружить *M. leprae* (201 п.н.) и ее резистентность к офлоксацину (*gyrA* 132 п.н.), рифампицину (ген *rpoB* 142 п.н.) и дапсону (*folP1* 104 п.н.). Кроме того, для идентификации возможной сопутствующей микобактериальной флоры образцы тестировались набором GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteria)» («HainLifescience», Германия) на 14 видов микобактерий: *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. avium* ssp., *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. interjectum*, *M. gordonae*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. peregrinum* и комплекс *M. tuberculosis*; и набором «GenoType Mycobacterium AS» («HainLifescience», Германия) на 16 редких видов микобактерий: *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. gastris*, *M. celatum*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. kansasii*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. lentiflavum*, *M. phlei*, *M. heckeshornense*.

Все 3 набора основаны на DNA-STRIP технологии: на первом этапе проводится амплификация выделенных микобактерий методом ПЦР, а затем дальнейшая гибридизация с использованием стрипов.

Амплификационная смесь для всех наборов (45мкл) содержала: 35 мкл PNM (смесь праймеров/нуклеотидов), 5 мкл ПЦР-буфера, 25 мМ раствора $MgCl_2$, 5 мкл выделенной ДНК, 3 мкл воды, 0,2 мкл ДНК-полимеразы.

Режим амплификации для праймеров «GenoType Leprae DR», «GenoType Mycobacterium CM» и «GenoType Mycobacterium AS» («HainLifescience», Германия):

- | | | | |
|----|--------|--------|-----------|
| 1. | 95°C - | 15 мин | 1 цикл |
| 2. | 95°C - | 30 сек | 10 циклов |
| | 58°C - | 2 мин | |
| 3. | 95°C - | 25 сек | 20 циклов |
| | 53°C - | 40 сек | |
| | 70°C - | 40 сек | |
| 4. | 70°C - | 8 мин | 1 цикл |

Затем с продуктами амплификации осуществляли постановку гибридизации на автоматическом инкубаторе «GT-Blot-48» («HainLifescience», Германия). Стрипы располагали в 2-луночных ванночках, которые устанавливали на платформе прибора. Ванночки фиксировали на специальной нагревательной поверхности, которая позволяет создать равномерную температуру во всех лунках и контролировать ее во время процесса гибридизации. Специальный подвижный манипулятор раскапывает в лунки реагенты и затем их удаляет при прохождении вдоль ванночки.

Также гибридизацию выполняли вручную на термошейкера «TwinCubator» («HainLifescience», Германия), разработанного для тест-систем «HainLifescience», при которой использовали денатурирующий раствор. В каждую пробирку, содержащую продукт амплификации, добавляли по 1 мл гибридизационного буфера, аккуратно покачивали ванночку до получения однородного окрашивания; помещали стрипы в ячейки; инкубировали ванночку на «TwinCubator» 30 мин при температуре 45°C; полностью аспирировали гибридизационный буфер, добавляли 1 мл раствора для жесткой промывки в каждый стрип и инкубировали 15 мин при 45°C; полностью удаляли раствор для жесткой промывки; отмывали каждый стрип

в 1 мл промывочного раствора в течение 1 мин на платформе термошейкера при комнатной температуре; добавляли по 1 мл разведенного конъюгата и инкубировали на платформе термошейкера 30 мин; удаляли раствор и промывали дважды в 1 мл промывочного раствора по 1 мин и один раз в 1 мл дистиллированной воды; добавляли 1 мл разведенного субстрата в каждый стрип и инкубировали без встряхивания, защищая от света. Как только полоски становились четкими, останавливали реакцию с помощью дистиллированной воды и удаляли стрип-полоски из лунок.

Чтение результатов происходило в автоматизированном сканирующем приборе «GenoScan» («HainLifescience», Германия), либо визуально с использованием шаблонов, прилагаемых к наборам. Данный шаблон должен совпадать с полосками стрипов СС (контроль конъюгата) и УС (универсальный контроль).

Для статистической обработки полученных результатов использовалась программа «STATISTICA 8». Для определения достоверности различий при сравнении двух независимых выборок использовали критерий Манна-Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. При анализе связей внутри групп применялся линейный парный коэффициент ассоциации Пирсона (r_a). Кроме того, осуществляли подсчет чувствительности и специфичности разработанных тест-систем.

ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

3.1. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных от больных лепрой

В настоящее время базовым лабораторным тестом для диагностики лепры остается бактериоскопия. В качестве материала для исследования берется соскоб со слизистой носа. Препараты окрашиваются по методу Циль-Нильсена, при использовании которого для постановки диагноза лепры недостаточна детекция одной или двух КУМ. Это связано с морфологической схожестью *M. leprae* и других микобактерий (*M. tuberculosis*, *M. ulcerans* и др.). В таких ситуациях необходимо провести неоднократное взятие материала для исследования. При этом нужно обращать внимание на присущие для *M. leprae* внутриклеточное расположение в макрофагах и тенденцию к группированию. Все это представляет определенные трудности, особенно в случаях ранней диагностики лепры или при РВ лепре.

В целях стандартизации и объективизации результатов вычисляют так называемый БИН, для чего требуется подсчет количества микобактерий в 100 полях зрения.

В связи с поставленной целью и задачами исследования для разработки отечественной тест-системы на основе ПЦР для идентификации возбудителя лепры необходимо было на первом этапе отработать различные методы экстракции ДНК *M. leprae* в зависимости от места взятия биологического образца: биопсии и скарификаты кожи, соскобы со слизистой поверхности носа и с трофических язв, сыворотки крови. Для проверки чувствительности методов экстракции М1-М8, а также в дальнейшем для использования как референсной тест-системы был использован набор «GenoType Leprae DR» («HainLifescience», Германия). Кроме того, с помощью наборов «GenoType Mycobacterium CM» и «GenoType Mycobacterium AS» («HainLifescience», Германия) проведена идентификация и дифференциация возможной сопутствующей микобактериальной флоры в поражениях у больных лепрой.

3.1.1. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных с кожи больных лепрой

Поскольку возбудитель лепры не культивируется на искусственных питательных средах, *M. leprae* могут быть обнаружены только путем прямого микроскопического подсчета. Однако этот метод имеет свои серьезные ограничения, так как не позволяет четко дифференцировать *M. leprae* от других кислотоустойчивых бактерий. И чувствительность этого метода составляет 10^4 и более бактерий/мл, что затрудняет диагностику лепры в инкубационном периоде заболевания, у больных с реверсивной реакцией, получающих противолепрозные препараты и при РВ. И только с внедрением молекулярно-генетических методов идентификации возбудителей заболеваний появилась возможность дифференцировать различные виды микобактерий, которые могут персистировать на коже и слизистых оболочках человека.

Род *Mycobacterium* включает в себя как безусловно патогенные для человека микобактерии, так и множество условно-патогенных. Так как в патогенезе лепры нарушение клеточного иммунитета основополагающее, поэтому возможно, что, помимо *M. leprae*, на коже у больных лепрой персистируют и другие микобактерии.

Известно, что легко обнаруживаются микобактерии морфологически в кожных биоптатах и нервах больных только МВ. При РВ и у некоторых больных, находящихся на лечении или в стадии реверсивной реакции, микобактерии выявить очень трудно.

Для идентификация микобактерий из кожных биоптатов все образцы выделялись методами М1-М8, с наибольшей эффективностью методами М1, М3, М6, М7 и М8. Из всех биоптатов кожи у больных лепрой при использовании праймеров «GenoType LepraeDR» ДНК *M. leprae* обнаруживалась в 66,7% случаев, тогда как бактериоскопически в 52,5%. В остальных биоптатах ни стандартными, ни молекулярно-генетическими методами *M. leprae* не выявлялась. Ни в одной из биопсий не был обнаружен резистентный к противолепрозным препаратам штамм микобактерии лепры.

При использовании праймеров «GenoType Mycobacterium CM» в 4 случаях в биопсиях (19,1%) обнаруживались *M.malmoense* и у одного больного лепрой (4,8%) *M.avium*. Нужно отметить, что во всех случаях, где в биопсиях с помощью праймеров «GenoType Leprae DR» идентифицировались *M.leprae*, при исследовании этих образцов в наборе «GenoType Mycobacterium CM» выявлялись *Mycobacterium species*. Это предопределило дальнейшее изучение данных образцов с использованием праймеров «GenoType Mycobacterium AS» для поиска других 16 редко встречающихся видов микобактерий.

Проведение амплификации образцов с праймерами «GenoType Mycobacterium AS» выявило только наличие бактерий с высоким содержанием гуанина и цитозина, не один из идентифицируемых видов микобактерий не обнаруживался.

При исследовании биопсий, полученных от лиц, обследуемых на лепру, праймерами «GenoType LepraeDR», «GenoType Mycobacterium CM» и «GenoType Mycobacterium AS» *M.leprae* и другие виды микобактерий, определяемые данными наборами, не идентифицировались.

Таким образом, в биоптатах от больных лепрой, помимо *M.leprae*, обнаруживаются и другие виды микобактерий, в частности, *M.malmoense* и *M.avium*.

Для установления наиболее эффективного метода выделения ДНК из скарификатов кожи исследовали скарификаты от больных лепрой (48) и здоровых лиц (32). Нужно отметить, что для выделения ДНК с кожных скарификатов до этого ни один из данных методов не использовался. Часть образцов выделяли параллельно несколькими методами.

Было установлено, что в скарификатах кожи микобактерии выявлялись только при выделении ДНК методами М1, М2, и М6.

В скарификатах кожи от больных лепрой при использовании праймеров «GenoType LepraeDR» *M.leprae* обнаружили у 2 больных (4,2%), в то время как методом бактериоскопии не удалось идентифицировать в этих образцах возбудителя лепры. В 1 (2,1%) случае, где бактериоскопически выявлялись

единичные гомогенизированные *M. leprae*, в ПЦР результаты были отрицательные. В образцах, полученных от здоровых лиц, микобактерии лепры не обнаруживались ни стандартными методами, ни в ПЦР.

При исследовании образцов с использованием праймеров «GenoType *Mycobacterium CM*» в одном скарификате была идентифицирована *M. malmoense*. Нужно отметить, что у этой же больной *M. malmoense* была обнаружена и в биоптате кожи. У другого больного в скарификате с кожи была идентифицирована *M. avium*.

При использовании набора «GenoType *Mycobacterium AS*» микобактерии, определяемые набором, не идентифицировались. В 2 случаях (4,2%) обнаруживались бактерии с высоким содержанием гуанина и цитозина.

При использовании праймеров «GenoType *Mycobacterium CM*» и «GenoType *Mycobacterium AS*» в кожных скарификатах от здоровых и контактных лиц микобактерии, определяемые наборами, не идентифицировались.

Таким образом, установлено, что у больных лепрой в скарификатах кожи методом ПЦР микобактерии лепры выявлялись чаще, чем при бактериоскопии. В некоторых случаях на коже больных обнаруживаются и такие микобактерии, как *M. malmoense* и *M. avium*.

3.1.2. Идентификация микробиоты содержимого трофических язв больных лепрой и сахарным диабетом.

Инвалидизирующие последствия лепрозного процесса все еще остаются серьезной проблемой в мировой лепрологии, даже несмотря на успехи МДТ. В первую очередь к таким последствиям относятся прогрессирующие необратимые нейротрофические осложнения, в частности, трофические язвы, возникающие иногда даже спустя время после отмены МДТ. Для предотвращения развития осложнений необходим правильный подбор препаратов на основе определения резистентности штаммов *M. leprae* к антибактериальным препаратам. Также необходимо определение микрофлоры в уже сформировавшихся язвах, что

особенно актуально при рецидивирующих язвах. Причем требуется разработка тестов для идентификации не только *M. leprae*, но и других микобактерий, которые вероятнее всего персистируют у больных лепрой из-за сниженного иммунитета. На сегодняшний день такие исследования не проводились, несмотря на то, что именно они будут способствовать предупреждению развития нейротрофических осложнений и поиску новых подходов их лечения. Благодаря молекулярно-генетическим методам появилась возможность разработки высокочувствительного и специфичного метода для детекции микроорганизмов в содержимом трофических язв.

Было проведено исследование содержимого трофических язв от 15 больных с LL лепрой, находящихся в стадии регресса, для детекции микобактерий. Все методы экстракции ДНК (М1-М8) оказались достаточно эффективными, но наибольшая чувствительность была при использовании метода М6, при котором идентифицировались несколько видов микобактерий, тогда как другими методами исключительно один вид. Таким образом, отечественный набор для выделения ДНК (М6) оказался эффективнее импортных аналогов.

При использовании праймеров «GenoType *Leprae* DR» в 3 случаях (20%) детектированы *M. leprae*. У двух больных (13,3%) выявлялся «дикий» штамм *M. leprae* с чувствительностью к дапсону, рифампицину и офлоксацину. У другого пациента (6,7%) с вялотекущей и плохо поддающейся лечению трофической язвой обнаружен «мутантный» вид *M. leprae*, резистентный к MDT.

В 46,7% трофических язв идентифицированы различные виды микобактерий при применении комплекта реагентов «GenoType *Mycobacterium* CM». Причем наиболее часто (40,0%) детектировалась *M. scrofulaceum* и в 26,7% случаях *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. avium*. Реже встречались другие микобактерии: *M. kansasii* (20,0%), *M. xenopi* (13,3%).

При использовании праймеров «GenoType *Mycobacterium* AS» микобактерии, определяемые набором, не идентифицировались.

При культуральном исследовании содержимого язв от больных лепрой отмечался рост: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*.

Трофические язвы у больных лепрой схожи с язвами, развивающимися при СД, поэтому для сравнения взята группа из 13 больных СД с трофическими язвами на подошвенной поверхности стоп, аналогичными язвам у больных лепрой. Больные лепрой и СД были сопоставлены по возрасту и полу.

У больных СД в соскобах с трофических язв в 4 (30,7%) случаях определялись 5 штаммов микобактерий, из которых у 15,4% больных детектировались *M.kansasii* и *M.scrofulaceum* и по одному случаю определялись *M.fortuitum*, *M.avium* и *M.malmoense*.

Сравнительный анализ микобактериальной флоры, выделенной из содержимого трофических язв у больных лепрой и СД, представлен в таблице 9.

Таблица 9 – Идентификация микобактерий в язвах у больных лепрой и СД

Вид микобактерий	Больные лепрой	Больные СД
<i>M.leprae</i>	20%	-
<i>M.scrofulaceum</i>	40%	15,4%
<i>M.kansasii</i>	20%	15,4%
<i>M.avium</i>	26,7%	7,7%
<i>M.malmoense</i>	-	7,7%
<i>M.fortuitum</i>	26,7%	7,7%
<i>M.abscessus</i>	26,7%	-
<i>M.xenopi</i>	13.3%	-

При использовании комплекта реагентов «GenoType Leprae DR» *M.leprae* у больных СД не выявлялись ни в одном из образцов.

При исследовании с использованием праймеров «GenoType Mycobacterium AS» у больных СД ни один штамм микобактерий не выявлялся. В 25% случаев выявлены бактерии с высоким содержанием гуанина и цитозина.

Таким образом, как у больных лепрой, так и СД идентифицировались различные нетуберкулезные микобактерии. Однако частота встречаемости микобактерий в содержимом трофических язв у больных лепрой значительно выше, чем у больных СД. Кроме того, у 20,0% больных лепрой в язвах обнаруживалась *M. leprae*.

3.1.3. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий в соскобах со слизистой поверхности носа

Для понимания патогенеза лепры необходимо прослеживание связи между наличием *M. leprae* в слизистой полости носа и дальнейшим развитием заболевания или переходом в субклиническую форму у лиц, проживающих в эндемичных и неэндемичных регионах [22, 71].

Поэтому в качестве материала для исследования были взяты соскобы со слизистой носа от контактных с больными лепрой лиц. Для отработки методов выделения ДНК со слизистой носа апробированы все методы. Установлено, что наиболее чувствительными являются методы М1, М2, М5 и М6.

Наименее дорогим и несложным в исполнении является метод М6 как по сравнению с методом М5, так и с М2, и приближается по эффективности к методу М1. При экстракции методами М1 и М6 *M. leprae* идентифицировалась у 6 больных (9,5%), методом М2 - у 3 (4,7%), а методом М5 у одного больного (1,6%).

При использовании наборов «GenoType *Mycobacterium* CM» и «GenoType *Mycobacterium* AS» ни один из определяемых данными наборами видов микобактерий не выявлялся.

В 3 случаях (7,5%) ДНК *M. leprae* обнаруживалась у контактных лиц в соскобах со слизистой носа. Причем при проведении стандартных бактериоскопических методов *M. leprae* не детектировалась ни в одном образце, полученном как от больных лепрой, так и контактных с ними лиц.

В соскобах со слизистой поверхности носа от здоровых лиц микобактерии не выявлены.

Таким образом, при обнаружении *M. leprae* в слизистой поверхности носа молекулярно-генетический метод показал высокую чувствительность по сравнению со стандартным классическим методом бактериоскопии.

На основании проведенного исследования была установлена различная степень эффективности экстракции ДНК в зависимости от типа клинического образца (таблица 10).

