

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.873.211:577.21.083

Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ ПУТЁМ АМПЛИФИКАЦИИ ВИДОСПЕЦИФИЧНОГО ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ФРАГМЕНТА ГЕНОМА *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии»
Минздрава РФ, 107076, Москва, Россия

Сохранение высокого уровня заболеваемости лепрой в ряде государств мира, а также активизация трансграничных миграционных потоков повышают актуальность эффективной диагностики данного заболевания и в странах со sporadic заболеваемостью лепрой, к которым относится Российская Федерация. Цель исследования – разработка высокочувствительного ПЦР-теста для обнаружения генетического материала *Mycobacterium leprae* и сравнение его эффективности с коммерчески доступной тест-системой «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания). Предложенный подход заключался в амплификации участка некодирующего повторяющегося элемента генома *M. leprae* – RLEP. С использованием референсных образцов ДНК патогенных и условно-патогенных микобактерий показана высокая специфичность проводимого анализа, а его сравнение с ПЦР, ориентированной на обнаружение однокопийных генов *M. leprae* (*rrs*, *fbp*, *MntH*), продемонстрировало уменьшение порога детекции, выражаемого количеством циклов амплификации, на котором кривая накопления флуоресцентного сигнала превышала базовый уровень. Использование коммерчески доступной тест-системы, основанной на обнаружении однокопийного гена *rpoB*, обеспечивало 59,4% чувствительность детекции *M. leprae* в клиническом материале, в то время как применение разработанного подхода повышало этот показатель до 96,8%. Разработанная тест-система для ПЦР-диагностики лепры представлена на государственную регистрацию, после чего её практическое использование позволит решить широкий круг задач по выявлению и подтверждению новых случаев лепры, мониторингу эффективности проводимого лечения, а также эпидемиологическому (в том числе трансграничному) мониторингу распространения данного заболевания.

Ключевые слова: лепра; *Mycobacterium leprae*; ПЦР в реальном времени; RLEP.

Для цитирования: Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Совершенствование ПЦР-диагностики лепры путем амплификации видоспецифичного повторяющегося элемента генома *Mycobacterium leprae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 511-516. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-511-516>

Obraztsova O.A., Verbenko D.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Kubanov A.A., Deryabin D.G.

THE REFINEMENT OF LEPROSY PCR DIAGNOSTICS BY THE AMPLIFICATION OF SPECIE-SPECIFIC REPEATED FRAGMENT OF THE MYCOBACTERIUM LEPRAE GENOME.

FGBU "State Scientific Center of Dermatovenereology and Cosmetology" Ministry of Health of Russia, 107076, Moscow, Russia

Certain level of new registered cases of leprosy in a number of endemic countries in the world, as well as growing rate of transboundary migratory flows, raise the issue of effective diagnosis of this disease in countries with sporadic incidence of leprosy, including the Russian Federation. The purpose of the study was to develop a highly sensitive PCR test for detecting the genetic material of *Mycobacterium leprae* and to compare the test robustness and sensitivity with the commercially available Leprosy Genesig Standard Kit (Primerdesign Ltd., UK). The proposed approach uses real time PCR of non-coding repeating element RLEP, unique for the *M. leprae* genome, using TaqMan probe. The high test specificity was shown using the reference DNA samples of pathogenic and conditionally pathogenic mycobacterium, as well as its comparison with single-copy genes of *M. leprae* (*rrs*, *fbp*, *MntH*) PCR detection. The use of a commercially available test system based on the single-copy *rpoB* gene detection provided 59.4% sensitivity to the detection of *M. leprae* in the clinical material, while the application of the developed approach increased this index to 96.8%. The developed PCR diagnostics test of leprosy is submitted for state clinical approval process, whereupon the practical use of the test diagnostics allows solving a wide range of tasks to identify and confirm new cases of leprosy, and monitoring both the effectiveness of leprosy treatment, and epidemiological (including transboundary) the spread of the disease.