Таблица 10 – Сравнительная эффективность методов экстракции ДНК

Биоматериал	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Биоптаты n=21	66,7%	57,1%	66,7%	33,3%	38,1%	66,7%	38,1%	66,7%
Скарификаты n=48	4,2%	4,2%	-	-	-	4,2%	-	-
Соскобы из носа n=63	9,5%	4,7%	-	-	1,6%	9,5%	-	1,6%
Соскобы из язв n=15	13,3%	13,3%	13,3%	-	-	20%	-	-

Таким образом, наиболее эффективными методами при экстракции ДНК *M. leprae* из биоптатов кожи являлись M1, M3, M6 и M8, из скарификатов – M1, M2 и M6, из соскобов со слизистой носа – M1 и M6 и из соскобов язв – M6. Лучшими методами экстракции ДНК практически из всех клинических образцов оказались методы M1 и M6. На основании проведенного исследования установлено, что ПЦР позволяет с большей степенью чувствительности (92,9%) выявлять *M. leprae*, чем стандартные бактериоскопические и гистологические методы. Данные результаты послужили основой для разработки собственной тест-системы.

3.2. Разработка методов лабораторной диагностики лепры с помощью ПЦР

В настоящее время стандартные методы диагностики лепры, включающие бактериоскопические и гистологические исследования, не всегда позволяют обнаружить *M. leprae*, особенно на ранних стадиях заболевания. Многие из методов, используемых в диагностике других микобактериальных инфекций, недоступны при лепре [7], что связано с невозможностью культивирования *M. leprae* на искусственных питательных средах и с тем, что единственным признанным природным резервуаром являются девятипоясные броненосцы (*Dasyurus novemcinctus*) [8,9], обитающие в Южной Америке.

Сложность диагностики лепры вызывает потребность в методе, превосходящем стандартные методы по эффективности. К такому методу можно отнести ПЦР, позволяющий обнаружить единичные молекулы ДНК возбудителей в образце. Для высокочувствительного и высокоспецифичного ПЦР-теста необходим правильный выбор мишени для амплификации.

Используя данные литературы, были подобраны и апробированы праймеры к различным ДНК-мишеням *M. leprae* и на их основе разработаны тест-системы для идентификации возбудителя лепры и контроля за эффективностью проводимой терапии.

3.2.1. Разработка метода идентификации возбудителя лепры с использованием праймеров к 16S рРНК.

При разработке тест-системы необходимо было отработать методы пробоподготовки, экстракции ДНК из различного клинического материала, сконструировать систему олигонуклеотидов для идентификации *M. leprae*, подобрать режимы амплификации ДНК и апробировать чувствительность и специфичность тест-системы.

Для оценки чувствительности и специфичности разрабатываемой тест-системы использовали ДНК из клеток различных видов микобактерий: *M. intracellulare*, *M. Кедровского* (белый штам), *M. avium*, *M. vaccae*, *M. clegg*, *M. duvalli*, *M. kansasii*, *M. phlei*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gastri*, *M. gordona*, *M. lufu*, *M. Кедровского* (розовый штамм), *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis*.

Кроме того, тест-система была апробирована на клиническом материале от 32 больных лепрой и 15 здоровых лиц, находящихся в семейном контакте с больными лепрой. Для проведения бактериоскопического и молекулярно-генетического исследований использовали биоптаты кожи (18), соскобы со слизистой поверхности носа (32), скарификаты кожи (54), соскобы с трофических язв (15) и сыворотки крови (29). Одновременно одни и те же образцы исследовали различными методами. У больных лепрой диагноз подтверждён клинически, бактериоскопически и гистологически.

Выделение ДНК проводили всеми методами экстракции, описанными выше (гл. материалы и методы). Процедура пробоподготовки и метода экстракции зависела от вида исследуемого образца.

Подбор олигонуклеотидных последовательностей 16S рРНК осуществляли с помощью баз данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), а также с использованием данных литературы [132,174]. Праймеры для ПЦР были подобраны с учётом GC состава матрицы, расчётной температуры гибридизации, наличия гомологичных участков последовательностей ДНК у других организмов. Для подбора праймеров и олигонуклеотидных проб использовано программное обеспечение Oligo 6.0.

Реакционная смесь объемом 35 мкл содержала 5 мкл выделенной ДНК, 10 пмоль праймеров; 1,1 мкмоль dNTP; 25 мкмоль $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 64 мкмоль TRIS-HCl; 2,5 мкмоль MgCl_2 и 5 единиц полимеразы. Для осуществления "горячего старта" и предотвращения неспецифического отжига праймеров применяли парафиновую прослойку, разделяющую компоненты реакционной смеси.

Отработанный режим амплификации: 1 цикл 80°C – 30 сек и 94°C – 90 сек; 5 циклов 94°C – 30 сек и 64°C – 15 сек; 45 циклов 94°C – 10 сек и 64°C – 15 сек; 10°C – хранение. Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклере «Терцик» (ООО

«НПО ДНК-Технология, Россия) для дальнейшей постановки в электрофорезе в агарозном геле. Учёт реакции проводился в трансиллюминаторе.

Для определения таксономической специфичности тест-системы на основе ПЦР для идентификации возбудителя лепры использовали ДНК различных видов микроорганизмов (см. выше), ДНК от больных лепрой и экспериментальных животных (модель С.С.Shepard). В результате проведения ПЦР и последующего электрофореза был зафиксирован синтез ампликона размером 290 п.н. только при наличии *M. leprae* (рис.1).

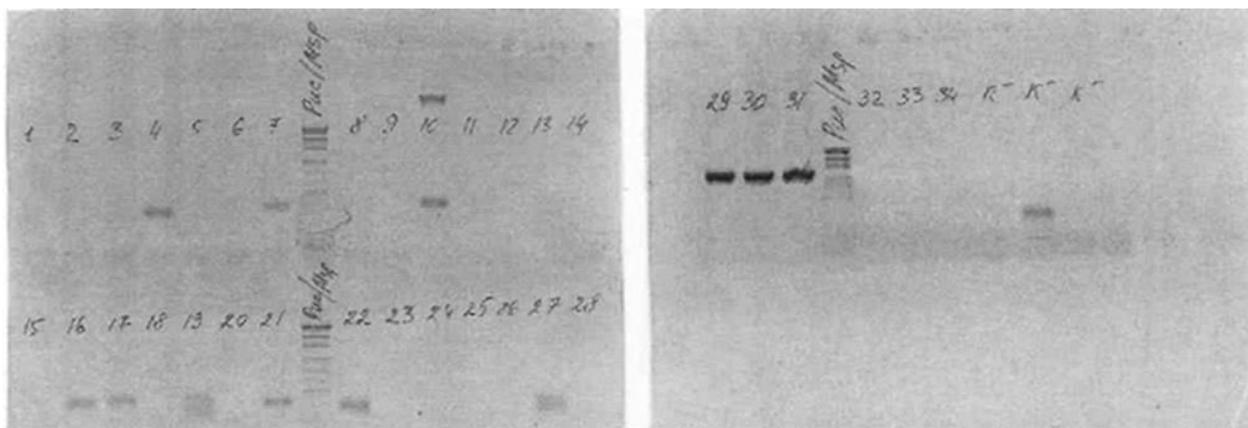


Рис.1. Электрофореграмма продуктов ПЦР хромосомной ДНК микобактерий различных штаммов.

Примечание: 1-14, 17, 20, 32-34 – различные виды микобактерий; 15, 16,18, 21-28 – материалы от пассажных животных; 29-31 – биоптаты кожи от больных лепрой

На рисунке 2 представлены результаты анализа ДНК, полученной из различных биологических образцов от больных лепрой. Во всех случаях результаты ПЦР-анализа с сконструированными праймерами к 16S рРНК совпали со стандартными бактериоскопическими и гистологическими методами исследования.

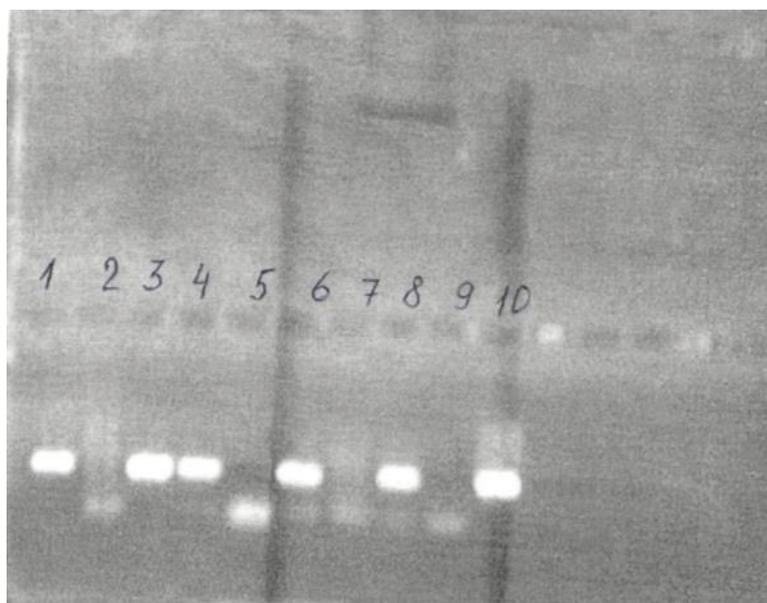


Рис.2. Электрофореграмма продуктов ПЦР хромосомной ДНК *M. leprae* из различных образцов от больных лепрой

Примечание: 1, 5 – отделяемое из трофических язв; 2, 7 – сыворотки крови; 3 – суспензия из лепромы; 4, 8 – соскоб со слизистой носа; 6 – скарификат кожи; 9 – отрицательный контроль; 10 – положительный контроль.

Для определения степени чувствительности ПЦР на 16S рРНК использовали серию разведений (рис.3)

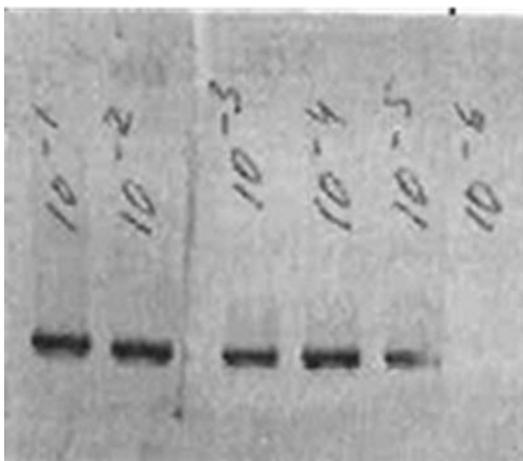


Рис.3. Электрофореграмма продуктов ПЦР при определении степени чувствительности тест-системы для идентификации *M. leprae*.

Примечание: 1 – разведение 10^{-1} кл/мл; 2 – разведение 10^{-2} кл/мл; 3 – разведение 10^{-3} кл/мл; 4 – разведение 10^{-4} кл/мл; 5 – разведение 10^{-5} кл/мл; 6 – разведение 10^{-6} кл/мл.

После установления высокой степени чувствительности и специфичности данных праймеров была разработана последовательность флуоресцентных зондов для создания тест-системы в Real time.

Праймеры и олигонуклеотидные флуоресцентномеченые зонды (таблица 11) синтезировали на синтезаторах ASM-102 и ASM-800 (Новосибирск, Россия). Гасители флуоресценции (BHQ1) и флуорофоры (FAM, HEX) синтезировали в лаборатории Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Таблица 11 – Характеристика праймеров, зонда и размера ампликона для детекции *M. leprae*

Праймер	Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов	Размер продукта ПЦР, п.н.
16s-U	5'- CGA ACG GAA AGG TCT CTA AA -3'	290
16s-U	5'- GTC GAA CGG AAA GGT CTC TAA A -3'	
16s-P	(FAM)- 5'- CTT CAA GGC GCA TGT CTT GTG GTG GAA -3'-(BHQ1)	

Для очистки олигонуклеотидов использовали метод жидкостной хроматографии с применением обращеннофазных колонок Диасфер-110-C18 (Россия). Контроль чистоты полученных олигонуклеотидов осуществляли методом аналитического вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле.

При ПЦР в RT амплификация и детекция ДНК проходили в амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с тем же режимом амплификации, что указан выше. Детекцию флуоресценции проводили при 64°C.

Для контроля за ходом ПЦР вводили систему внутреннего контроля - ВК (клонированный фрагмент гена рецептора фактора роста человека, пара праймеров и олигонуклеотидный зонд, комплементарные ему). Критерием пригодности системы ВК служило отсутствие ингибирования специфической реакции, при этом ВК должен работать в случае отсутствия специфической реакции.

Клиническое апробирование тест-системы для выявления *M. leprae* методом ПЦР в RT проведено у больных лепрой и здоровых лиц, находящихся в семейном контакте с больными лепрой. Чувствительность метода зависела от характера образца клинического материала (таблица 12).

Таблица 12 – Частота выявления *M. leprae* различными методами идентификации

Клинический материал	Число исследуемых образцов		Бактериоскопия		ПЦР Real time на 16S рPHK	
			абс.	%	абс.	%
Скарификаты кожи	54	+	32	59,3	36	66,7
		-	22	40,7	18	33,3
Биоптаты кожи	18	+	16	88,9	18	100
		-	2	11,1	0	0
Соскобы со слизистой носа	32	+	20	62,5	22	68,8
		-	12	37,5	10	31,2
Соскобы с язв	15	+	0	0	3	20,0
		-	15	100	12	80,0
Пробы сыворотки крови	29	+	0	0	0	0
		-	29	100	29	100
Всего	148	+	68	45,9	79	53,4
		-	80	54,1	69	46,6

Чувствительность бактериоскопического метода составила 88,9%. Самая высокая частота обнаружения ДНК *M. leprae* отмечалась в биоптатах кожи от больных лепрой, с наибольшей эффективностью выделения ДНК методами М1 и М2. При выделении ДНК методом М1 *M. leprae* идентифицировалась во всех 18 (100%) биоптатах кожи, методом М2 – в 17 (94,4%), при этом результаты бактериоскопии были положительны в 16 (88,9%) образцах. Таким образом, методом ПЦР *M. leprae* обнаруживалась в биоптатах кожи даже в бактериоскопически негативных образцах: методом М1 – в 2 (11,1%) случаях, а методом М2 – в 1 (5,5%).

При исследовании 32 соскобов со слизистой поверхности носа *M. leprae* также идентифицировалась чаще при ПЦР-анализе, чем при бактериоскопии. При выделении ДНК методами М1 и М2 в 22 (68,8%) случаях идентифицировалась *M. leprae*, что на 2 (6,3%) случая больше, чем при бактериоскопическом исследовании. Методом М6 *M. leprae* обнаруживалась в 21 (65,6%) случае, в том числе в 1 (3,1%) бактериоскопически негативном образце. В 54 скарификатах кожи от больных лепрой при экстракции методами М1 и М2 ДНК *M. leprae* детектировались в 36 (66,7%) случаях, в отличие от 32 бактериоскопически позитивных образцов. При проведении ПЦР-анализа в соскобах с трофических язв ДНК *M. leprae* обнаруживалась при использовании методов выделения М1 и М2 в 3 (20%) случаях, хотя при бактериоскопии все 15 соскобов были отрицательны.

При выделении ДНК остальными методами *M. leprae* идентифицировалась в соскобах со слизистой поверхности носа, а также в биоптатах и скарификатах кожи только в бактериоскопически положительных образцах. В образцах сывороток крови от больных лепрой при использовании всех методов экстракции ДНК *M. leprae* не выявлялась.

Специфичность теста проверялась на биологических образцах (биоптаты, скарификаты кожи, сыворотка крови, соскобы со слизистой поверхности носа), полученных от здоровых лиц, и составила 100%. Во всех образцах ДНК *M. leprae* не детектировалась, что подтверждалось стандартными методами.

Таким образом, метод ПЦР с применением праймера к 16S рРНК при обнаружении *M. leprae* в различных образцах оказался высокочувствительным (95,2%). Так, во всех случаях идентификации *M. leprae* бактериоскопическим и гистологическим методами результаты ПЦР были положительными (коэффициент ассоциации Пирсона r_a+1).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения сконструированной нами системы праймеров, методики подготовки образцов, параметров протокола экстракции ДНК в зависимости от клинического материала, а также протокола проведения реакции амплификации для детекции *M. leprae* методом ПЦР на 16S рРНК. Предложенная тест-система обладает высокой

чувствительностью и специфичностью и может использоваться для диагностики активно протекающей лепрозной инфекции.

3.2.2. Разработка метода определения жизнеспособности *M. leprae* с помощью ПЦР для оценки эффективности лечения лепры

Важным преимуществом ПЦР по сравнению с другими лабораторными методами является не только возможность идентификации трудно культивируемых и некультивируемых бактерий, но и возможность определения их жизнеспособности, что особенно актуально для оценки эффективности проводимой антимикобактериальной терапии.

Рибосомальные гены микобактерий используются в качестве мишени для определения жизнеспособности. Одним из таких генов является 16S рРНК, который содержит специфические последовательности для каждого вида. Поскольку мРНК быстро деградирует после гибели клетки, то для ее обнаружения и оценки жизнеспособности используют реакцию обратной транскрипции для перевода РНК в ДНК. Поэтому наиболее перспективными тестами для определения жизнеспособных микобактерий лепры являются ПЦР-тесты с ОТ-ПЦР с использованием участка, кодирующего 16S рРНК.

Исходя из вышеизложенного, была поставлена задача разработать метод, позволяющий оценить жизнеспособность микобактерий лепры и, следовательно, эффективность МДТ на основе ОТ-ПЦР, с использованием в качестве праймеров участка, кодирующего 16S рРНК.

Для выделения РНК/ДНК из биоптатов и скарификатов кожи применяли модифицированный метод экстракции ДНК, основанный на лизисе нуклеиновых кислот лизирующим раствором, преципитации, с дальнейшей многократной отмывкой полученного препарата ДНК (метод М8). С учетом того, что в инструкции к набору в качестве биологического материала не указаны кожные биоптаты и скарификаты, пробоподготовку образцов проводили так, как описано в главе 2.

Выделенные 5 мкл ДНК добавляли в амплификационную смесь, содержащую 50 мМ KCl, 6,25 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris HCl (pH8,8), 5 ед/мкл ДНК-полимеразы, смесь dNTP, концентрация каждого нуклеотида 25 мМ, глицерол, Tween 20; 0,5 мкл (10 пкмоль/мкл) каждого праймера, 0,1 мкл (10 пкмоль/мкл) зонда и 13,9 мкл деионизированной воды (общий объём 25 мкл). Количество амплификационной смеси рассчитывали с учётом «К-» (N) и одного образца. Затем вносили в пробирку 20 мкл минерального масла.

Праймеры и флуоресцентные зонды к 16S рРНК *M.leprae* синтезированы в НПК ООО «Синтол» (Россия) и представляют из себя следующие последовательности:

ML16S rRNATaq-F: 5'-GCATGTCTTGTGGTGGAAAGC -3 '

ML16S rRNATaq-R: 5'-CACCCCACCAACAAGCTGAT- 3 '

ML16S rRNATaq probe: (FAM) 5'-CA-(T-LNA)C(C-LNA)-TGC-AC (C-LNA)-GCA- 3 ' (RTQ1).

Использование в предлагаемом способе флуоресцентного зонда позволяет проводить ПЦР в RT и избежать контаминации.

Амплификацию и учет результатов проводили на термоциклере «ДТ-96 Real time» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Отработанный режим амплификации:

1	95°С – 5 мин	1 цикл
	60 °С – 50 сек	
2	95° С – 15 сек	40 циклов
	62° С – 40 сек	
	10° С	Хранение

Для характеристики чувствительности предлагаемой тест-системы проведено сравнительное изучение выявления *M.leprae* с помощью предлагаемого способа и стандартным бактериоскопическим методом. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты обнаружения *M. leprae* (%) в кожных образцах различными методами

		Бактериоскопия		ПЦР Real time	
		абс.	%	абс.	%
Скарификаты кожи (n=54)	+	32	59,3	36	66,7
	-	22	40,7	16	33,3
Биопсии кожи (n=10)	+	9	90	10	100
	-	1	10	0	0

Курс комбинированной специфической терапии больных лепрой в активной стадии заболевания регламентируется Приказом МЗ РФ от 29.12.2012г. №1681. После окончания курса терапии у больных проводят повторные лабораторные исследования. Для изучения возможности использования данной тест-системы в оценке эффективности МДТ были исследованы кожные скарификаты и биоптаты от 6 активных больных лепрой в процессе курса специфической антимикобактериальной терапии (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты обнаружения *M. leprae* (%) в зависимости от сроков лечения

Время проведения	Количество скарификатов	Методы исследования	
		Бактериоскопический	ПЦР с 16S rRNA
До лечения	42	100%	100%
Через 6 мес от начала лечения	42	50%	66,7%

Как видно из данной таблицы в процессе лечения отмечалось снижение БИН и процента положительных образцов как в бактериоскопическом исследовании, так и в ПЦР, что свидетельствует об эффективности проводимой антимикобактериальной терапии. Однако, у некоторых больных *M. leprae* обнаруживаются и после окончания курса лечения, что наиболее наглядно выявляется в ПЦР. Через 6 мес. от начала лечения с помощью ОТ-ПЦР *M. leprae* обнаружены в 66,7% случаев, а при бактериоскопии – в 50%, что достоверно в 1,3

раза чаще ($p < 0,05$), а через 9 мес. в 50% т 33,3%, соответственно, что в 1,5 раза чаще ($p < 0,05$).

В качестве примеров оценки эффективности лечения лепры с помощью разработанной тест-системы приводятся выписки из историй болезни больных лепрой.

Пример 1. Клиническое наблюдение развития заболевания лепрой у больной, имеющей длительный семейный контакт.

Больная Р. 1967 г.р. ИБ №28, жительница г. Астрахани, обратилась в клинику «НИИЛ» в сентябре 2015 г. с подозрением на лепру. Больной себя считает с января 2015 года, когда впервые заметила в области нижней части спины изменения на коже в виде отдельных пятен бледно-красного цвета. В марте 2015 года появилось онемение, покалывание и ощущение ползания «мурашек» в области рук и ног, изменения на коже прогрессировали – увеличилось их количество и размеры, появились пятна на конечностях, животе, изменился цвет элементов – красная окраска стала более насыщенной. В июле 2015 года с вышеописанными жалобами больная обратилась в городскую поликлинику по месту жительства. Была осмотрена врачами-специалистами, однако диагноз лепры установлен не был.

Учитывая отсутствие положительной динамики от проведенного лечения, самостоятельно обратилась в «НИИЛ» в связи с тем, что ее родители были больны лепроматозной лепрой и переведены на амбулаторное лечение еще до ее рождения. Больная была осмотрена врачом-дерматовенерологом и 23.09.2015г. госпитализирована в клиническое отделение «НИИЛ». При поступлении на коже груди и живота имелись поверхностные инфильтраты без четких границ, местами сливающиеся вместе, красноватого цвета. В поясничном отделе инфильтрация красновато-синюшного цвета с переходом на ягодицы. На правой ягодице отмечались лепромы диаметром до 0,3-0,5 см, эластичной консистенции. На кистях и стопах поверхностная инфильтрация красновато-синюшного цвета, сухость и шелушение ладоней и подошв. Разреженность бровей. Неврологический статус: пациентка хорошо дифференцирует разницу между болевой и тактильной чувствительностью. За исключением дистальных отделов, где дифференциация

нарушена: дает путанные ответы при повторении раздражения. На нижних конечностях от колена до стопы участки гипестезии чередуются с участками полной потери чувствительности. На верхних конечностях в области предплечья и кисти участки гипестезии преимущественно на разгибательных поверхностях. На некоторых элементах, характеризующих поражение кожного покрова (область спины, груди, правого предплечья), отмечается гипестезия (снижение болевой чувствительности). Нейротрофических язв нет.

Для обследования и подтверждения диагноза 23.09.2015 г. у пациентки взяты биопсия и скарификаты кожи для проведения бактериоскопического, гистологического исследований и постановки реакции ОТ-ПЦР. Пробоподготовка, экстракция ДНК, проведение реакции ОТ-ПЦР и режимы амплификации проводились так, как описано выше в данной главе.

После проведения ПЦР-исследования во всех пробах у больной обнаружены *M. leprae*. При бактериоскопическом исследовании в соскобе со слизистой поверхности носа микобактерии лепры не обнаружены, а во всех скарификатах кожи обнаружены гомогенные и зернистые микобактерии лепры (БИН=3,67). Заключение патолого – морфологического исследования биоптатов кожи из левом бедра и правой ягодицы: фрагменты кожи с участками атрофии эпидермиса, умеренно выраженный кератоз. В толще дермы и вокруг придатков кожи в большом количестве периваскулярные, периневральные инфильтраты из эпителиоидных лимфоидных клеток и гистиоцитов, образующие гранулемы, отдельные из которых с некрозом в центре. Очаги склероза. При окраске по Цилю-Нильсену в инфильтратах обнаружено большое количество кислотоустойчивых палочковидных микобактерий в виде групп из 5-7 микобактерий.

Кроме того, у больной было проведено серологическое исследование сыворотки крови методом ИФА на наличие антител классов IgM, IgG к специфическому антигену *M. leprae* –DIS-BSA. Было обнаружено значительное превышение оптической плотности (ОП) антител класса IgM - 1,15 при норме $0,20 \pm 0,05$. ОП антител класса IgG составила 0,66 (норма $0,25 \pm 0,05$). Учитывая тот факт, что больная из семьи больных лепрой и у ее матери ранее было проведено

иммуногенетическое исследование и определен HLA-гаплотип, у больной взята кровь для проведения HLA-генотипирования по 14 группам аллелей гена DRB1, 8 аллелям гена DQA1 и 12 аллелям гена DQB1. У больной был установлен такой же, как у матери, гаплотип HLA-DRB1-*15-DQA1-*0102-DQB1-*0602/8, ранее выявленный как маркер предрасположенности к лепре в русской популяции.

Таким образом, применение различных методов исследования как стандартных (бактериоскопического и гистологического), так и молекулярно-генетических (ПЦР с дальнейшей гибридизацией, HLA-генотипирование) и серологических, с учетом данных анамнеза и клинической картины позволило установить диагноз: «Лепра, лепроматозный тип, активная стадия. Сопутствующий диагноз: нейропатия локтевого и срединного нервов с двух сторон с чувствительными нарушениями».

После постановки диагноза больной назначено MDT по схеме ВОЗ. В процессе лечения для оценки его эффективности через 6 и 9 месяцев у больной повторно взяты скарификаты (6 мест) и биопсия кожи с тех же мест, что и до начала лечения и проведены исследования. До лечения во всех 6 скарификатах как методом бактериоскопии, так и методом ОТ-ПЦР обнаруживались микобактерии (таблица 15).

Таблица 15 – Результаты обнаружения *M. leprae* (%) до и в процессе лечения

Время проведения	Количество скарификатов	Методы исследования	
		Бактериоскопический	ПЦР с 16S rRNA
До лечения	6	100%	100%
Через 6 мес от начала лечения	6	50%	66,7%
Через 9 мес от начала лечения	6	33,3%	50%

Как видно из данной таблицы, в некоторых случаях микобактерии лепры обнаруживаются и после окончания курса лечения. Это служит основанием для продолжения специфической терапии. В работах индийских ученых ранее [179]

было показано, что в 3,3% случаев у больных с высоким БИН жизнеспособные *M. leprae* сохраняются и после 12 месяцев лечения.

Через 6 месяцев после начала лечения в скарификатах с левой мочки уха, правого предплечья и наружной поверхности правой ягодицы результаты бактериоскопии и ПЦР были положительными, кроме того, *M. leprae* идентифицировалась с помощью ПЦР и в скарификате с поясничного отдела позвоночника справа. Через 9 месяцев результаты бактериоскопии и ПЦР оставались положительными в скарификатах левой мочки уха, правого предплечья, при ПЦР анализе *M. leprae* идентифицировалась еще и в скарификате с наружной поверхности правой ягодицы. Больной продолжена комбинированная антимикобактериальная терапия.

Как видно из таблицы 15, в процессе лечения отмечается снижение БИН и процента положительных образцов как в бактериоскопическом исследовании, так и в ПЦР, что свидетельствует об эффективности проводимой антимикобактериальной терапии. В то же время обнаружение более высокого процента *M. leprae* с помощью ПЦР анализа во время лечения демонстрирует его более высокую чувствительность. Кроме того, по результатам бактериоскопического исследования невозможно определить жизнеспособность возбудителя, в то время как ОТ-ПЦР анализ на 16S рРНК позволяет детектировать жизнеспособные микобактерии лепры. Для подтверждения жизнеспособности микобактерий лепры использована модель С.С. Shepard [182]. Материалом от больной Р-вой (биоптат) были заражены 20 мышей линии СВА дозированным количеством *M. leprae* (10^4 на мышь). Через 12 месяцев после заражения макроскопических изменений в лапах не отмечается. При ПЦР анализе на 16S рРНК *M. leprae* обнаружены, а при микроскопическом исследовании у всех животных отмечалось размножение *M. leprae*, что подтверждалось увеличением их числа в месте инокуляции больше, чем на порядок по сравнению с введенным количеством. Таким образом, обнаружение жизнеспособных *M. leprae* с помощью общепринятого в лепрологии метода С.С. Shepard с использованием заражения экспериментальных животных предусматривает длительные сроки исследования –

до 12 и более месяцев, в то время как с помощью ОТ-ПЦР анализа возможно детектирование жизнеспособных микобактерий лепры в кратчайшие сроки.

Полученные результаты подтверждают, что предлагаемый способ идентификации микобактерий лепры можно использовать для контроля эффективности лечения лепры на основе оценки жизнеспособности *M. leprae*.

Пример 2. Больной Л-в. 1967 г.р., житель Астраханской области, ИБ №3364, проходил обследование в «НИИЛ». Предварительный диагноз: Лепра, лепроматозный тип, рецидив заболевания.

Поступил в клинику «НИИЛ» 18.01.2016 г. для обследования и дальнейшего лечения. При поступлении на коже наружной поверхности бедра и в области правой ягодицы имелось гипопигментное пятно со сниженной болевой, тактильной и температурной чувствительностью без четких границ, размерами 25,0x12,0 см. В области кожи лба, латеральной орбитальной области с обеих сторон, а также подбородка и спины имелась невыраженная инфильтрация. Разреженность бровей. Для подтверждения рецидива заболевания 20.01.2016 г. у пациента взяты биопсия с кожи правого бедра и скарификаты (5 мест) кожи: с правой надбровной дуги, левой мочки уха, подбородка, верхней трети бедра справа, правой области ягодицы. Взятие материала и постановка ОТ-ПЦР проводились так, как описано выше.

В скарификатах с левой мочки уха и области ягодицы справа, а также в биоптате больного при проведении ПЦР идентифицированы *M. leprae*. При бактериоскопическом исследовании у больного только в скарификате с области ягодицы справа обнаружены микобактерии лепры, БИН=0,25. В гистологическом исследовании биоптата кожи у обследуемого отмечалось истончение эпидермиса, с умеренным акантозом, папилломатозом и гиперкератозом; умеренный фиброз дермы с очажками периваскулярной полиморфной лимфогистиоцитарной инфильтрации, в сетчатом слое гранулемы из гистиоцитов и лепрозных клеток. Таким образом, на основании клинического осмотра, бактериоскопического и гистологического исследования, а также ПЦР-теста пациенту поставлен диагноз: Лепра, лепроматозный тип, рецидив заболевания.

После постановки диагноза больному назначено противорецидивное лечение. Для оценки эффективности лечения через 6 и 9 месяцев у больного повторно взяты скарификаты (5 мест) с тех же мест, что и до начала лечения и проведены исследования (таблица 16).

Таблица 16 – Результаты обнаружения *M. leprae* (%) до и в процессе лечения

Группы лиц	Количество скарификатов	Методы исследования	
		Бактериоскопический	ПЦР с 16S rRNA
До лечения	5	40%	40%
Через 6 мес от начала лечения	5	0%	20%
Через 9 мес от начала лечения	5	0%	0%

Как видно из таблицы, через 6 месяцев от начала лечения при бактериоскопии *M. leprae* не идентифицировалась, тогда как методом ПЦР в 20% случаях *M. leprae* обнаружилась. Полученные результаты способствовали продолжению лечения, и через 9 месяцев *M. leprae* не выявлялась обоими методами.

Полученные результаты подтверждают, что предлагаемый способ идентификации микобактерий лепры высокочувствительный (98,7%) и его можно использовать для контроля эффективности антимикобактериального лечения у больных лепрой на основе оценки жизнеспособности *M. leprae*. Предлагаемый способ идентификации микобактерий лепры прост в исполнении, выполняется на отечественном оборудовании и отличается повышенной чувствительностью.

Нами предложен новый, никем ранее незаявленный способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Изобретение позволяет получить результат в течение 4-5 часов, что значительно сокращает время интерпретации эффективности проводимого лечения и позволяет своевременно его скорректировать. Предлагаемый способ

подразумевает использование не только биопсийного материала, но и скарификатов кожи, что значительно расширяет его возможности для оценки эффективности специфического лечения, а также позволяет решать поставленную задачу при использовании реактивов только отечественного производства.

Данный метод может использоваться в клинической практике в противолепрозных учреждениях, в диагностических лабораториях, в лечебных учреждениях для контроля за эффективностью MDT.

На основании данного исследования получен патент: «Способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции».

3.2.3. Разработка метода идентификации *M. leprae* с помощью ПЦР с использованием праймеров к RLEP-последовательности для скринингового обследования населения на лепру.

В условиях спорадической заболеваемости существует необходимость совершенствования скринингового обследования населения на лепру. Причем для такого обследования важны неинвазивность и быстрота способа детекции *M. leprae*. Соскобы со слизистой носа наиболее подходящий материал для создания такого теста, так как слизистая полости носа является входными воротами для возбудителя лепры. Так, в эндемичных странах, в назальном секрете идентифицируются *M. leprae* у клинически здоровых лиц [22, 71].

С целью обнаружения ДНК *M. leprae* применяют праймеры к различным участкам ДНК. Одними из таких праймеров являются, так называемые, RLEP праймеры. Хромосома *M. leprae* содержит семейство из 29 мультикопийных повторов (RLEP) с переменной структурой и неизвестной функцией [211], каждая из которых содержит инвариантный фрагмент в 545 bp, фланкирующих в некоторых случаях дополнительные фрагменты от 44 до 100 bp. Использование RLEP в качестве ДНК-мишеней для ПЦР имеет преимущество по чувствительности в сравнении с другими мишенями ДНК, поскольку они присутствуют в нескольких местах геномной ДНК.