Key words: leprosy, *Mycobacterium leprae*, real-time PCR, RLEP

For citation: Obraztsova O.A., Verbenko D.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Kubanov A.A., Deryabin D.G. The refinement of leprosy PCR diagnostics by the amplification of specie-specific repeated fragment of the *Mycobacterium leprae* genome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (8): 511-516. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-511-516>

For correspondence: Deryabin D.G., Dr. Sci. Med., Prof., Head of Department of STD and dermatoses laboratory diagnostics; e-mail: dgderiyabin@yandex.ru

Information about authors:

Obraztcova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5728-2139>
Karamova A.E., <https://orcid.org/0000-0003-3805-8489>
Deryabin D.G., <https://orcid.org/0000-0002-2495-6694>

Verbenko D.A., <https://orcid.org/0000-0002-1104-7694>
Kubanov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>

Conflict of interests. *The authors declare that they have no conflicts of interest.*

Acknowledgment. *The study was supported by a government contract of the Russian Ministry of Healthcare (Project No. 056-00015-18-00).*

Received 28.03.2018
Accepted 03.04.2018

Введение. Лепра (проказа; болезнь Гансена; А30 по МКБ10) – инфекционный гранулематоз, вызываемый *Mycobacterium leprae*. В 2016 г. Всемирная организация здравоохранения сообщила о 216 108 новых случаях лепры, наиболее часто регистрируемых в Бразилии, Индии, ряде государств Экваториальной Африки и Юго-Восточной Азии [1]. Отражением актуальности профилактики, раннего выявления и эффективного лечения лепры явилась разработка целевой стратегии ВОЗ на 2016-2020 годы [2], определяющей основные приоритеты эффективного противодействия этому заболеванию.

В Российской Федерации заболеваемость лепрой на протяжении ряда последних лет имела спорадический характер: в период с 1996 по 2007 г. диагностировано лишь 43 новых случая данного заболевания [3], а в дальнейшем этот показатель находился на нулевых значениях. Вместе с тем активизировавшиеся с начала XXI века миграционные потоки сформировали риски трансграничного переноса *M. leprae* из стран с эндемичными очагами лепры. В этой связи Приказом Министерства здравоохранения РФ от 29 июня 2015 г. № 384н¹ лепра наряду с сифилисом, ВИЧ-инфекцией и туберкулезом включена в перечень инфекционных заболеваний, подлежащих контролю у иностранных граждан и лиц без гражданства, претендующих на проживание или работу в Российской Федерации.

Диагностика лепры не представляет трудностей лишь при поздних стадиях, тогда как выявление ранних форм данного заболевания представляет существенно более сложную задачу и требует интегрального учёта характера кожных проявлений, поражения периферической нервной системы, а также наличия специфических гистологических изменений с обнаружением кислотоустойчивых бактерий (длина 1–8 мкм, ширина 0,3–0,5 мкм) в скарификатах кожи и биоптатах [4]. При этом основной метод лабораторной диагностики при лепре – бактериоскопическое исследование – не всегда информативен, так как требует присутствия значительного количества патогенных бактерий (10⁴ на 1 г ткани), а также не позволяет распознать плеоморфные клетки *M. leprae* в покоем состоянии [5]. В результате до половины случаев лепры остаются нераспознанными, что делает их потенциальным источником заражения для окружающих [6].

В связи с невозможностью культивирования *M. leprae* в системах *in vitro* альтернативные методы обнаружения этого возбудителя основываются на анализе генома с использованием ДНК-технологий, в первую очередь полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе ПЦР в реальном времени [7]. Важным условием для этого стало полногеномное секвенирование

M. leprae [8], определившее ряд видоспецифичных генов, пригодных для проведения ДНК-идентификации [9]. В частности, коммерчески доступный набор для диагностики лепры «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания) основан на использовании праймеров к видоспецифичному гену *rpoB*, кодирующему бета-субъединицу РНК-полимеразы *M. leprae* [10]. В Российской Федерации для решения подобной задачи предложены праймеры и зонды к гену *16S rRNA*, обеспечивающие обнаружение генетического материала *M. leprae* в формате ПЦР в реальном времени [11], однако основанный на этом ПЦР-тест до настоящего времени ещё не производится.

Другая возможность идентификации ДНК *M. leprae* определяется обнаружением в её геноме множества некодирующих повторяющихся нуклеотидных последовательностей, объединяемых в четыре семейства (*RLEP*, *REPLEP*, *LEPREP*, *LEPRPT*) и отсутствующих у других представителей семейства *Mycobacteriaceae* [12, 13]. При этом совокупность накапливающихся данных свидетельствует о преимуществах использования подобных повторяющихся элементов с наибольшим показателем копийности (в частности, *RLEP*) в качестве перспективных мишеней для ДНК-диагностики лепры [9, 14].

Целью настоящей работы явилось совершенствование ПЦР-метода обнаружения генетического материала *M. leprae* и сравнение его диагностической эффективности с коммерчески доступным ДНК-тестом при анализе клинического материала от пациентов с диагнозом «А.30. Лепра», зарегистрированных в Российской Федерации в 2015–2017 гг.

Материал и методы. При разработке метода использован референсный образец генетического материала *M. leprae*, а в качестве объектов сравнения – ДНК лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и ряда условно-патогенных микобактерий (*M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. avium* и *M. fortuitum*), любезно предоставленных ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук.

Лабораторные испытания проведены с использованием образцов клинического материала больных лепрой, выявленных в Российской Федерации в 2015–2017 гг. Пациентка А, 1967 года рождения, жительница Астраханской области, первично выявлена в ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава России 25.09.2015 г. [15]. Диагноз «А30.5 Лепроматозная лепра, лепра LL (лепра мультибациллярная, лепроматозная форма, активная стадия)» основан на данных клинического осмотра и результатах бактериоскопического исследования. Пациентка Б, 1940 года рождения, уроженка Республики Коми, находилась на обследовании в Сергиево-Посадском филиале ФГБУ «ГНИЦДК» Минздрава России 25.04.2016 г., где на основании клинического, патоморфологического и молекулярно-генетического исследования ей был поставлен диагноз «А30.5 Лепроматозная лепра, лепра LL (лепра мультибациллярная, лепроматозная форма, активная стадия). Рецидив» (первичный диагноз 27.04.1995 г.). Подробное описание данного случая представлено нами ранее [16]. Третий случай лепры, протекавшей под «маской» туберкулёза кожи, описан нами 14.03.2017 г. у пациентки В., 1948 года рождения, жительницы Московской области [17]. На основании жалоб, анамнеза, данных осмотра

¹Приказ Министерства здравоохранения РФ от 29 июня 2015 г. № 384н «Об утверждении перечня инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих и являющихся основанием для отказа в выдаче либо аннулирования разрешения на временное проживание иностранных граждан и лиц без гражданства или вида на жительство, или патента, или разрешения на работу в Российской Федерации, а также порядка подтверждения их наличия или отсутствия, а также формы медицинского заключения о наличии (об отсутствии) указанных заболеваний»

Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов (TaqMan-проб), использованных для обнаружения генетического материала *M. leprae*

| Участок генома <i>M. leprae</i> | Тип праймера или зонда | Последовательность 5'-3' | Источник |
|---------------------------------|------------------------|----------------------------------|----------|
| <i>rrs</i> | Прямой | CGGAAAGGTCTCTAAAAAATCTT | [18] |
| | Обратный | CATCCTGCACCCGCAAAAAGCTT | |
| | TaqMan-проба | FAM-AATACCGGATAGGACTTCAAGGC-BHQ1 | |
| <i>fbp</i> | Прямой | CCTTACTAGCGAGCTGCCTA | [19] |
| | Обратный | GCC AGCATAGATGAACTGATC | |
| | TaqMan-проба | FAM-CTCTCGATGGCCGGTTCCTCGG-BHQ | |
| <i>mntH</i> | Прямой | CGGCTCACGTCCAGTTTCTTC | [20] |
| | Обратный | TAAGTGCCCTCGATGTAAGCGG | |
| | TaqMan-проба | FAM-CCTACTGCCGCGCTCCAGG-BHQ1 | |
| <i>RLEP</i> | Прямой | GCAGCAGTATCGTGTTAGTGAA | [25] |
| | Обратный | CGTAGAAGGTTGCCGAT | |
| | TaqMan-проба | FAM-CGCCGACGGCCGGATCATCGA-BHQ1 | |

и физикального и клинико-лабораторного обследования установлен диагноз «А30.3 Пограничная лепра, лепра ВВ (лепра мультибациллярная, пограничная форма, активная стадия)». Полученные от данных пациентов образцы клинического материала (биоптаты кожи) гомогенизировали с использованием автоматической станции TissueLyser II (Qiagen, Германия), после чего выделение ДНК проводили с использованием набора «Проба-НК» (ДНК-технология, Россия) согласно протоколу производителя.

С целью определения оптимальной ДНК-мишени для обнаружения генетического материала *M. leprae* методом ПЦР в реальном времени использовали праймеры и флуоресцентные зонды, последовательности которых приведены в таблице. Конструкция ДНК-зондов, изготовленных по технологии TaqMan-проб, включала флуорофор FAM на 5'-конце олигонуклеотида и гаситель флуоресценции BHQ на 3'-конце. Перечень тестируемых видоспецифичных генов включал *rrs*, кодирующий 16S rRNA данного микроорганизма [18]; *fbp* – ген, кодирующий фибронектин-связывающий белок Ag85B [19] и *mntH*, кодирующий Mn²⁺-транспортный белок *M. leprae* [20]. Аналогичные праймеры и зонды синтезированы к *RLEP*-некодирующей повторяющейся последовательности, присутствующей в геноме *M. leprae* в количестве до 39 копий [21].