Для повышения скорости, точности, информативности, неинвазивности, а также удешевления способа идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции в режиме RT мы разработали тест-систему с использованием праймеров к повторяющимся последовательностям *M.leprae* RLEP. Для этого у исследуемых неинвазивным методом брали соскоб со слизистой оболочки полости носа с помощью стерильных одноразовых зондов. Зонд переносили в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл со стерильным физиологическим раствором (300мкл), аккуратно перемешивали, извлекали зонд из пробирки, прижимая к стенке.

Из всех методов экстракции ДНК *M.leprae* для скринингового теста наиболее простым и результативным оказался метод М6.

Амплификационная смесь (25 мкл) представляла следующее: 5 мкл ДНК, 10 mM Tris HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 5 ед/мкл ДНК-полимераза, смесь dNTP, 6,25 mM MgCl₂, концентрация каждого нуклеотида 25 mM, глицерол, Tween 20, по 10 пкмоль/мкл каждого праймера и флуоресцентного зонда, 25 mM MgCl₂ и деионизированная вода. Затем вносили в пробирку 20 мкл минерального масла.

В каждой постановке, помимо пробирок с исследуемыми образцами, ставили 3 пробирки для проверки этапов пробоподготовки и постановки ПЦР: 1 пробирка – отрицательный контрольный образец (ОКО), прошедший все этапы пробоподготовки; 2 – отрицательный контроль «К-», в который добавлялось 5 мкл стерильной дистиллированной воды; 3 – положительный контроль «К+» – 5 мкл положительного контрольного образца.

Последовательность праймеров и флуоресцентного зонда к RLEP *M.leprae*, предложенные нами, синтезированы в НПК ООО «Синтол» (Россия):

MLRLEPTaq-F: 5'-GCA-GCA-GTA-TCG-TGT-TAG-TGA-A-3'

MLRLEPTaq-R: 5'-CGC-TAG-AAG-GTT-GCC-GTA-T-3'

MLRLEPTaq-Probe: (R6G)-CGC-CGA-CGG-CCG-GAT-CAT-CGA-(BHQ2)

При проведении амплификации были отработаны время и температура денатурации (1 - 10 мин при 94°- 95° C), температура отжига (60°-64°С), концентрация ионов Mg⁺⁺ (0,8-10,5 mM), время и количество циклов амплификации

(15-60 сек, 30-45 циклов). Контролем правильности режимов являлась детекция ДНК *M. leprae* из заведомо положительного биоптата кожи больного лепрой. Отработанный режим амплификации:

1	95°С – 5 мин	1 цикл
	60 °С – 50 сек	
2	95° С – 15 сек	40 циклов
	62° С – 40 сек	
	10° С	хранение

Амплификация и учет результатов осуществляли на термоциклере «ДТ-96 Real time» («НПФ ДНК-Технология», Россия).

Проверка специфичности проводилась на биоптатах кожи от больных лепрой. Во всех биоптатах *M. leprae* обнаружены как с помощью ПЦР-анализа, так и при гистологическом исследовании. Кроме того, специфичность оценивалась на музейных штаммах микобактерий: *M. avium*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. vaccae*, *M. intracellulare*, *M. clegg*, *M. duvalii*, *M. phlei*, *M. gastri*, *M. gordoniae*, *M. lufu*, *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis*, *M. Кедровский*. Все изоляты исследовались в пределах 100 клеток в образце. Ни один из изолятов не показал реактивности в ПЦР. Специфичность теста составила 100%.

В качестве примеров своевременного выявления микобактерий лепры приводятся выписки из амбулаторных карт больных.

Пример 1. Больной М-в 1950г.р., житель Астраханской области, проходил обследование в «НИИЛ» в марте 2013г. Предположительный диагноз: Экзема распространенная. Лепра?

При обследовании у пациента взят соскоб со слизистой оболочки полости носа и скарификат кожи для проведения бактериоскопического исследования и постановки ПЦР. При бактериоскопическом исследовании *M. leprae* не обнаружены. Для проведения ПЦР анализа у обследуемого стерильным зондом взят соскоб со слизистой поверхности носа. Выделение ДНК и постановка ПЦР с

праймерами и зондом к RLEP *M.leprae* выполнялись так, как описано выше. Далее образцы помещались в амплификатор ДТ-96, и выставлялась программа (1 цикл 95 °С – 5 мин, 60° С – 50 сек; 40 циклов 95° С – 15 сек и 62° С – 40 сек).

В К+ (биопсия от активного больного) кривая флуоресценции начинает подниматься с 22 цикла и через 5 циклов начинает подниматься кривая из обследуемого образца. В отрицательном контрольном образце флуоресценции не наблюдается. По результатам ПЦР исследования пациенту решено провести никотиновую пробу, позволяющую выявить невидимые на коже инфильтрации или пятна, после чего взят биоптат с кожи для гистологического исследования. При гистологическом исследовании у пациента обнаружен характерный инфильтрат с наличием *M.leprae*. Таким образом, через 5 часов у больного выявлены микобактерии лепры на слизистой оболочке полости носа, что позволило провести дальнейшее обследование и поставить диагноз – лепра.

Пример 2. Больной Ш-в 1981г.р., житель Таджикистана, проходил консультативное обследование в «НИИЛ» в июле 2013г. Предположительный диагноз: Лепра?

При обследовании у пациента взят соскоб со слизистой оболочки полости носа для проведения бактериоскопического исследования и постановки ПЦР. При бактериоскопическом исследовании *M.leprae* в соскобе со слизистой поверхности носа не обнаружены. В результате ПЦР исследования, проведение которого описано выше, у больного в соскобе со слизистой оболочки носа выявлены микобактерии лепры. В дальнейшем расширенное обследование больного с привлечением бактериоскопических исследований скарификатов кожи и гистологического анализа кожных биоптатов подтвердило эти результаты. Больному поставлен диагноз МВ, являющейся наиболее контагиозной формой заболевания. Данный больной, проживавший в эндемичном по лепре регионе, длительное время обращался в различные медицинские учреждения по поводу трофической язвы стопы. Проведение скринингового обследования на лепру, по предлагаемому нами способу, позволило бы своевременно установить правильный диагноз и вовремя начать специфическое лечение, тем самым прервать

эпидемиологическую цепочку болезни, снизив риск инфицирования *M. leprae* лиц, с которыми больной контактировал.

Для определения чувствительности сравнивали результаты, полученные с помощью данной тест-системы и при применении тест-системы GenoType Leprae DR. Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты выявления *M. leprae* со слизистой поверхности носа различными тест-системами

Группы лиц	Количество случаев	Результаты выявления <i>M. leprae</i> в %		
		Тест Leprae DR	ПЦР с RLEP	Бактериоскопия
Больные лепрой	56	8,9	14,3	0
Контактные лица	42	4,8	7,1	0
Мигранты	67	-	1,5	0
Лица, обследуемые на лепру	31	3,2	6,5	0

Как видно из данной таблицы, предложенная нами тест-система с использованием ПЦР с праймерами к RLEP-последовательности обладает более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с импортной тест-системой и бактериоскопическим методом ($p < 0,05$). При проведении бактериоскопического метода *M. leprae* не обнаруживалась ни в одном случае. Чувствительность разработанной тест-системы составила 93,3%.

Полученные результаты подтверждают, что предлагаемый способ идентификации микобактерий лепры прост в исполнении, неинвазивен, информативен и значительно дешевле импортных тест-систем, выполняется на отечественном оборудовании и отличается повышенной чувствительностью, точностью и скоростью выполнения.

Приведенные примеры применения предлагаемого способа показывают его полезность для выявления инфицированных микобактериями лепры лиц, на основании чего проводится дальнейшее обследование с целью установления диагноза лепры. Таким образом, применение данного способа способствует выявлению заболевания на ранней стадии, когда лечение наиболее эффективно, а также проводится с незначительными затратами и отсутствием ущерба для здоровья обследуемых. Кроме того, удешевление процедуры идентификации ДНК микобактерий лепры немаловажно при массовом обследовании населения на лепру, в том числе и мигрантов.

На основании полученных данных исследования был получен патент «Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции».

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Заболеваемость лепрой в Российской Федерации носит спорадический характер, однако о нестабильности эпидемиологической ситуации в нашей стране говорят новые случаи болезни за последние 5 лет. Так же следует отметить, что в эндемичных странах показатели заболеваемости достигли плато и не снижаются. Кроме того, увеличение количества атипичных и РВ в настоящее время существенно затрудняют клиническую диагностику заболевания.

Эпидемиология лепры характеризуется неоднородностью в восприимчивости к заболеванию, в том числе и среди лиц семейного контакта. В основе такой гетерогенности могут лежать разные механизмы. В большом эпидемиологическом исследовании, проведенном в Бангладеш, описывали до шести таких механизмов [163], основными из которых в разной ассоциации являются контакт с возбудителем лепры и генетический фактор. В нашей стране также было проведено большое исследование, подтверждающее роль иммуногенетических факторов в развитии лепры [12]. И хотя многие авторы предполагают, что *M. leprae* обитает в почве [118,119,199], в воде [141], на растениях [199] или у различных видов животных, включая насекомых, рыб, приматов и броненосцев [78,107,115], основным источником заражения лепры является больной человек.

Бытовые контакты подразумевают длительность контакта и тип лепры больного члена семьи. Кроме того, к ним можно отнести и такой общий фактор, особенно характерный для высокоэндемичных по лепре стран, как бедность [108]. К иммуногенетическим факторам относится индивидуальная наследственная предрасположенность, реализуемая через сниженный клеточный иммунитет [12]. Исследования целого генома, проведенные во Вьетнаме и Бразилии, показали, что генетический механизм при лепре может быть двухступенчатым, т.е. восприимчивость к заболеванию и развитие типа лепры определяются группой аллелей генов на разных хромосомах [163]. Восприимчивость к инфекционным

заболеваниям, в первую очередь, ассоциирована с полиморфизмом генов иммунного ответа (HLA), в том числе и при лепре [12].

Для ранней диагностики лепры, выявления бессимптомного носительства, а также в спорных случаях существует необходимость в создании современных лабораторных методов исследования. Это связано с тем, что проблема быстрой, высокоспецифичной и чувствительной идентификации *M. leprae* в исследуемом материале до настоящего времени трудно разрешима из-за невозможности культивирования возбудителя лепры на искусственных питательных средах. Несмотря на ряд применяемых методов лабораторной диагностики (бактериоскопические, гистологические и серологические), их информативность в силу ряда причин недостаточна (невозможность отдифференцировать *M. leprae* от других видов микобактерий, определить жизнеспособность микобактерий, соответственно оценить эффективность лечения, трудность в идентификации *M. leprae* при ранних формах и РВ, длительность методов). С внедрением молекулярно-генетических методов в диагностику лепры стало возможным сформировать объективные представления о масштабах распространения лепры, благодаря высокочувствительной и специфической прямой детекции *M. leprae*. Однако в нашей стране метод ПЦР и его модификации для идентификации возбудителя лепры практически не применяется и не регламентирован. Существующие разработки для детекции микобактерий преимущественно ориентированы на детекцию *M. tuberculosis*. Поэтому одним из наиболее перспективных направлений в изучении биологии *M. leprae* в последнее время является применение молекулярно-генетических методов. Эти методы помогают расшифровать генетические структуры *M. leprae*, охарактеризовать их место среди многочисленных видов микобактерий и выявлять возбудителя лепры в разных биологических образцах, т.е. имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение.

Перечисленные проблемы возможно решить путем разработки тест-систем для идентификации *M. leprae* на основе полимеразной цепной реакции в исследуемом материале. Поэтому основной целью данного исследования являлось

изучение возможностей ПЦР для идентификации возбудителя лепры и на основе этого создание новых диагностических тест-систем, их апробация и оценка эффективности по сравнению со стандартными методами лабораторной диагностики лепры. Идентификация в клиническом материале и определение жизнеспособности *M. leprae*, в конечном счете, будет способствовать повышению эффективности диагностики лепры на ранних стадиях заболевания и оценки специфического лечения.

Для решения поставленной цели необходимо было оценить достоинства и недостатки предлагаемой импортной тест-системы «GenoType Leprae DR» («HainLifescience», Германия), и в дальнейшем разработать отечественные тест-системы для идентификации возбудителя лепры в решении различных диагностических задач.

В настоящее время в мире наблюдается рост заболеваемости микобактериозами, которые, как правило, встречаются у лиц с иммунодефицитами [172]. Так как нарушение клеточного иммунитета в возникновении и развитии лепры является основополагающим фактором, можно предположить, что на коже больных лепрой персистируют, помимо *M. leprae*, и другие виды микобактерий. Это подтверждается проведенным исследованием, в результате которого с помощью метода, основанного на ПЦР с дальнейшей гибридизацией и использованием наборов реагентов «GenoType Leprae DR» установлено, что в биоптатах от больных лепрой в 66,7% идентифицируются *M. leprae*, тогда как набором «GenoType Mycobacterium CM» в 19,1% детектировались *M. malmoense* и в 4,8% - *M. avium*. Нужно отметить, что во всех случаях, где в биопсиях с помощью праймеров «GenoType Leprae DR» идентифицировались *M. leprae*, при исследовании этих образцов в наборе «GenoType Mycobacterium AS» выявлялись *Mycobacterium species*. Все образцы выделялись методами M1-M8, с наибольшей эффективностью методами M1, M3, M6, M7 и M8.

При исследовании соскобов со слизистой поверхности носа от больных лепрой бактериоскопически *M. leprae* не детектировались, в то время как методом

ПЦР с праймерами «GenoType Leprae DR» выявлялись в 9,5% случаев. Методы М1, М2 и М6 показали наибольшую эффективность.

В скарификатах кожи от больных лепрой при использовании праймеров «GenoType LepraeDR» *M.leprae* обнаруживалась на 4,2% случаев чаще, чем методом бактериоскопии. В 2,1% случаев, где бактериоскопически выявлялись единичные гомогенизированные *M.leprae*, в ПЦР результаты были отрицательные. В образцах, полученных от здоровых лиц, микобактерии лепры не обнаруживались ни стандартными методами, ни в ПЦР. При исследовании образцов с использованием праймеров «GenoType Mycobacterium CM» в одном скарификате была идентифицирована *M.malmoense*. Нужно отметить, что у этой же больной *M.malmoense* была обнаружена и в биоптате кожи. У другого больного в скарификате с кожи была идентифицирована *M.avium*. В скарификатах кожи микобактерии выявлялись только при выделении ДНК методами М1, М2 и М6.

Нетуберкулезные микобактерии на кожу человека попадают из природных источников, таких как вода, почва и пыль [106]. Микобактерии также часто детектируются у животных, но передача их человеку от животного остается недоказанной. Л.А. Винник во время обследования населения Астраханской области обнаружил, что 39% населения реагировали на сенситины из *M.scrofulaceum*, из *M.battey* – 32% обследуемых, из *M.avium* – 23%, *M.kansasii* – 3,6% и *M.marinum* – 2,4% [2]. J.I. Salem, P.G. Filho et al. [172] при исследовании 290 смывов рук здорового населения Бразилии и 36 биоптатов кожи от больных лепрой идентифицировали *M.avium-intacellulare* в 11,1% биоптатов и в 7,8% смывах рук.

Большинство нетуберкулезных микобактерий являются маловирулентными для человека. У лиц без нарушений в иммунной системе заболевание развивается только при массивном попадании возбудителя в поврежденные ткани. Наличие сопутствующей микобактериальной флоры у больных лепрой может провоцировать диссеминацию и хронизацию процесса как на коже, так и при осложнениях лепры, таких как трофические язвы стоп. Поэтому необходимо периодически проводить исследования кожи больных лепрой на присутствие нетуберкулезных микобактерий.

На сегодняшний день накоплен большой опыт выявления и лечения бактериальной флоры в трофических язвах у больных лепрой [16,123,76]. Однако лечение трофических язв у больных лепрой часто сопровождается рецидивированием, осложнением остеомиелитами. Нами было проведено исследование соскобов трофических язв больных лепрой.

При использовании праймеров «GenoType Leprae DR» в содержимом трофических язв у больных лепрой в 20% детектированы *M. leprae*, причем в 13,3% выявлялся «дикий» штамм *M. leprae* с чувствительностью к дапсону, рифампицину и офлоксацину и в 6,7% с вялотекущей и плохо поддающейся лечению трофической язвой обнаружен «мутантный» вид *M. leprae*, резистентный к противолепрозной терапии. В 46,7% случаев в трофических язвах идентифицированы различные виды микобактерий при применении комплекта реагентов «GenoType Mycobacterium CM». Причем наиболее часто (40,0%) детектировалась *M. scrofulaceum* и в 26,7% случаях *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. avium*. Реже встречались другие микобактерии: *M. kansasii* (20,0%), *M. xenopi* (13,3%). При культуральном исследовании содержимого язв от больных лепрой отмечался рост: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. Наибольшую эффективность показал метод выделения ДНК М6.

Трофические язвы у больных лепрой схожи с язвами, развивающимися при СД, поэтому для сравнения взята группа из 13 больных СД с трофическими язвами на подошвенной поверхности стоп, аналогичными язвам у больных лепрой. Больные лепрой и СД были сопоставлены по возрасту и полу.

У больных СД комплектом реагентов «GenoType Mycobacterium CM» в соскобах с трофических язв в 30,7% случаях определялись 5 штаммов микобактерий, из которых у 15,4% больных детектировались *M. kansasii* и *M. scrofulaceum* и по одному случаю (7,7%) определялись *M. fortuitum*, *M. avium* и *M. malmoense*. При использовании комплекта реагентов «GenoType Leprae DR» *M. leprae* у больных СД не выявлялись ни в одном из образцов. При исследовании с использованием праймеров «GenoType Mycobacterium AS» у больных СД ни один

штамм микобактерий не выявлялся. В 25% случаев выявлены бактерии с высоким содержанием гуанина и цитозина.

Таким образом, как у больных лепрой, так и СД идентифицировались различные нетуберкулезные микобактерии. Однако частота встречаемости микобактерий в содержимом трофических язв у больных лепрой значительно выше, чем у больных СД. Кроме того, у 20,0% больных лепрой в язвах обнаруживалась *M. leprae*.

Язвы на стопах из-за анатомического расположения, а также частого рецидивирования подвержены колонизации различными бактериями и присоединению вторичной инфекции, что способствует затруднению процессов регенерации. Это диктует пересмотр тактики ведения больных с такими язвами [15]. При проведении бактериологического исследования отделяемого язв в большинстве случаев выявляются патогенные микроорганизмы как аэробные, так и анаэробные, и чаще определяется сочетанная микрофлора. Так, в работе Tsehaynesh Lema et al. по изучению бактериального статуса язв идентифицировали в 56% случаев грамотрицательные бактерии и в 44% грамположительные у больных лепрой [123]. В аналогичной работе в содержимом трофических язв, взятом от 16 больных лепрой, обнаружили грамотрицательные бактерии в 80% случаев, в 63% – грамположительные кокки и в 36% отмечался рост смешанной микрофлоры [76]. У больных, находящихся на лечении в ФГБУ «НИИЛ», чаще всего высевались *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* [13]. При терапии таких больных используют различные антибактериальные препараты, которые не всегда дают желаемый эффект. В развитии и прогрессировании трофических язв важную роль играет симбиоз сапрофитных и патогенных микроорганизмов, которые в свою очередь способствуют поддержанию местной воспалительной реакции. Патогенные бактерии могут поражать костную ткань. Так, в 80-90% случаев основным этиологическим агентом при развитии остеомиелитов является *S. aureus* [124]. Нами было выявлено присутствие нетуберкулезных микобактерий в трофических язвах, что может приводить к прогрессированию течения и создавать трудности при лечении язв как у больных лепрой, так и СД. Нетуберкулезные

микобактерии существуют в окружающей среде в широком для человека диапазоне патогенности от потенциально патогенных, вызывающих заболевания, до сапрофитных видов. Таким образом, временная или постоянная колонизация микобактериями человека – распространенное явление. Такая колонизация иногда может привести к развитию инфекции или вызвать осложнения основного заболевания. Так, при абсцессах в местах вакцинаций или инъекций часто детектируется *M. abscessus* и *M. fortuitum*, в том числе и у больных диабетом [193]. При хирургических манипуляциях и травматизации поражения на коже в виде абсцессов и язв могут быть спровоцированы *M. avium complex* [70], а причиной лимфаденитов часто является *M. scrofulaceum* [109]. *M. kansasii*, *M. avium complex*, *M. xenopi* и *M. scrofulaceum* способны вызывать различную легочную патологию [69]. Чаще всего такое наблюдается у больных с ослабленным иммунитетом, как правило, у ВИЧ-инфицированных. Колонизация трофических язв микобактериями у больных лепрой, возможно, связана не только с нарушениями иммунитета, но и с толерантностью, обусловленной общими антигенными детерминантами *M. leprae* и других видов микобактерий.

Возможно, помимо других провоцирующих факторов, именно колонизация язв различными микобактериями способствует хронизации процесса и создает трудности в лечении. Изучение характеристик и частоты микобактериальной флоры трофических язв различной этиологии требуется для оптимизации схем антибактериальной терапии. Так, например, сообщалось об эффективном лечении гранулематозного дермального инфильтрата, вызванного *M. scrofulaceum*, кларитромицином [93]. Кроме того, при лечении микобактериозов отмечена высокая активность спарфлоксацина, азитромицина [173]. На основании результатов проведенного исследования можно сделать вывод, что в трофических язвах у больных лепрой в стадии клинического регресса присутствуют, помимо *M. leprae*, и другая микобактериальная флора.

На основании проведенного исследования установлено, что ПЦР позволяет с большей степенью чувствительности (92,9%) выявлять *M. leprae*, чем стандартные бактериоскопические и гистологические методы. Однако, для оценки возможности

полимеразной цепной реакции в диагностике лепры мы использовали зарубежную тест-систему, так как отечественные тест-системы для идентификации возбудителя лепры не существуют. Поэтому вторым этапом исследования явилась разработка отечественных тест-систем для детекции возбудителя лепры с целью решения различных диагностических задач.

Разработка тест-систем на основе ПЦР состоит из нескольких этапов: разработка методов экстракции ДНК/РНК, подбор специфических праймеров и режимов амплификации, а также способов детекции полученных результатов. Экстракция НК представляет собой первый этап при разработке тест-системы, в результате чего НК очищают от других внеклеточных или клеточных компонентов и удаляют ингибиторы ПЦР (полисахариды, белки, соли и др.). Основной задачей на этом этапе являлось получение максимального количества ДНК *M. leprae* в зависимости от вида биологического образца (биоптаты и скарификаты кожи, соскобы со слизистой носа и с трофических язв, сыворотки крови от больных лепрой и контактных с ними лиц, здоровых лиц и мигрантов) с наименьшими экономическими затратами. На этом этапе нами были отработаны 8 методов экстракции ДНК как отечественного, так и зарубежного производства. Было установлено, что наибольшее количество ДНК экстрагируется из биоптатов кожи после их предварительной гомогенизации, и в этом случае все методы экстракции ДНК имеют практически сопоставимую эффективность. Однако наиболее эффективным оказался метод экстракции ДНК, основанный на лизисе НК лизирующим раствором («ПРОБА-НК» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) (М1). Данный метод (М1) оказался эффективным и при выделении ДНК из скарификатов кожи, соскобов со слизистой носа и трофических язв так же, как и метод с использованием сорбента («ПРОБА-ГС» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) (М2).

Для определения жизнеспособности *M. leprae* наибольшую эффективность показал метод экстракции набором «ПРОБА-НК» (М8), при котором производили выделение не ДНК, а РНК из клинического материала для дальнейшей постановки реакции обратной транскрипции. С учетом того, что в инструкции к набору в

качестве биологического материала не указаны кожные биоптаты и скарификаты, мы модифицировали метод и адаптировали ко всем видам клинического материала, включая биоптаты и скарификаты кожи, путем предварительной гомогенизации образцов.

При разработке ПЦР-теста для скринингового обследования населения на лепру особенно актуальным является использование образцов, полученных неинвазивным способом, таких как соскобы со слизистой поверхности носа. В этом случае наиболее информативным и простым в исполнении оказался метод выделения ДНК М6, основанный на применении бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Учитывая, что в настоящее время особенно актуальна автоматизация лабораторий, также был применен метод экстракции М4, с помощью которого возможно осуществлять одномоментное выделение ДНК/РНК на автоматизированной станции GenoXtract («Hain Lifescience», Германия). Однако недостатками данного способа являются необходимость применения только коммерческих наборов реагентов фирмы «Hain Lifescience» (Германия), невозможность экстракции ДНК из образцов крови, а также риск контаминации между образцами.

Следующим этапом для разработки тест-систем являлся выбор специфической последовательности ДНК *M. leprae* и синтез соответствующих праймеров. В настоящее время охарактеризованы и применяются в качестве мишеней различные специфичные для возбудителя лепры последовательности, которые позволяют дифференцировать *M. leprae* от других видов КУМ. Правильный выбор олигонуклеотидных праймеров, флуоресцентных зондов, а также условий амплификации позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности. При лепре для идентификации *M. leprae* методом ПЦР применялись различные праймеры, в частности, фланкирующие различные участки генома *M. leprae* [37,114,130,152,157, 184,198].

На сегодняшний день одним из наиболее применяемых праймеров с целью идентификации *M. leprae* из-за высокой специфичности и чувствительности

является ген к 16S рРНК *M.leprae* [132,174,190]. Многократно повторяющиеся рибосомальные гены 16S рРНК, количество которых до нескольких тысяч на одну бактерию, наиболее широко применимы в идентификации возбудителя лепры [50]. Использование мишени 16S рРНК при ПЦР имеет преимущество, так как входит в состав микобактериальных рибосом и транскрибируется в огромном количестве копий (10^3 - 10^4 на клетку). Многие авторы отметили высокую чувствительность и специфичность праймеров к 16S рРНК *M.leprae* при проведении ПЦР для идентификации возбудителя лепры [23,55,75,131,128,154,179]. Поэтому в качестве одной из мишеней в нашей работе выбраны участки генома *M.leprae* – 16S рРНК.

Первоначально для детекции продуктов амплификации применялся метод электрофореза в агарозном геле. Нами также сначала для детекции *M. leprae* использовался метод электрофореза, в результате которого был зафиксирован синтез ампликона размером 290 п.н. только при наличии *M. leprae*. В дальнейшем для снижения риска контаминации были внедрены флуоресцентные методы обнаружения продуктов реакции. Одним из таких методов является метод ПЦР-РТ, который стал признанным стандартом при исследовании ДНК и РНК. В нашем исследовании мы также разработали тест-систему на основе ПЦР-РТ с применением 16S рРНК в качестве мишени для детекции *M.leprae*. Были сконструированы праймеры и флуоресцентный зонд к 16S рРНК для постановки ПЦР в РТ. Более чувствительными методами экстракции ДНК оказались метод, основанным на лизисе нуклеиновых кислот лизирующим раствором, преципитацией, с дальнейшей многократной отмывкой полученного препарата ДНК (М1 - «Проба-НК» НПФ «ДНК-технология», Москва), и метод, основанный на лизисе клеток хаотропным агентом – гуанидина тиоционата (GuSCN) (М2 - «Проба ГС» НПФ «ДНК-технология», Москва). Причем метод М1 не предназначается для выделения ДНК из биоптатов, поэтому нами производилась предварительная гомогенизация биоптатов кожи.

Условия ПЦР были отработаны с помощью подбора количества праймеров в реакционной смеси и оптимальной температуры отжига. Для предотвращения ложноотрицательных результатов и обеспечения контроля качества в тест-систему

вводился внутренний контрольный образец (ВКО) на этапе выделения НК. В свою очередь, для предотвращения ложноположительных результатов вследствие контаминации также на этапе выделения НК вводился отрицательный контрольный образец (ОКО). Для контролирования этапов ПЦР, исключения некорректных результатов и достоверности анализа в тест-системы вводился положительный (К+) и отрицательный (К-) контрольные образцы.

При амплификации НК использовали флуоресцентно меченые зонды, позволяющие детектировать результаты амплификации в RT. Амплификация и детекция ДНК в RT проходили в амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

При проведении ПЦР с праймером к 16S рРНК ДНК *M. leprae* идентифицировалась даже в бактериоскопически негативных образцах: в биоптатах методом М1 – в 11,1% случаях, М2 – 5,5%; в соскобах со слизистой носа как методом М1, так и М2 в 6,3% случаях; в скарификатах кожи и методом М1, и М2 в 7,4%; в соскобах с трофических язв обоими методами в 20% случаев. Самая высокая частота обнаружения ДНК *M. leprae* отмечалась в биоптатах кожи от больных лепрой, причём более эффективный метод выделения ДНК был М1. Специфичность праймеров составила 100%.

Разработанная нами тест-система способствует за короткие сроки идентифицировать *M. leprae* в любом клиническом материале и подтверждать диагноз.

Апробация чувствительности и специфичности разработанной нами тест-системы показана на клиническом примере. Больная поступила в ФГБУ «НИИЛ» для обследования на лепру, где у нее были взяты биоптат и скарификаты кожи, соскобы со слизистой носа и кровь. При бактериоскопическом исследовании в соскобе со слизистой поверхности носа *M. leprae* не обнаружены, в отличие от ПЦР-исследования, где *M. leprae* обнаруживались и в соскобе из носа, и во всех кожных скарификатах. Позже бактериоскопически во всех скарификатах кожи были обнаружены гомогенные и зернистые микобактерии лепры (БИН=3,67). При патолого-морфологическом исследовании биоптатов кожи из лепром

детектированы КУМ в виде групп из 5-7 микобактерий. Таким образом, применение метода ПЦР позволило в короткие сроки с учетом данных анамнеза и клинической картины установить диагноз: «Лепра, лепроматозный тип, активная стадия». После постановки диагноза больной назначено MDT по схеме ВОЗ.

На сегодняшний день методом оценки эффективности лечения является подсчет БИН при проведении бактериоскопии. Однако, несмотря на то, что данный способ позволяет судить о количестве КУМ и их разрушении, с помощью БИН невозможно определять жизнеспособность *M. leprae*. Методом для определения жизнеспособности *M. leprae* является модель С.С. Shepard [181], которая представляет собой заражение мышей дозированным количеством *M. leprae* в подушечки лапок и их дальнейшим размножением в месте инокуляции. После завершения эксперимента (период 8-12 месяцев) подсчитывается число микобактерий в лапке по методу С.С. Shepard, D.H. McRae [182]. По разнице между введенным количеством микобактерий и количеством, оказавшемся в лапке после заражения, судят о размножении *M. leprae*, в среднем число микобактерий возрастает на 2-4 порядка с 10^4 до 10^6 микробных тел. Однако данная модель имеет ряд недостатков, препятствующих применению ее в рутинной практике: длительность (10-12 мес) и дороговизна эксперимента.

Известен способ контроля эффективности химиотерапии у больных лепрой с помощью серологического исследования, заключающегося в определении уровня антител к различным антигенным детерминантам *M. leprae* с использованием комплекса серологических реакций в сыворотке крови больных лепрой [6]. Однако серологическое исследование помогает оценить эффективность проводимой терапии по изменению уровней антител, но не позволяет определить жизнеспособность возбудителя.

После открытия ПЦР стала возможна детекция не только жизнеспособных некультивируемых форм бактерий, но и мертвых клеток, содержащих генетический материал. Методом, исключаящим этот недостаток, является сочетание ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). При проведении ОТ-ПЦР с целью определения жизнеспособности микобактерий используют рибосомальные

гены, в частности 16S рРНК, так как именно мРНК присутствует только в живых возбудителях и быстро деградирует в погибших бактериях. Отличие жизнеспособных и нежизнеспособных *M.leprae* имеет большое значение для оценки эффективности проводимой терапии и прогноза развития рецидива заболевания.

Многими авторами показана высокая чувствительность и специфичность праймера 16S рРНК при проведении ОТ-ПЦР [83,85,179,132,154].

У. Haile и J.J. Ryon на основе ОТ-ПЦР разработали метод с колориметрической детекцией *M.leprae* на микротитровальных платах [83]. Общая чувствительность составляла 91,3%. Однако использование в качестве детекции продуктов амплификации электрофореза увеличивало возможность контаминации образцов и исследование проводилось только у нелеченых больных. Кроме того, использование метода ПЦР и ДНК-гибридизации делает процесс идентификации возбудителя лепры более трудоемким и долгим. Hirawati, K. Katoch et al. [85] предлагали также использовать для детекции *M.leprae* метод ОТ-ПЦР с праймерами, фланкирующими участки 69-91 и 218-239 гена 16S рРНК. При этом метод имел длительный этап выделения, а также использование электрофоретической детекции. Метод ОТ-ПЦР с праймерами к 16S рРНК применяли и R. Sharma, M. Lavania et al. [179], при котором амплификация проходила в RT. Чувствительность теста составила 88,9% в кожных скарификатах. Вместе с тем клинические образцы исследовались только от больных в активной стадии, что не дает возможности провести оценку эффективности лечения. Также для обследования только нелеченых больных A.N.Martinez, M. Ribeiro-Alves et al. [132] применяли метод ОТ-ПЦР с использованием в качестве мишеней различных генов *M.leprae*: *sodA*, 16S rRNA, RLEP и Ag 85B. B. Phetsuksiri, J. Rudeeaneksin et al. предложили способ, при котором применяется метод ОТ-ПЦР с использованием праймеров к 171 bp фрагменту, охватывающий позиции 69-239, гена 16S рРНК *M.leprae* [154]. Однако, помимо ПЦР, они использовали и блот-гибридизацию.

Для разработки теста для идентификации *M.leprae* мы применили праймеры к 16S рРНК, РНК которой можно определить с помощью реакции ОТ-ПЦР. Однако,

как видно из приведенных выше литературных источников, ранее эти гены использовали только для идентификации *M. leprae*. Мы же предложили последовательности праймеров и флуоресцентного зонда к 16S рРНК в реакции ОТ-ПЦР для оценки эффективности лечения, так как именно определение жизнеспособности возбудителя позволяет достоверно оценить эффективность антимикобактериальной терапии. Установлено, что использование данного метода позволяет быстро и точно определять жизнеспособность *M. leprae* до лечения, а также во время и после лечения, что способствует индивидуальному подходу к лечению каждого конкретного больного. Наиболее чувствительным методом экстракции оказался модифицированный метод «Проба-НК» (М8). С помощью разработанного теста было установлено, что и через 6 месяцев, а иногда и 9 месяцев в организме больного продолжают сохраняться жизнеспособные *M. leprae*. Поэтому предложенная тест-система позволяет дифференцированно подходить к срокам лечения больных.