Аmplification референсных образцов ДНК и клинических изолятов проводили в идентичных условиях с использованием прибора Quant Studio 5 (Applied Biosystems, США) в пробирках вместимостью 0,2 мл фирмы Ахуген (США). Реакцию осуществляли в 20 мкл смеси, включающей 0,1 мкМ каждого праймера и TaqMan-пробы в объеме 1 мкл; 5 мкл реакционной смеси для ПЦР из коммерчески доступного набора фирмы ЗАО «Евроген» (Россия), а также деионизированную воду. Программа амплификации включала первоначальную денатурацию ДНК в течение 5 мин при температуре 95°C с последующим проведением 40 циклов, состоящих из денатурации при температуре 94°C в течение 10 с, отжига праймеров при 52°C в течение 35 с и элонгации при 72°C в течение 1 мин. Накопление флуоресцентного сигнала, выражаемого значениями RFU (англ. - relative fluorescence units) и сопровождающегося разрушением TaqMan-проб

5'-3'-экзонуклеазной активностью Taq-полимеразы, происходило в режиме реального времени.

Сравнительное ПЦР-исследование клинических образцов проведено с использованием коммерчески доступного набора «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания).

Чувствительность диагностического исследования с использованием известного и предложенного ПЦР-методов оценена в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008².

Результаты. Графики интенсивности флуоресцентного сигнала, накапливаемого в ходе проведения ПЦР в реальном времени с референсными образцами ДНК *M. leprae* и других микобактерий, представлены на рис. 1. Результаты ПЦР в каждой серии экспериментов охарактеризованы значением *Ct* (англ. threshold cycle) – величиной порогового цикла, на котором кривая накопления флуоресцентного сигнала превышала базовый уровень.

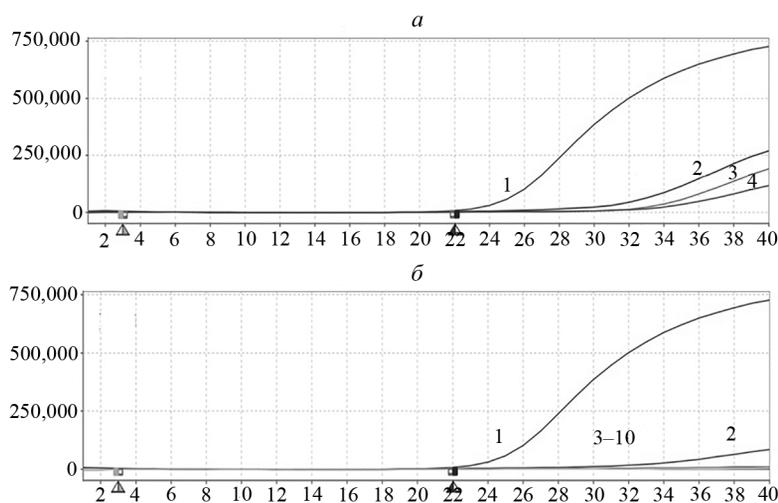


Рис. 1. Графики накопления интенсивности флуоресцентного сигнала (по оси ординат) в зависимости от количества циклов амплификации (по оси абсцисс) при исследовании референсных образцов ДНК.

a - амплификация референсного образца ДНК *M. leprae* с использованием праймеров и зондов к *RLEP* (1), гену *MntH* (2), гену *rrs* (3), гену *fbp* (4); *b* - результат использования праймеров и зондов к *RLEP* при амплификации референсного образца ДНК *M. leprae* (1) и некоторых других микобактерий: *M. avium complex* (2); *M. tuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *xenopi*, *M. gordoniae*, *M. fortuitum* (3-10).

²ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

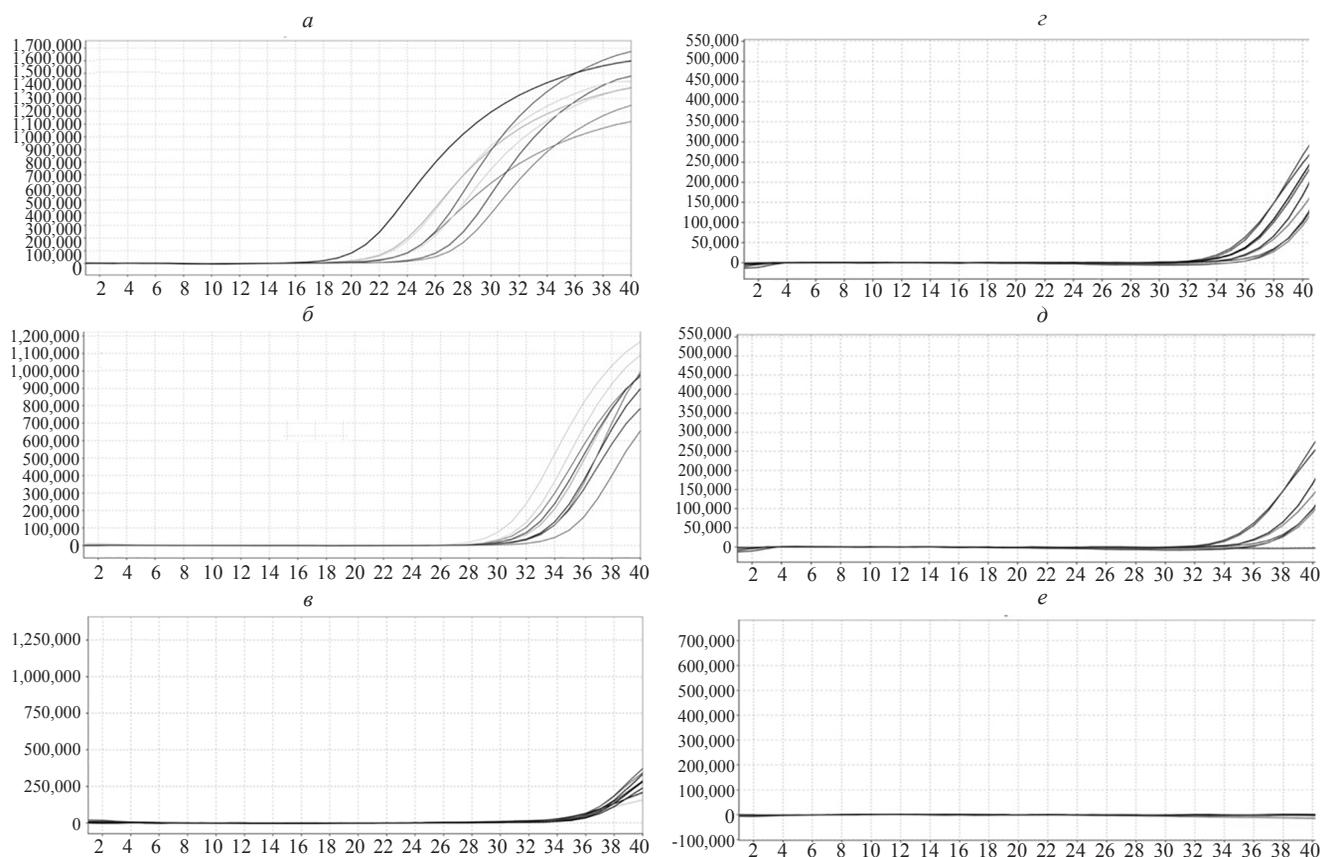


Рис. 2. Графики накопления интенсивности флуоресцентного сигнала (по оси ординат) в зависимости от количества циклов амплификации (по оси абсцисс) при исследовании клинических образцов от пациентов с диагнозом «А30. Лепра».

a, c - клинический материал пациентки А.; *б, d* - клинический материал пациентки Б.; *в, e* - клинический материал пациентки В.

Слева - результаты использования праймеров и зондов к *RLEP*; справа - результаты использования тест-системы «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания).

При амплификации некодирующего повторяющегося фрагмента *RLEP* была получена типичная сигмообразная форма накопления сигнала с быстрым и выраженным ростом флуоресценции, характеризуемая $Ct = 24$. Детекция последовательностей, расположенных в генах *rrs*, *fbp* и *mntH*, представленных в геноме *M. leprae* одиночными копиями, оказалась менее эффективной, приводя к значениям $Ct \geq 33$ (рис. 1, *a*).

Сравнительный анализ генетического материала других патогенных и условно-патогенных представителей семейства *Mycobacteriaceae* (рис. 1, *б*) подтвердил возможность специфичного обнаружения ДНК *M. leprae* с использованием праймеров и зондов к фрагменту *RLEP*. Время начала быстрого накопления флуоресценции для *M. leprae* не сопровождалось появлением сигнала в пробах с ДНК *M. tuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. goodii* и *M. fortuitum* по крайней мере на протяжении 15 циклов амплификации. Единственным исключением стала проба ДНК *M. avium complex*, увеличение сигнала флуоресценции продукта ПЦР в которой формировалось, однако только на очень поздних циклах амплификации ($Ct \geq 36$) с минимальными отличиями от базового уровня.