Таким образом, с помощью ОТ-ПЦР возможно детектирование жизнеспособных микобактерий лепры в кратчайшие сроки по сравнению с общепринятым в лепрологии методом С.С. Shepard, который предусматривает длительные сроки исследования.

В эпоху персонализированной медицины, которая опирается на разработку индивидуальных схем лечения на основе геномики, тестирования на предрасположенность к болезням, профилактики, объединения диагностики с лечением и мониторинга лечения [92], разработанная нами тест-система эффективна.

Важным диагностическим подходом в разработке скринингового метода является обнаружение микобактерий неинвазивным методом на слизистой поверхности носа, так как именно воздушно-капельный путь является основополагающим в передаче инфекции. Таким методом являются соскобы со слизистой поверхности носа. В этом случае наиболее быстрым и доступным методом экстракции ДНК оказался метод с применением БСА (М6).

На сегодняшний день активно используются праймеры к повторяющимся участкам ДНК, так называемые RLEP-последовательности [55,80,103,143,152,200,212]. Хромосома *M.leprae* содержит семейство из 29 мультикопийных повторов (RLEP) с переменной структурой и неизвестной функцией [211]. Рядом исследователей показана высокая чувствительность и специфичность RLEP в качестве ДНК-мишени для идентификации ДНК *M.leprae* [27,55,67,68,80,91,103,143,200]. Для постановки ПЦР нами также были предложены последовательности праймеров и зонда к RLEP *M.leprae*.

Наблюдение за контактными с больными лепрой лицами с помощью молекулярных методов способствует раннему обнаружению случаев заболевания у лиц без клинических проявлений и с отрицательным БИН. ПЦР необходимо использовать для выявления субклинической инфекции, что предотвращает дальнейшее развитие заболевания и распространения болезни среди контактных лиц. Особенно это актуально для Астраханской области, являющейся эндемичной по лепре, а также учитывая появление новых случаев болезни в регионе за последние 5 лет. Также следует отметить, что в Россию ежегодно въезжают мигранты, в том числе из высокоэндемичных по лепре регионов. Все это способствует необходимости создания быстрого и точного скринингового метода для идентификации *M.leprae*.

В более ранних работах были попытки создания скринингового метода для обследования населения на лепру. Так, для идентификации *M.leprae* использовали праймеры к 531-bp фрагменту *rga* гена *M.leprae* и детекцию продуктов амплификации проводили либо в агарозном геле, либо в дальнейшей гибридизации, либо в ELISA [111]. Однако недостатками данного метода являлись длительность проведения реакции, а также использование в качестве детекции продуктов амплификации электрофореза, что может способствовать контаминации образцов.

Идентификацию *M.leprae* можно проводить с помощью тест-системы GenoType *Leprae* DR, основанной на DNA-стрип технологии фирмы «Hain Lifescience» (Германия). Однако данная тест-система нуждается в

специализированном дорогостоящем оборудовании и реактивах, совместимых только с данным оборудованием. R.S. Jadhav, M. Macdonald et al. [91] разработали способ идентификации *M. leprae* в носовой полости с использованием праймеров к 455-bp фрагменту RLEP *M. leprae*, а позже L.G. Patrocinio, I.M.V. Goulart et al. [151] к 372 bp фрагменту RLEP, при этом ПЦР имела высокую чувствительность. Однако недостатками данных способов являлись: инвазивность методов (биопсия со слизистой поверхности носа, а не соскоб), что подразумевает особые условия для взятия анализа и не могут быть использованы при скрининговом обследовании. Кроме того, эти методы были применены только у больных лепрой и не проверились на здоровых лицах.

Сравнение разработанного метода проводили не только со стандартным бактериоскопическим методом, но и с готовой тест-системой «GenoType *Leprae* DR» («Hain Lifescience», Германия). Установлено, что разработанная тест-система превосходит их по чувствительности и специфичности. При проведении бактериоскопического метода *M. leprae* не обнаруживалась ни в одном соскобе со слизистой носа. При использовании набора «GenoType *Leprae* DR» *M. leprae* идентифицировалась в соскобах со слизистой носа у контактных с больными лепрой лиц в 4,8% случаев, у лиц из эндемичных регионов в 3,2%, а у мигрантов не обнаруживалась, тогда как разработанным нами способом в 7,1%, 6,5% и 1,5% случаях соответственно.

Апробация чувствительности и специфичности разработанной нами тест-системы была продемонстрирована на клиническом случае жителя Таджикистана, который проходил консультативное обследование в «НИИЛ». *M. leprae* в соскобе со слизистой носа были обнаружены только в ПЦР исследовании. В дальнейшем расширенное обследование больного с привлечением бактериоскопических исследований скарификатов кожи и гистологического анализа кожных биоптатов подтвердило эти результаты. Больному поставлен диагноз МВ лепры, являющейся наиболее контагиозной формой заболевания. Данный больной, проживавший в эндемичном по лепре регионе, длительное время обращался в различные медицинские учреждения по поводу трофической язвы стопы. Проведение

скринингового обследования на лепру, по предлагаемому нами способу, позволило бы своевременно установить правильный диагноз и вовремя начать специфическое лечение, тем самым прервать эпидемиологическую цепочку болезни, снизив риск инфицирования *M. leprae* лиц, с которыми больной контактировал.

Таким образом, разработанная нами тест-система подходит для скринингового обследования населения на лепру, контактных лиц и мигрантов, что может сыграть существенную роль в разработке методов ранней диагностики лепры.

Для наиболее точной и достоверной лабораторной диагностики лепры используют бактериологические и серологические методы. Однако благодаря разработанным нами тест-системам на основе амплификации участков генов 16S рРНК и RLEP в RT можно решать вопрос быстрой идентификации *M. leprae*. Это может быть использовано в эпидемиологических исследованиях при изучении распространения возбудителя заболевания, для ранней диагностики заболевания при скрининговом обследовании контактных лиц, проживающих в эндемичных регионах, мигрантов, при РВ, а также для контроля эффективности лечения.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что методом ПЦР возможно определение наличия *M. leprae* и других видов микобактерий на кожном покрове, на слизистой оболочке носа и в отделяемом трофических язв у больных лепрой.

2. Показано, что оценка микобактериальной флоры с помощью ПЦР позволяет правильно интерпретировать результаты бактериоскопического исследования на наличие КУМ у больных лепрой.

3. Показана 100% специфичность разработанной тест – системы на основе амплификации участка гена 16S рРНК *M. leprae* в режиме реального времени для идентификации возбудителя лепры в различных клинических образцах.

4. С целью оценки эффективности проводимой терапии разработана тест-система на основе ОТ-ПЦР для определения жизнеспособности *M. leprae* в процессе, в конце курса противолепрозной терапии и через 3 месяца после ее окончания. Определение жизнеспособных микобактерий через 3 месяца после окончания терапии указывает на необходимость продолжения лечения.

5. Для скринингового обследования населения на лепру неинвазивным способом разработана тест-система на основе ПЦР с использованием праймеров к RLEP *M. leprae*, обладающая 100% специфичностью, применение которой позволит усовершенствовать противоэпидемические мероприятия при лепре.

6. Проведенный анализ разработанных тест-систем в сравнении со стандартными методами исследования (бактериоскопия, гистология) и зарубежными аналоговыми тест-системами продемонстрировал их более высокую специфичность и чувствительность.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются следующие нормативные документы, разработанные в ходе выполнения научных исследований по теме диссертации:

1. Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции // Патент России №2641060. 2018. Бюл №2 / Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш.

2. Способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции // Патент №2688156. 2019. Бюл. №14 / Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш.

3. Акт о внедрении в практику работы клиники «НИИ по изучению лепры» Минздрава России.

4. Акт о внедрении в практику работы ГБУЗ АО "Областной кожно-венерологический диспансер" Минздрава Астраханской области.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БИН – бактериоскопический индекс
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВВ – пограничная форма лепры
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- КУМ – кислотоустойчивые микобактерии
- НК – нуклеиновая кислота
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипции
- п.н. – пара нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СД – сахарный диабет
- ТТ – туберкулоидный тип лепры
- VL – погранично-лепроматозный тип лепры
- BT – погранично-туберкулоидный тип лепры
- I – недифференцированная форма лепры
- LL – лепроматозный тип лепры
- LLs – субполярный лепроматоз
- MB – многобактериальная форма лепры
- MDT – противолепрозная терапия
- PB – малобактериальная форма лепры
- PNL – невритическая лепра
- RT – режим реального времени
- TTs – субполярная туберкулоидная лепра

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдиров, Ч.А. Руководство по борьбе с лепрой / Ч.А. Абдиров, А.А. Ющенко, Н.А Вдовина. – Нукус: Каракалпакстан, 1987. – С.96-102.
2. Винник, Л.А. Туберкулез и лепра: две тени прошлого? / Л. А. Винник. – Астрахань, 1997. – 128 с.
3. Дуйко, В.В. Основные направления организации медико-социальной помощи больным лепрой в современных условиях: автореф. дис. ... д-ра мед. Наук. / Дуйко В.В. – Астрахань, 2013. – 40 с.
4. Дуйко, В.В. Результаты и достижения государственной программы по борьбе с лепрой в России за 95 лет / В.В. Дуйко // Материалы науч.-практ. конф. по актуальным вопросам лепрологии, посвященной 95-летию противолепрозной службы страны и 70-летию Научно-исследовательского ин-та по изучению лепры Астрахань, 11 октября 2018. – Астрахань, 2018. – С.5-16.
5. Дуйко, В.В. Эпидемиология и организация борьбы с лепрой в России в современных условиях / В.В. Дуйко // Актуальные вопр. клин. и эксперим. лепрологии: материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Астрахань, 2011. – С.6-16.
6. Дячина, М.Н., Серологический контроль за эффективностью химиотерапии при лепре / М.Н. Дячина, А.А. Ющенко, О.В. Дегтярев [и др.] // Метод. рекомендации. – Астрахань, 1994. – 16с.
7. Информационный бюллетень ВОЗ № 101 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/ru/> (дата обращения: 25.10.17).
8. Кубанов, А.А. Фармакотерапия лепры/ А.А. Кубанов, А.Э. Карамова, А.А. Воронцова, П. А. Калинина // Вестн. дерматол. и венерол. – 2016. – № 4. – С.12–19.
9. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др.: Пер. с англ. – М.1997. – Т.2.
10. Оттен, Т. Ф. Микобактериоз / Т. Ф. Оттен, А. В. Васильев. СПб.: Медицинская пресса, 2005. – 218 с.

11. Ребриков, Д.В. NGS. Высокопроизводительное секвенирование / Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, Е.С. Шубина, В.В. Ильинский. – М.:Бином, 2014. – 232 с.
12. Сароянц, Л.В. Иммуногенетика лепры. Межпопуляционный аспект: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.09 / Сароянц Людмила Валентиновна. – М., 2011. – С.75-91.
13. Шац, Е.И. Клинико-эпидемиологическая характеристика нейротрофических язв стоп у больных лепрой / Е.И. Шац, А.А. Ющенко // Вестн. дерматол. и венерол. – 1988. – №12. – С.37-41.
14. Шемякин, И.Г. Видовая идентификация микобактерий нетуберкулезного комплекса методом амплификации и секвенирования генов 16S рРНК / И.Г. Шемякин, Е.А. Ильина, А.Л. Лазовская [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2004. – № 3.-С.11-20.
15. Ющенко, А.А. Комплексное лечение и профилактика рецидивов нейротрофических язв стоп у больных лепрой / А.А. Ющенко, Е.И. Шац, А.Э. Васильев // Вестн. дерматол. и венерол. – 1991. – №2. – С.57-62.
16. Adams, L.B. Insights from animal models on the immunogenetics of leprosy: a review // L.B. Adams, M.T. Pena, R. Sharma [et al.] / Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2012. – Vol.107. – P.197-208.
17. Aftab, H. Leprosy in Denmark 1980–2010: a review of 15 cases / H. Aftab, S.D. Nielsen, C. Bygbjerg // BMC Res. Notes. – 2016. – Vol.9, №1. – P.1-9.
18. Alam, M.S. Demography, clinical presentation and laboratory diagnosis of leprosy by microscopy, histopathology and PCR from Dhaka city in Bangladesh // M.S. Alam, S.M. Shamsuzzaman, K.Z. Mamun / Lepr. Rev. – 2017. - Vol.88. – P.122–130.
19. Almeida, E.C. Detection of Mycobacterium leprae DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts / E.C. Almeida, A.N. Martinez, V.C. Maniero [et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2004. – Vol.99. – P.509-511.
20. Antunes, S.L. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency

// S.L. Antunes, L. Chimelli, M.R. Jardim [et al.] / Mem Inst Oswaldo Cruz. – 2012. – Vol.107. – P.246–253.

21. Araujo, S.L. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission / S.L. Araujo, J. Lobato, M.E. Reis [et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2012. – Vol.7 – P.55–59.

22. Araujo, S.L. Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy / S.L. Araujo, L.O. Freitas, L.R. Goulart, I.M.Goulart // Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. – 2016. – №63. – P.1412–1420.

23. Arnoldi, J. Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by in situ hybridization and polymerase chain reaction / J. Arnoldi, C. Schlüter, M. Duchrow [et al.] // Lab Invest. – 1992. – №66. – P.618-623.

24. Avanzi, C. Transmission of drug-resistant leprosy in guinea-conakry detected using molecular epidemiological approaches / C. Avanzi, P. Busso, A. Benjak [et al.] // Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. – 2016. – Vol.63. – P.1482–1484.

25. Awua, A.K. Evaluation of cost-effective total nucleic acids extraction protocols for cultured *Mycobacterium tuberculosis*; a comparison by PCR amplification of genes associated with drug resistance / A.K. Awua, E.D. Doe, O.K. Gyamfi // BMC Res Notes. – 2010. – Vol.3. – P.48.

26. Aye, K.S. FTA card utility for PCR detection of *Mycobacterium leprae* / K.S. Aye, M. Matsuoka, M. Kai [et al.] // Jpn. J. Infect. Dis. – 2011. – Vol.64 – P.246-248.

27. Azevedo, M.C. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms / M.C. Azevedo, N.M. Ramuno, L.R. Fachin [et al.] // Braz. J. Infect. Dis. – 2017. – №21. – P.71–78.

28. Bachmann, L. PCR diagnostics of *Mycobacterium tuberculosis* in historic human long bone remains from 18th century burials in Kaiserebersdorf, Austria / L. Bachmann, B. Däubel, C. Lindqvist [et al.] // BMC Res Notes. – 2008. – Vol.1. – 83 p.

29. Banerjee, S. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts—a pilot study from India / S. Banerjee, K. Sarkar, S. Gupta [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2010. – Vol.10. – P.252.
30. Banerjee, S. Diagnosing leprosy: Revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis / S. Banerjee, N. Biswas, N.D. Kanti [et al.] // *Int. J. Dermatol.* – 2011. – Vol.50. – P.1522–1527.
31. Bang, P.D. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy / P.D. Bang, K. Suzuki, T. Phuong [et al.] // *Int. J. Dermatol.* – 2009. – Vol.36. – P.269–276.
32. Barry, C.E. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components / C.E. Barry, K. Mdluli // *Trends Microbiol.* – 1996. – №4. – P.275–281.
33. Beissner, M. Detection of viable *Mycobacterium ulcerans* in clinical samples by a novel combined 16S rRNA reverse transcriptase/IS2404 real-time qPCR assay / M. Beissner, D. Symank, R.O. Phillips [et al.] // *PLOS Negl. Trop. Dis.* – 2012. – Vol.6. – P.1756.
34. Benjak, A. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae* / A. Benjak, C. Avanzi, P. Singh [et al.] // *Nat Commun.* – 2018. – №9. – 352 p.
35. Beyene, D. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in LegaRobi village, Ethiopia / D. Beyene, A. Aseffa, M. Harboe [et al.] // *Epidemiol. Infect.* – 2003. – Vol.131. – P.841–848.
36. Blok, D.J. Minimum requirements and optimal testing strategies of a diagnostic test for leprosy as a tool towards zero transmission: A modeling study / D.J. Blok, S.J. Vlas, A. Geluk, J.H. Richardus // *PLOS Neglected Tropical Diseases.* – 2018. – Vol.12. – e0006529.
37. Booth, R.J. Antigenic proteins of *Mycobacterium leprae*. Complete sequence of the gene for the 18-kDa protein / R.J. Booth, D.P. Harris, J.M. Love, J.D. Watson // *J. Immunol.* – 1988. – Vol.140. – P.597–601.

38. Brasil Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamentode Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. – 2016
39. Brasil Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. – 2010.
40. Bratschi, M.W. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review / M. W. Bratschi, P. Steinmann, A. Wickenden, T. P. Gillis // *Leprosy review*. – 2015. – Vol.86. – P.142-155.
41. Bret, S. Epidemiological survey of leprosy conducted in metropolitan France between 2009 and 2010 / S. Bret, B. Flageul, P.Y. Girault [et al.] // *Ann. Dermatol. Venereol.* – 2013. – Vol.140. – P.347–352.
42. Brosch, R. Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli / R. Brosch, S.V. Gordon, K. Eiglmeier [et al.] // *Res. Microbiol.* – 2000. – Vol.151. – P.135–142.
43. Bryceson, A. *Leprosy* / A. Bryceson, R.E. Pfaltzgraff – Churchill Livingstone Inc London United Kingdom, 1990. – 64 p.
44. Cabral, P.B. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy / P.B. Cabral, J.E. Junior, A.C. Macedo [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol.17. – P.1005–1010.
45. Caleffi, K.R. Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium leprae* in urine / K.R. Caleffi, R.D. Hirata, M.H. Hirata [et al.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2012. – Vol.45. – P.153-157.
46. Chae, G.T. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy / G.T. Chae, M.J. Kim, T.J. Kang [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol.51. – P.417-422.
47. Chaitanya, V.S. Analysis of a novel multiplex polymerase chain reaction assay as a sensitive tool for the diagnosis of indeterminate and tuberculoid forms of leprosy /

V.S. Chaitanya, L. Cuello, M. Das [et al.] // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2017. – Vol.6, №1. – P.1-8.