Полученные данные свидетельствовали в пользу высокой чувствительности и специфичности предложенного варианта ПЦР-анализа, выполняемого с использованием праймеров и зондов к фрагменту *RLEP*, что послужило основанием для

применения данного подхода в отношении образцов клинического материала больных лепрой, выявленных в Российской Федерации в 2015–2017 гг.

Анализ клинического материала пациентки А. (рис. 2, *a*) с использованием предложенного метода позволил детектировать присутствие генома *M. leprae* во всех представленных для исследования биологических образцах, по результатам микроскопического исследования на кислотоустойчивые бактерии характеризуемых бактериоскопическим индексом (БИИ) 3,67. При этом определенные значения Ct варьировали от 20 до 28, оказываясь минимальными в биоптатах из кожных очагов и максимальным – в пробе со слизистой носа, часто используемой в качестве теста на инфицирование *M. leprae*. Анализ тех же проб с использованием коммерчески доступного теста «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания) также приводил к положительному результату ПЦР во всех представленных образцах, однако значения Ct в данном случае находились в пределах диапазона 33–37, оставаясь минимальными при исследовании биоптатов кожи и максимальными – при исследовании пробы со слизистой носа (рис. 2, *c*).

Использование предложенного варианта ПЦР для исследования клинического материала пациентки Б. с присутствием немногочисленных кислотоустойчивых микобактерий (БИИ 2+) также позволило оценить все представленные пробы как положительные (рис. 2, *б*). При этом значения Ct варьировали от 28 до 34, что согласовывалось с данными о менее значительной бактериальной обсемененности клини-

ческого материала пациентки Б. На этом фоне использование коммерчески доступного ПЦР-теста с праймерами и зондом к гену *rhoB* позволяло обнаружить генетический материал *M. leprae* в девяти из 10 представленных образцов, с превышением базового уровня флуоресценции лишь на 34–39-м циклах амплификации (рис. 2, д).

В образцах клинического материала пациентки В. предвительно выявлялись единичные гомогенные и фрагментированные кислотоустойчивые микобактерии (БИН 0,3+). При использовании тест-системы «Leprosy genesig Standard Kit» не обнаруживали присутствия *M. leprae* ни в одной из исследованных проб (рис. 2, е), что входило в противоречие с результатами клинического и лабораторного обследования [17]. С другой стороны, применение предложенного метода, хотя и с достижением значения *Ct* на поздних, 36–38-м циклах амплификации, всё-таки позволило выявить наличие генетического материала *M. leprae* в 11 из 12 исследованных проб (рис. 2, в).

Интегральный показатель чувствительности лабораторного исследования с использованием коммерчески доступного теста, основанного на амплификации однокопийного видоспецифичного гена *rhoB*, составил 59,4%, в то время как предложенный вариант ПЦР-анализа с амплификацией некодирующего повторяющегося элемента *RLEP* повышал этот показатель до 96,8%. Дополнительным результатом явилась предварительная констатация обратной зависимости достигаемых значений *Ct* от интенсивности бактериальной обсеменённости исследуемого материала, а также демонстрация возможности использования предложенного метода при детекции следовых количеств *M. leprae*, размножение которых было частично подавлено противотуберкулёзными препаратами, назначенными пациенту В. на основании первичного (ошибочного) диагноза туберкулёза кожи [17].

Обсуждение. Метод ПЦР-диагностики лепры впервые был предложен более 25 лет назад [22, 23] и в дальнейшем неоднократно совершенствовался [9, 14, 24]. Важным техническим улучшением стало использование технологии ПЦР в реальном времени, в том числе с применением флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов (TaqMan-проб) [13, 18–20, 25]. Существенный прогресс в ДНК-диагностике лепры произошёл после полногеномного секвенирования возбудителя лепры – *M. leprae* [8]. По его результатам было предложено несколько новых мишеней для ПЦР-анализа [7, 26], среди которых наиболее перспективными считаются видоспецифичные некодирующие элементы, представленные в геноме *M. leprae* в количестве до нескольких десятков копий [9, 13, 14].