48. Chaitanya, V.S. *Mycobacterium leprae* specific genomic target in the promoter region of probable 4-alpha-glucanotransferase (ML1545) gene with potential sensitivity for polymerase chain reaction based diagnosis of leprosy / V.S. Chaitanya, M. Das, T.L. Eisenbach [et al.] // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2016. – Vol.5. – P.135-141.

49. Chemonilli, P. Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction / P. Chemonilli, S. Woods, G. Said, S.T. Cole // *Int. J. Lepr.* – 1996. – Vol.64. – P.1-5.

50. Turenne, C.Y. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous mycobacterium species / C.Y. Turenne, L. Tschetter, J. Wolfe // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol.39, №10. – P.3637–3648.

51. Clark-Curtiss, J.E. A species-specific repetitive sequence of *Mycobacterium leprae* DNA / J.E. Clark-Curtiss, M.A. Docherty // *J. Infect. Dis.* – 1989. – Vol.159. – P.7-15.

52. Clark-Curtiss, J.E. Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae* / J.E. Clark-Curtiss, W.R. Jacobs., M.A. Docherty [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1985. – Vol.161. – P.1093-1102.

53. Cole, S.T. Massive gene decay in the leprosy bacillus / S.T. Cole, K. Eiglmeier, J. Parkhill [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol.409. – P.1007-1011.

54. Colston, M.J. The molecular biology of *Mycobacterium leprae* / M.J. Colston, // *Lepr. Rev.* – 1993. – Vol.64. – P.282-294.

55. Cox, R.A. The 16S ribosomal RNA of *Mycobacterium leprae* contains unique sequence which can be used for identification by the polymerase chain reaction / R.A. Cox, K. Kempell, L. Fairclough, M.S. Corston // *J. Med. Microbiol.* – 1991. – Vol.35. – P.284-290.

56. Cruz, A.F. Comparison between microsatellites and M1 MntH gene as targets to identify *Mycobacterium leprae* by PCR in leprosy / A.F. Cruz, R.B. Furini, A.M. Roselino // *An. Bras. Dermatol.* – 2011. – Vol.86. – P.651-656.

57. Cunha, M.B. Pure neuritic leprosy: importance of the PCR in the diagnosis / M.B. Cunha, R.H. Scola, M.C.M. Wemeck [et al.] // 16-th Int. Leprosy Congress-Salvador. – Bahia, 2002. – P.257.
58. da Silva Rocha, A. Drug and multidrug resistance among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients / A. da Silva Rocha, M.B. Cunha, L.M. Diniz // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol.50. – P.1912–1917.
59. Das, M. Genomic diversity in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy cases in South India / M. Das, V.S. Chaitanya, K. Kanmani [et al.] // *J. Mol. Epid. Inf. Dis.* – 2016. – Vol.45. – P.285–289.
60. Davey, T.F. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects / T.F. Davey, R.J. Rees // *Lepr. Rev.* – 1974. – Vol.45. – P.121-134
61. Davis, G.L. Molecular assays for determining *Mycobacterium leprae* viability in tissues of experimentally infected mice / G.L. Davis, N.A. Ray, R. Lahiri [et al.] // *PLoS Negl Trop. Dis.* – 2013. – Vol.7. – P.2404.
62. Dayal, R. Diagnostic value of in situ polymerase chain reaction in leprosy / R. Dayal, S.P. Singh, P.P. Mathur [et al.] // *Ind. J. Pediatr.* – 2005. – Vol.72. – P.1043–1046.
63. de Wit, M.Y. *Mycobacterium leprae* isolates from different sources have identical sequences of the spacer region between the 16S and 23S ribosomal RNA genes / M.Y. de Wit, P.R. Klatser // *Microbiology.* – 1994. – Vol.140. – P.1982-1987.
64. de Wit, M.Y. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens / M.Y. de Wit, J.T. Douglas, J. McFadden, P.R. Klatser // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – Vol.31. – P.502–506.
65. de Wit, M.Y. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues / M.Y. de Wit, W.R. Faber, S.R. Krieg, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1991. – Vol.29. – P.906-910.
66. de Wit, M.Y. Purification and characterization of a 36 kDa antigen of *Mycobacterium leprae* / M.Y. de Wit, P.R. Klatser // *J. Gen. Microbiol.* – 1988. – Vol.134. – P.1541-1548.

67. Dobner, P. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter regions / P. Dobner, K. Feldmann, M. Rifai [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol.34. – P.806-809.

68. Donoghue, H.D. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA / H.D. Donoghue, J. Holton, M. Spigelman // *J. Med. Microbiol.* – 2001. – Vol.50. – P.177-182.

69. Falkinham, J.O. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* / J.O. Falkinham // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol.69. – P.5685-5689.

70. Ferreira, C.P. Atypical cutaneous mycobacteriosis caused by *Mycobacterium avium* complex / C.P. Ferreira, Z.F. Coutinho, M.C. Lourenco // *Braz. J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol.14. – P.324-326.

71. Fischer, M. Leprosy - An overview of clinical features, diagnosis, and treatment / M. Fischer // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2017. – Vol.15. – P.801–827.

72. Fontes, A. Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil / A. Fontes, H. Gomes, M. de Araujo // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2012. – Vol.107. – P.143-149.

73. Fontes, A.N.B. Evaluation of genetic variability in *Mycobacterium leprae* and possible application for development of molecular tools strain typing / A.N.B. Fontes, A.A. Brandao, A.R. Santos [et al.] // 16- th Int. Leprosy Congress – Salvador, Bahia. – 2002. – P.252-253.

74. Kotteswaran, G. Skin adnexa in leprosy their role in the dissemination of *M. leprae* / G. Kotteswaran, C.J. Chacko, C.K. Job // *Lepr. India.* – 1980. – Vol.52. – P.475-481.

75. Gama, R.S. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts / R.S. Gama, T.A.R. Gomides, C.F.M. Gama [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2018. – Vol.18. – P.153.

76. Gellati, L.C. Phenotypic, molecular and antimicrobial susceptibility assessment in isolates from chronic ulcers of cured leprosy patients: a case study in Southern Brazil

/ L.C. Gellati, R.R. Bonamigo, A.P. Becker [et al.] // *An Bras. Dermatol.* – 2014. – Vol.89. – P.404-408.

77. Gillis, T.P. Polymerase chain reaction and leprosy / T.P. Gillis, D.L. Williams // *Int. J. Lepr.* – 1991. – Vol.59. – P.311-316.

78. Gormus, B.J. Experimental leprosy in rhesus monkeys: transmission, susceptibility, clinical and immunological findings / B.J. Gormus, K. Xu, G.B. Baskin [et al.] // *Lepr. Rev.* – 1998. – Vol.69. – P.235-245.

79. Goulart, I.M. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size / I.M. Goulart, A.M. Cardoso, M.S. Santos [et al.] // *Arch. Dermatol. Res.* – 2007. – Vol.299. – P.267–271.

80. Grossinsky, C.M. Genetic relationships among *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* and candidate leprosy vaccine strains determined by DNA hybridization : identification of a *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence / C.M. Grossinsky, W.R. Jacobs, J.E. Clark-Curtiss, B.R. Bloom // *Infect. Immunol.* – 1989. – Vol.57. – P.1535-1541.

81. Gutell, R.R. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective / R.R. Gutell, N. Larsen, C.R. Woese // *Microbiol. Rev.* – 1994. – Vol.58. – P.10-26.

82. Hacker, M. A. Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987–2010 / M.A. Hacker, N.C. Duppre, J.A. Nery [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2012. – Vol.107. – P.49-54.

83. Haile, Y. Colorimetric microtitre plate hybridization assay for the detection of *Mycobacterium leprae* 16S rRNA in clinical specimens / Y. Haile, J.J. Ryon // *Lepr. Rev.* – 2004. – Vol. 75. – P.40-49.

84. Hartskeerl, R.A. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* / R.A. Hartskeerl, M.Y. de Wit, P.R. Klatser // *J. Gen. Microbiol.* – 1989. – Vol.135. – P.2357-2364.

85. Hirawati. Detection of *M.leprae* by reverse transcription-PCR in biopsy specimens from leprosy cases: a preliminary study / Hirawati, K. Katoch, D.S. Chauhan [et al.] // *J. Commun. Dis.* – 2006. – Vol.38, №3. – P.1129-1133
86. Honoré-Bouakline, S. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction / S. Honoré-Bouakline, J.P. Vincensini, V. Giacuzzo [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol.41. – P.2323-2329.
87. Huijsmans, C.J. Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications / C.J. Huijsmans, J. Damen, J.C. Linden [et al.] // *BMC Res. Notes.* – 2010. – Vol.3 – P.239.
88. Huitt, G.A. Nontuberculous mycobacteria / G.A. Huitt, C.L. Daley // *Clin. Chest. Med.* – 2015. – Vol.36. – P.11-12.
89. Hulse, E.V. Leprosy and ancient Egypt / E.V. Hulse // *Lancet.* – 1972. – Vol.2. – P.1024-1025.
90. Inskip, S.A. Osteological, biomolecular and geochemical examination of an early anglo-saxon case of lepromatous leprosy / S.A. Inskip, G.M. Taylor, S.R. Zakrzewski [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol.10. – e0124282.
91. Jadhav, R.S. Simplified PCR detection method for nasal *Mycobacterium leprae* / R.S. Jadhav, M. Macdonald, L. Bjune [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 2001. – Vol.69. – P.299-307.
92. Jain, K.K. From molecular diagnostics to personalized medicine / K.K. Jain // *Exp. Rev. Mol. Diagn.* – 2002. – Vol.2. – P.299-301.
93. Jang, J.C. Successful treatment of localized cutaneous infection caused by *Mycobacterium scrofulaceum* with clarithromycin / J.C. Jang, J.H. Jo, C.K. Oh [et al.] // *Pediatr. Dermatol.* – 2005. – Vol.22. – P.476-479.
94. Jardim, M.R. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy / M.R. Jardim, S.L. Antunes, A.R. Santos [et al.] // *J. Neurol.* – 2003. – Vol.250. – P.806-809.
95. Jardim, M.R. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy / M.R. Jardim, S.L. Antunes, B. Simons [et al.] // *Lepr. Rev.* – 2005. – Vol.76: P.232-240.

96. Job, C.K. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR / C.K. Job, J. Jayakumar, M. Kearney, T.P. Gillis // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2008. – Vol.78. – P.518-521.

97. Job, C.K. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy / C.K. Job, J. Jayakumar, D.L. Williams, T.P. Gillis// *Int. J. Lepr.* – 1997. – Vol.65. – P.461-464.

98. Jungblut, P.R. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens / P.R. Jungblut, U.E. Schaible, H.J. Mollenkopf [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 1999. – Vol.33. – P.1103–1117.

99. Kamal, R. RLEP PCR as a definitive diagnostic test for leprosy from skin smear samples in childhood and adolescent leprosy / R. Kamal, R. Dayal, K. Gaidhankar [et al.] // *Ind. J. Lepr.* – 2016. – Vol.88. – P.193-197.

100. Kamal, R. Evaluation of diagnostic role of in situ PCR on slit-skin smears in pediatric leprosy / R. Kamal, M. Natrajan, K. Katoch, V.M. Katoch // *Ind. J. Lepr.* – 2010. – Vol.82. – P.195-200.

101. Kamble, R.R. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears / R.R. Kamble, V.S. Shinde, S.P. Madhale [et al.] // *Ind. J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol.28. – P.57-59.

102. Kampirapap, K. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy / K. Kampirapap, N. Singtham, P.R. Klatser, S. Wiriyawipart // *Int. J. Lepr.* – 1998. – Vol.66. – P.16-21.

103. Kang, T.J. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae* / T.J. Kang, S.K. Kim, S.B. Lee [et al.] // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2003. – Vol.28. – P.420-424.

104. Kar, H. K. Treatment of leprosy / H. K. Kar, R. Gupta // *Clin. Dermatol.* – 2015. – Vol.33, №1. – P.55-65.

105. Katoch, V.M. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy / V.M. Katoch // *Exp. Rev. Mol. Med.* – 2002. – Vol.4. – P.1-14.
106. Katoch, V. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM) / V. Katoch // *Ind. J. Med. Res.* – 2004. – Vol.120. – P.290-304.
107. Kazda, J. Isolation of non-cultivable acid-fast bacilli in sphagnum and moss vegetation by foot pad technique in mice / J. Kazda, L.M. Irgens, K. Muller // *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* – 1999. – Vol.48. – P.1-6.
108. Kerr-Pontes, L.R. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study / L.R. Kerr-Pontes, A.C. Montenegro, M.L. Barreto [et al.] // *Int. J. Epidemiol.* – 2004. – Vol.33. – P.262-269.
109. Khorsavi, A.D. Variation within *Mycobacterium scrofulaceum* / A.D. Khorsavi, J.L. Stanford, H.D. Donoghue, G.A.W. Rook // *J. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol.83. – P.596-602.
110. Kirschner, P. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory / P. Kirschner, B. Springer, U. Vogel [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – Vol.31. – P.2882-2889.
111. Klatser, P.R., Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in population for which leprosy endemic / P.R. Klatser, S.V. Beers, B. Madjit [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – Vol.31 – P.2947-2951.
112. Klatser, P.R. Humoral and cellular immune reactivity to recombinant *M. leprae* antigens in HLA-typed leprosy patients and healthy controls / P.R. Klatser, A.M. Janson, J.E.R. Thole [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 1997. – Vol.65. – P.178-189.
113. Kotlowski, R. One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish / R. Kotlowski, A. Martin, A. Ablordey [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2004. – Vol.53. – P.927-933.

114. Kramme, S. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR / S. Kramme, G. Bretzel, M. Panning [et al.] // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2004. – Vol.193. – P.189-193.
115. Lahiri, R. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle / R. Lahiri, J.L. Krahenbuhl // *Lepr. Rev.* – 2008. – Vol.79. – P.401-409.
116. Lamb, F.I. The specific of 18 kDa antigen of *Mycobacterium leprae* is present in *Mycobacterium habana* and functions as a heat-shock protein / F.I. Lamb, N.B. Singh, M.J. Colston // *J. Immunol.* – 1990. – Vol.144. – P.1922-1925.
117. Lastória, J.C. Leprosy: A review of laboratory and therapeutic aspects—Part 2 / J.C. Lastória, M.A. Abreu // *An. Bras. Dermatol.* – 2014. – Vol.89. – P.389-401.
118. Lavania, M. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy / M. Lavania, K. Katoch, V.M. Katoch [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2008. – Vol.8. – P.627–631.
119. Lavania, M. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences / M. Lavania, K. Katoch, P. Sachan [et al.] // *J. Commun. Dis.* – 2006. – Vol.38. – P.269-273.
120. Lavania, M. Cohort study of the seasonal effect on nasal carriage and the presence of *Mycobacterium leprae* in an endemic area in the general population / M. Lavania, R.P. Turankar, S. Karri [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2013. – Vol.19. – P.970-974.
121. Lavania, M. Molecular typing of *Mycobacterium leprae* strains from northern India using short tandem repeats/ M. Lavania, K. Katoch, R. Sharma // *Ind. J. Med. Res.* – 2011. – Vol.133. – P.618-626.
122. Lee, K.S. Detection of *Mycobacterium leprae* in tissue and blood by polymerase chain reaction / K.S. Lee, O.K. Youl, R.Y. Wok, M.H. Suh // *Int. J. Lepr.* – 1994. – Vol.62. – P.139-140.
123. Lema, T. The pattern of bacterial isolates and drug sensitivities of infected ulcers in patients with leprosy in ALERT, Kuyera and Gambo Hospitals, Ethiopia / T. Lema, Y. Woldeamanuel, D. Asrat // *Lepr. Rev.* – 2012. – Vol.83. – P.40-51.