Проведённое исследование подтвердило эту возможность, развивая представления о *RLEP* – некодирующем повторяющемся элементе генома *Mycobacterium leprae* с наибольшим показателем копийности (до 39 копий на геном) как перспективной мишени для ДНК-диагностики лепры. Полученные результаты продемонстрировали высокую специфичность разработанного варианта ПЦР-анализа, детектирующего исключительно генетический материал возбудителя лепры, при реактивности с референсными образцами ДНК других патогенных и условно-патогенных микобактерий [27]. Кроме того, существенным положительным эффектом использования данного подхода стало значительное повышение чувствительности ПЦР,кратно превосходящее таковую при использовании в качестве мишеней однокопийных генов и позволяющее детектировать фемтограммовые количества ДНК *M. leprae*. В этой связи следует отметить, что определённая нами эффективность ПЦР с использованием праймеров и зондов к фрагменту *RLEP* в том числе превосходила таковую при амплификации последовательности гена *rrs* (16S rRNA), ранее предложенного в качестве мишени для амплификации российскими исследователями [11].

Использование разработанного метода при обследовании пациентов с клиническим диагнозом «А30. Лепра», выявленных в Российской Федерации в 2015–2017 гг. [16, 17] подтвердило его практическую применимость, а сравнение полученных данных с результатами использования коммерчески доступного ПЦР-теста «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания) явилось свидетельством повышенной диагностической чувствительности предложенного подхода. При этом наиболее вероятной причиной достигнутого положительного эффекта является кратное увеличение количества мишеней для амплификации в геноме одной бактериальной клетки, что в итоге позволяет получать положительные результаты ПЦР в биологических пробах с минимальным присутствием *M. leprae* вплоть до образцов с нулевыми значениями бактериоскопического индекса [27].

Объективные ограничения, определяемые небольшим количеством обследованных пациентов и представленных для исследования образцов клинического материала, не позволили в рамках настоящего исследования подробно оценить дополнительные диагностические возможности метода. В то же время сопоставление полученных и литературных данных указывает на высокую степень соответствия результатов ПЦР-анализа показателям бактериоскопического исследования [25], а также на различную чувствительность разработанного метода при оценке мульти- или олигобациллярных форм лепры [27].

Полученные результаты позволяют рекомендовать применение метода ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зондов к повторяющемуся некодирующему элементу генома *Mycobacterium leprae* – *RLEP* в качестве технологического и чувствительного метода лабораторной диагностики, потенциально решающего широкий круг задач по выявлению и подтверждению новых случаев лепры, мониторинга эффективности проводимого лечения, а также эпидемиологического (в том числе трансграничного) мониторинга распространения данного заболевания. Разработанная на этой основе тест-система для ДНК-диагностики лепры представлена для государственной регистрации и в ближайшей перспективе должна стать доступной для практического применения в диагностической практике заинтересованных клиничко-диагностических лабораторий.

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке Минздрава РФ (Государственное задание № 056-00015-18-00 на 2018 г. и плановый период 2019 и 2020 гг.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 5, 7-10, 12-14, 18-28 см. REFERENCES)

- Ющенко А.А., Урляпова Н.Г., Дуйко В.В. Анализ и прогноз эпидемиологической ситуации по лепре в России (по материалам 1951-2000 гг.): аналитический обзор. Астрахань: НИИ по изучению лепры; 2002.
- Скрипкин Ю.К., Бутов Ю.С., Иванов О.Л. Дерматовенерология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
- Дуйко В.В. Особенности организации противолепрозных мероприятий в России на современном этапе. *Проблемы социальной гигиены и история медицины*. 2013; 2: 31 – 2.
- Сароянц Л.В., Арнаутова К.Ш., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции. *Клиническая лабораторная диагностика* 2018; 63 (1): 55-9.
- Выявлен новый случай заболевания лепрой в запущенной стадии. ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России. Available at: http://www.inlep.ru/news/detail.php?ELEMENT_ID=51 (accessed 16 Mar 2018)

16. Кубанов А.А., Карамова А.Э., Семенова В.Г., Смольяникова В.А., Нефедова М.А. Рецидив лепры, развившийся после прекращения противолепрозной терапии. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2016; 6: 66-72.
 17. Семенова В.Г., Карамова А.Э., Нефедова М.А. Лепра под «маской» туберкулеза кожи — трудности диагностики. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2017; 6: 91-9. 66-72.
 18. Braet S., Vandelanoot K., Meehan C.J., Brum Fontes A.N., Hasker E., Rosa P.S., Lucena-Silva N., Rigouts L., Suffys P.N., De Jong B.C. The repetitive element RLEP is a highly specific target for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(3). pii: e01924-17.
 19. A new case of leprosy in a neglected stage was revealed. FGBU “Research Institute for the Study of Leprosy” of the Ministry of Health of Russia. Available at: http://www.inlep.ru/news/detail.php?ELEMENT_ID=51 (accessed 28 Mar 2018) (in Russian)
 20. Kubanov A.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Smolyannikova V.A., Nefedova M.A. Lepra recurrent developed after termination of antileprotic therapy. *Vestnik dermatologii i venerologii*; 2016; (6): 66-72. (in Russian)
 21. Semyonova V.G., Karamova A.E., Nefyodova M.A. Leprosy in the Guise of Skin Tuberculosis — Complexities of Diagnostics. *Vestnik dermatologii i venerologii*; 2017; (6): 91-9. (in Russian)
 22. Kamble R.R., Shinde V.S., Madhale S.P., Kamble A.A., Ravikumar B.P., Jadhav R.S. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. *Indian J. Med. Microbiol.* 2010; 28(1): 57-9.
 23. De Wit T.F.R., Bekelie S., Osland A., Wiele B., Janson A., Thole J. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. *Infection and Immunity*. 1993; 61: 3642-7.
 24. Cruz A.F., Furini R.B., Roselino A.M. Comparison between microsatellites and MIMnH gene as targets to identify *Mycobacterium leprae* by PCR in leprosy. *An. Bras. Dermatol.* 2011; 86(4): 651-6.
 25. Lavania M., Jadhav R., Turankar R.P., Singh I., Nigam A., Sengupta U. Genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from a region of high endemic leprosy prevalence in India. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 36: 256-61.
 26. Hartskeerl R.A., de Wit M.Y., Klatser P.R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135: 2357-64.
 27. Woods S.A., Cole S.T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989; 53: 305-9.
 28. Martinez A.N., Talhari C., Moraes M.O., Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(4): e2655.
 29. Martinez A.N., Lahiri R., Pittman T.L., Scollard D., Truman R. et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 2124-30.
 30. Donoghue H.D., Holton J., Spigelman M. PCR primer that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(2): 177-82.
 31. Azevedo M.C., Ramuno N.M., Fachin L.R., Tassa M., Rosa P.S., Belone A.F., Diório S.M., Soares C.T., Garlet G.P., Trombone A.P. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz. J. Infect. Dis.* 2017; 21(1):71-8.
-
- REFERENCES
1. World health organization/Leprosy. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/> (accessed 28 Mar 2018).
 2. WHOSEARO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases Operational Manual 2016 – Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world. Eds: Dr E. A. Cooreman/ Leprosy. 2016; 62. ISBN: 978 92 9022 525 6.
 3. Yushchenko A. A., Urylapova N. G., Duyko V. V. Analysis and Forecast of the Leprosy Epidemiological Situation in Russia [Analiz I prognoz epidemiologicheskoy situatsii po lepere v Rossii] (po materialam 1951-2000 gg.): analiticheskiy obzor. Astrakhan’: NII po izucheniyu lepry; 2002; 43. (in Russian)
 4. Skripink Yu.K., Butov Yu.S., Ivanov O.L. Dermatovenerology. National leadership [Dermatovenerologiya. Natsional’noe rukovodstvo]. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
 5. Lipworth S., Hammond R., Baron V., Hu Y., Coates A., Gillespie S. Defining Dormancy in mycobacterial disease. *Tuberculosis*. 2016;
 6. Duyko V.V. Features of the organization of anti leprosy arrangements in Russia at the present stage. *Problemy sotsial’noy gigieny i istoriya meditsiny*. 2013; 2: 31-2. (in Russian)
 7. Truman R.W., Andrews P.K., Robbins N.Y., Adams L.B., Krahenbuhl J.L., Gillis T.P. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008; 2(11): e328. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328>
 8. Cole S.T., Eiglmeier K., Parkhill J., James K.D., Thomson N.R. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001; 22: 409 (6823): 1007-11.
 9. Benjak A., Avanzi C., Singh P., Loiseau C., Girma S., Busso P. et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Communications*. 2018; 9; Article number: 352.
 10. *Mycobacterium leprae* & M. lepromatosis genesig kit. Available at: <http://www.genesig.com/products/9333-mycobacterium-leprae-m-lepromatosis> (accessed 28 Mar 2018).
 11. Saroyants L.V., Arnaudova K.Sh., Abramov D.D., Trofimov D.Yu. The development of laboratory diagnostics of leprosy with the help of polymerase chain reaction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (1): 55-9. (in Russian)
 12. Cole S.T., Supply P., Honore N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr. Rev.* 2001; 72(4): 449-61.
 13. Turankar R.P., Pandey S., Lavania M., Singh I., Nigam A., Darlong J., Darlong F., Sengupta U. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *Mycobacterium leprae* DNA from clinical and environmental samples. *Int. J. Mycobacteriol.* 2015; 4(1): 54-9.