124. Lew, D.P. Osteomyelitis / D.P. Lew, F.A. Waldvogel // *Lancet*. – 2004. – №364. – P.369-379.
125. Lini, N. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases / N. Lini, N.P. Shankernarayan, K.J. Dharmalingam // *Med. Microbiol.* – 2009. – Vol.58. – P.753-759.
126. Male, M.M. Molecular screening for primary drug resistance in *M. leprae* from newly diagnosed leprosy cases from India / M.M. Male, B.G. Rao, S. Chokkakula [et al.] // *Lepr. Rev.* – 2016. – Vol.87. – P.322-331.
127. Maltempe, F.G. Critical analysis: Use of polymerase chain reaction to diagnose leprosy / F.G. Maltempe, V.P. Baldin. M.A. Lopes [et al.] // *Braz. J. Pharm. Sci.* – 2016. – P.52.
128. Marques, L.É.C. Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases / L.É.C. Marques, C.C. Frota // *Pathog. Glob. Health.* – 2018. – Vol.112. – P.72-78.
129. Marques, M.A.M. Mapping and identification of the major cell-wall associated components of *Mycobacterium leprae* / M.A.M. Marques, S. Chitale, P.J. Brennan, M.C.V. Pessolani // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol.66. – P.2625-2631.
130. Martinez, A.N. 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 / A.N. Martinez, C.F. Britto, J.A. Nery [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol.44. – P.3154-3159.
131. Martinez, A.N. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR / A.N. Martinez, R. Lahiri, T.L. Pittman [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol.47. – P.2124-2130.
132. Martinez, A.N. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens / A.N. Martinez, M. Ribeiro-Alves, E.N. Sarno // *PLOS Negl. Trop. Dis.* – 2011. – Vol.5. – P.1354.

133. Martinez, A.N. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic / A.N. Martinez, C. Talhari, M.O. Moraes, S. Talhari // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2014. – Vol.8. – e2655.

134. Martinez, T.S. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status / T.S. Martinez, M.M. Figueira, A.V. Costa // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2011. – Vol.17. – P.1653-1658.

135. Matsuoka, M. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection / M. Matsuoka, S. Izumi, T. Budiawan // *Ind. J. Lepr.* – 1999. – Vol.71. – P.61-67.

136. Matsuoka, M. Analysis of leprosy transmission based on genotyping / M. Matsuoka, Z. Liangfen, T. Budiawan // *Int. J. Lepr.* – 2003. – Vol.71. – P.379-382.

137. Matsuoka, M. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes / Matsuoka, M., Maeda S., Kai M. [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 2000. – Vol.68. – P.121-128.

138. Medeiros, M.F. An attempt to improve pure neural leprosy diagnosis using immunohistochemistry tests in peripheral nerve biopsy specimens / M.F. Medeiros, M.R. Jardim, R.T. Vital [et al.] // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* – 2013. – e31828.

139. Menicucci, L.A. Microscopic leprosy skin lesions in primary neuritic leprosy / L.A. Menicucci, A. Miranda, S.L. Antunes [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2005. – Vol.52. – P.648-652.

140. Misra, N. Clinical utility of LSR/A15 gene for *Mycobacterium leprae* detection in leprosy tissues using PCR / N. Misra, V. Ramesh, R.S. Misra // *Int. J. Lepr.* – 1995. – Vol.63. – P.35-41.

141. Mohanty, P.S. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination / P.S. Mohanty, F. Naaz, D. Katara [et al.] // *Ind. J. Dermatol., Venereal., Leprol.* – 2016. – Vol.82. – P.23-27.

142. Monot, M. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae* / M. Monot, N. Honoré, T. Garnier [et al.] // *Nat. Genet.* – 2009. – Vol.41. – P.1282-1289.

143. Monot, M. On the origin of leprosy / M. Monot, N. Honoré, T. Garnier // *Science*, N.Y. – 2005. – Vol.308. – P.1040–1042.
144. Morgado, A.M.A. Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients / A.M.A. Morgado, A.M. Roselino, M. Enokihara [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2014. – Vol.20. – P.59-64.
145. Mostafa, H.M. Acid-fast bacilli from former leprosy regions in coastal Norway showing PCR positivity for Mycobacterium leprae / H.M. Mostafa, M.V.D. Kazda, L.M. Irgens, H.G. Luesse // *Int. J. Lepr.* – 1995. – Vol.63. – P.97-99.
146. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // *Meth. Enzymol.* – 1987. – Vol.155. – P.335-350.
147. Nazario, A. P. Leprosy in Southern Brazil: a twenty-year epidemiological profile / A. P. Nazario, J. Ferreira, L. Schuler-Faccini // *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* – 2017. – Vol.50, №2. – P.251–255.
148. Niemz, A. Nucleic acid testing for tuberculosis at the point-of-care in high-burden countries / A. Niemz, D.S. Boyle // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2012. – Vol.12. – P.687–701.
149. Okwumabua, O. Comparison of three methods for extraction of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis DNA for polymerase chain reaction from broth-based culture systems / O. Okwumabua, E. Shull, M. O'Connor [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2010. – Vol.22. – P.67-69.
150. Patel, J B. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system / J.B. Patel, D.G.B Leonard, X. Pan [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol.38. – P.246-251.
151. Patrocinio, L.G. Detection of Mycobacterium leprae in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction / L.G. Patrocinio, I.M. Goulart, L.R. Goulart, [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2005. – Vol.44. – P.311–316.
152. Pattyn, S.R. Polymerase chain reaction amplifying DNA coding for species-specific rRNA of Mycobacterium leprae / S.R. Pattyn, D. Urse, M. Ieven [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 1992. – Vol.60. – P.234-243.

153. Pattyn, S.R. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts / S.R. Pattyn, D. Ursi, M. Even [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 1993. – Vol.61. – P.389-393.
154. Phetsuksiri, B. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens / B. Phetsuksiri, J. Rudeeaneksin, P. Supakul // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2006. – Vol.48. – P.319-328.
155. Philipp, W. *Mycobacterial genome structure* / W. Philipp, D.C. Schwartz, A. Telenti, S.T Cole // *Electrophoresis.* – 1998. – Vol.19. – P.573-576.
156. Phillips, K. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated) / K. Phillips, N. McCallum, L. Welch // *Forensic Sci Int. Genet.* – 2012. – Vol.6. – P.282-285.
157. Plikaytis, B.B. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay / B.B. Plikaytis, R.H. Gelber, T.M. Shinnick // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol.28. – P.1913-1917.
158. Ramos, J. M. Epidemiology of leprosy in Spain: the role of the international migration / J.M. Ramos, D. Romero, I. Belinchon // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2016. – Vol.10, №3. – e0004321.
159. Ramu, G. Central Jalma Institute for Leprosy, Agra / G. Ramu // *Lepr. India.* – 1981. – Vol.53. – P.307-315.
160. Rees, R.J. Enhanced susceptibility of thymectomized and irradiated mice to infection with *Mycobacterium leprae* / R.J. Rees // *Nature.* – 1966. – Vol.211. – P.657-658.
161. Reis, E.M. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset / E.M. Reis, S. Araujo, J. Lobato [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2014. – Vol.20. – P.447-452.
162. Reja, A.H. Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: A new approach to leprosy diagnosis / A.H. Reja, N. Biswas, S. Biswas [et al.] // *Ind. J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2013. – Vol.79. – P.693-700.

163. Richardus, J.H. Close contacts with leprosy in newly diagnosed leprosy patients in a high and low endemic area: comparison between Bangladesh and Thailand / J.H. Richardus, A. Meima, C.J. Marrewijk // *Int. J. Lepr.* – 2005. – Vol.73. – P.249-257.
164. Ridley, D.S. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system / D.S. Ridley, W.H. Jopling // *Int. J. Lepr.* – 1996. – Vol.64. – P.255-273.
165. Rinke, de Wit T.F The Mycobacterium leprae antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins / de Wit T.F. Rinke, S. Bekelie, A. Osland [et al.] // *Infect. Immun.* – 1993. – Vol.61. – P.3642-3647.
166. Rodriguez, G. Pure neuritic leprosy in patients from a high endemic region of Colombia / G. Rodriguez, R. Pinto, Y. Gomez [et al.] // *Lepr. Rev.* – 2013. – Vol.84. – P.41-50.
167. Rosa, F.B. Detection of Mycobacterium leprae in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy / F.B. Rosa, V.C. Souza, T.A. Almeida [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2013. – Vol.108. – P.572-577.
168. Rudeeaneksin, J. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of Mycobacterium leprae in skin specimens / J. Rudeeaneksin, S. Srisungngam, P. Sawanpanyalert [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol.54. – P.263-270.
169. Ruiz-Fuentes, J.L. Comparison of four DNA extraction methods for detection of Mycobacterium leprae from Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides / J.L. Ruiz-Fuentes, A. Diaz, A.E. Entenza [et al.] // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2015. – Vol.4, №4. – P.284-289.
170. Rupendra, S. Simplified PCR detection method for nasal Mycobacterium leprae / S. Rupendra, M. Macdonald, L. Bjune [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 2001. – Vol.69. – P.299-308.
171. Saito, H. Identification and partial characterization of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare by using DNA probes / H. Saito, H. Tomioka, K. Soto [et al.] // *J.Clin. Microbiol.* – 1989. – Vol.27. – P.994-997.

172. Salem, J.I. Isolation and characterization of mycobacteria colonizing the healthy skin / J.I. Salem, P.G. Filho, V. Levy-Frebault [et al.] // *Acta Lepr.* – 1989. – Vol.7. – P.18-20.

173. Salvana, E.M. Mycobacterium other than tuberculosis (MOTT) infection: an emerging disease in infliximab-treated patients / E.M. Salvana, G.S. Cooper, R.A. Salata // *J. Infect. Dec.* – 2007. – Vol.55, №6. – P.484-487.

174. Santos, A.R. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy / A.R. Santos, V. Balassiano, M.L. Oliveira [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2001. – Vol.96. – P.1129-1133.

175. Santos, A.R. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy / A.R. Santos, A.B. Miranda, E.N. Sarno [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 1993. – Vol.39. – P.298-304.

176. Sarno, E.N. Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts / E.N. Sarno, N.C. Duppre, A.M. Sales [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2012. – Vol.107. – P.1054-1059.

177. Schuenemann, V.J. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae* / V.J. Schuenemann, P. Singh, T.A. Mendum [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol.341. – P.179-183.

178. Scollard, D.M. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States / D.M. Scollard, T.P. Gillis, D.L. Williams // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1998. – Vol.109. – P.642-646.

179. Sharma, R. Development and evaluation of real-time RT-PCR assay for quantitative estimation of viable *Mycobacterium leprae* in clinical samples / R. Sharma, M. Lavania, K. Katoch [et al.] // *Indian J. Lepr.* – 2008. – Vol.80. – P.315-321.

180. Sharma, R.K. Comparison of sensitivity of probes targeting RNA v/s DNA in leprosy cases / R.K. Sharma, V.M. Katoch, K. Katoch [et al.] // *Indian J. Med. Microbiol.* – 1996. – Vol.14. – P.99-104.

181. Shepard, C.C. The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into footpads of mice / C.C. Shepard // *J. Exp. Med.* – 1960. – Vol. 112. – P.445-454.
182. Shepard, Cn.C. A method for counting acid-fast bacteria / C.C. Shepard, D.H. McRae // *Int. J. Lepr.* – 1968. – Vol.36. – P.78-82.
183. Sidorova, J.V. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays / J.V. Sidorova, B.V. Biderman, E.E. Nikulina, A.B. Sudarikov // *Exp. Dermatol.* – 2012. – Vol.21. – P.57-60.
184. Silva, R.A. Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggests the occurrence of reinfection or of bacterial population shift during disease relapse / R.A. Silva, A.A. Cunha Dos Santos, P. Pignataro [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2011. – Vol.60. – P.1441-1446.
185. Singh, H.B. Effect of treatment on PCR positivity in multibacillary leprosy patients treated with conventional and newer drugs ofloxacin and minocycline / H.B. Singh, K. Katoch, M. Natrajan [et al.] // *Acta Leprol.* – 1999. – Vol.11. – P.179-182.
186. Singh, P. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis* / P. Singh, A. Benjak, V.J. Schuenemann [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – Vol.112. – P.4459-4464.
187. Siwakoti, S. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) with slit skin smear examination (SSS) to confirm clinical diagnosis of leprosy in eastern Nepal / S. Siwakoti, K. Rai, N.R. Bhattarai [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2016. – Vol.10. – e0005220.
188. Stinear, T.P. Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence / T.P. Stinear, G. A. Jenkin, P.D.R. Johnson, J.K. Davies // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol.182. – P.6322-6330.
189. Suarez, O. Extraccion de AND / O. Suarez, P. Suffys, A. Entenza // *Revista de Leprología.* – 2012. – Vol.28. – P.455-458.
190. Tatipally, S. Polymerase chain reaction (PCR) as a potential point of care laboratory test for leprosy diagnosis - a systematic review / S. Tatipally, A. Srikantam, S. Kasetty // *Trop. Med. Infect. Dis.* – 2018. – Vol.3. – P.107.

191. Tekaia, F. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico / F. Tekaia, S.V. Gordon, T. Garnier // *Tubercle Lung Dis.* – 1999. – Vol.79. – P.329-342.
192. Thole, J.E.R. Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65-kDa mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen / J.E.R. Thole, P. Hindersson, J. Bryun [et al.] // *Microbiol. Pathogenes.* – 1988. – Vol.4. – P.71-83.
193. Tiwari, T.C. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzaalkonium chloride / T.C. Tiwari, B. Ray, K.C. Jost [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2003. – Vol.36. – P.954-962.
194. Tiwari, V. Evaluation of polymerase chain reaction in nerve biopsy specimens of patients with Hansen's disease / V. Tiwari, K. Malhotra, K. B. Khan [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2017. – Vol.380. – P.187-190.
195. Torres, P. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts / P. Torres, J.J. Camarena, J.R. Gomez [et al.] // *Lepr. Rev.* – 2003. – Vol.74. – P.18-30.
196. Truman, R.W. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR / R.W. Truman, P.K. Andrews, N.Y. Robbins [et al.] // *PLOS Negl. Trop. Dis.* – 2008. – Vol.2. – P.328.
197. Truman, R.W. Probable zoonotic leprosy in the southern United States / R.W. Truman, P. Singh, R. Sharma [et al.] // *Engl. J. Med.* – 2011. – Vol.364. – P.1626-1633.
198. Turankar, R.P. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16 S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples / R.P. Turankar, S. Pandey, M. Lavania [et al.] // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2015. – Vol.4, №1. – P.54-59.
199. Turankar, R.P. Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: deciphering the role of environment as a potential reservoir / R.P. Turankar, M. Lavania, M. Singh [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – Vol.12. – P.121 - 126.

200. Van der Vliet, G.M.E. Use of NASBA RNA amplification for detection of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies from untreated and treated leprosy patients / G.M.E. Van der Vliet, S.N. Cho, K. Kampirapap [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 1996. – Vol.64. – P.396-403.
201. Van Soolingen, D. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia / D. Van Soolingen, L. Qian, P.E.W. de Haas [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol.33. – P.3234-3238.
202. Via, L.E. Comparison of methods for isolation of *Mycobacterium avium* complex DNA for use in PCR and RAPD / L.E. Via, J.O. Falkingham // *J. Microbiol. Meth.* – Vol.26. – P.151-161.
203. Wen, Y. Whole-blood nested-PCR amplification of *M. leprae*-specific DNA for early diagnosis of leprosy / Y. Wen, Y. Xing, L.C. Yuan [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2013. – Vol.88. – P.918-922.
204. WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes // World Health Organisation Technical Report Series. – 1982. – Vol.675. – P.1-33.
205. WHO. Weekly epidemiological record. – 2015. – Vol.36. – P.461-476.
206. Wichitwechkarn, J. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR / J. Wichitwechkarn, S. Karnjan, S. Shuntawuttisetee [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol.33. – P.45-49.
207. Williams, D.L. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* / D.L. Williams, T.P. Gillis, R.J. Booth [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1990. – Vol.162. – P.193-200.
208. Williams, D.L. Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR / D.L. Williams, T.P. Gillis, P. Fiallo // *Mol. Cell. Probes.* – 1992. – Vol.6. – P.401-410.
209. Williams, D.L. Proc. Workshop on PCR Technology for Defection of *Mycobacterium leprae* / Williams, D.L. Gillis T.P// *J. Infect. Dis.* – 1991. – P.18-22.
210. Williams, D.L. Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection / D.L. Williams, M. Torrero, P.R. Wheeler [et al.] // *J.Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol.8. – P.58-72.

211. Woods, S.A. A family of dispersed repeats of *Mycobacterium leprae* / S.A. Woods, S.T. Cole // *Mol. Microbiol.* – 1990. – Vol.4. – P.1745-1751.
212. Woods, S.A. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR / S.A. Woods, S.T. Cole // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1989. – Vol.53. – P.305-309.
213. Xie, Z. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms / Z. Xie, A. Thompson, H. Kashleva, A. Dongari-Bagtzoglou // *BMC Microbiol.* – 2011. – Vol.11. – 93 p.
214. Xiong, J. Study of the application of PCR of the leprosy diagnosis / J. Xiong, J. Ji, L. Chong // 16-th. Int. Leprosy Congress-Salvador, Bahia. – 2002. – P.258-258.
215. Yan, W. Application of RLEP real-time PCR for detection of *M. leprae* DNA in paraffin-embedded skin biopsy specimens for diagnosis of paucibacillary leprosy / W. Yan, Y. Xing, L.C. Yuan [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2014. – Vol.90. – P.524-529.
216. Yoon, K.H. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients / K.H. Yoon, S.N. Cho, M.K. Lee [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – Vol.31. – P.895-899.
217. You, E.Y. Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea / E.Y. You, T.J. Kang, S.K. Kim [et al.] // *J. Infect.* – 2005. – Vol.50. – P.6-11.
218. Zumarraga, M.J. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of corrientes, Argentina / M.J. Zumarraga, E.H. Resoagli, M.E. Cecuta [et al.] // *Int. J. Lepr.* – 2001. – Vol.69. – P.21-25.