

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.873.211-078

Сароянц Л.В.¹, Арнаудова К.Ш.¹, Абрамов Д.Д.², Трофимов Д.Ю.²

РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

¹ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава РФ, 414057, Астрахань, Россия;

²ООО «НПФ ДНК-Технология», 115478, Москва, Россия

Цель исследования — разработка методов лабораторной диагностики лепры на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Отработаны методы экстракции ДНК из различного клинического материала (биоптаты и скарификаты кожи, соскобы со слизистой поверхности носа и с трофических язв, сыворотки крови). Сконструированы системы олигонуклеотидов к 16S рРНК и зонда для идентификации Mycobacterium leprae в формате Real-time для амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), отработан оптимальный режим амплификации. Для контроля за ходом ПЦР вводили систему внутреннего контроля. Оценка специфичности и чувствительности тест-системы проводилась на 17 штаммах различных видов микобактерий и клинических образцах от 32 больных лепрой и 15 здоровых лиц, находящихся в семейном контакте с больными лепрой. Установлена 100% чувствительность обнаружения Mycobacterium leprae в биоптатах кожи методом ПЦР по сравнению со стандартным бактериоскопическим методом (88,9%). Во всех других клинических образцах также определялась более высокая чувствительность разработанной тест-системы на основе ПЦР. Предложенная тест-система обладает высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет решить вопрос быстрой идентификации Mycobacterium leprae, и может быть использована в эпидемиологических исследованиях при изучении распространения возбудителя заболевания.

Ключевые слова: Mycobacterium leprae; тест-система; Real-time ПЦР; биоптаты; скарификаты.

Для цитирования: Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (1): 55-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-55-59>

Saroyants L.V.¹, Arnaudova K.Sh.¹, Abramov D.D.², Trofimov D.Yu.²

THE DEVELOPMENT OF LABORATORY DIAGNOSTIC OF LEPROSY USING POLYMERASE CHAIN REACTION

¹Leprosy research institute of Minzdrav of Russia, 414057 Astrakhan, Russia

²DNA-Technology LLC, 115478 Moscow, Russia

The purpose of study is to develop techniques of laboratory diagnostic of leprosy on the basis of polymerase chain reaction. The techniques were worked through such as extraction of DNA from various clinical material (bioplates and scarificate of skin, scrapes from mucous surface of nose and trophic ulcers, blood serum). The systems of oligonucleotides were constructed to 16S pRNA and probe for identification of Mycobacterium leprae in real-time format for amplifier DT-96 ("The DNA-Technology", Russia). The optimal regimen of amplification was worked out. To control polymerase chain reaction processing a system of internal control was introduced. The evaluation of specificity of test-system was implemented using 17 strains of various types of mycobacteria and clinical samples from 32 patients with leprosy and 15 healthy individuals being in family contact with patients with leprosy. The 100% sensitivity was established concerning detection of Mycobacterium leprae in bioplates of skin using polymerase chain reaction technique as compared with standard bacterioscopic technique (88.9%). In all other clinical samples, a higher sensitivity of developed test-system on the basis of polymerase chain reaction was detected too. The proposed test-system has higher sensitivity and specificity that permits to resolve an issue of fast identification of Mycobacterium leprae. It can be applied in epidemiological studies at investigation of prevalence of agent of disease.

Key words: Mycobacterium leprae; test-system; polymerase chain reaction in real-time; bioplate; scarificate

For citation: Saroyants L.V., Arnaudova K.Sh., Abramov D.D., Trofimov D.Yu. The development of laboratory diagnostic of leprosy using polymerase chain reaction. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63 (1): 55-59. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-55-59>

For correspondence: Saroyants L.V., doctor of medical sciences, leading researcher, the head of the laboratory experimental department of the Federal state budget scientific institution "Leprosy Research Institute ". e-mail: luda_saroyants@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 31.07.2017
Accepted 01.08.2017

Для корреспонденции: Сароянц Людмила Валентиновна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторно-экспериментальным отделом ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава РФ; e-mail: luda_saroyants@mail.ru

Введение. Лепра — инфекционное заболевание, вызываемое микобактериями лепры, отличающееся упорным хроническим, прогрессирующим течением и характеризующееся поражением кожи, периферической нервной системы и внутренних органов. Несмотря на долгую историю заболевания, известную с библейских

времен [1], ранняя диагностика лепры по-прежнему остается серьезной проблемой из-за низкой чувствительности стандартных методов диагностики и невозможности культивирования микобактерий лепры.

Возбудителем заболевания является *Mycobacterium leprae*, открытая Хансеном в 1874 г. [2], она относится к роду *Mycobacterium*, семейству *Mycobacteriaceae*, порядку *Actinomycetales* и классу *Actinomycetes* [3]. Наружный слой представлен электронно-плотной микрокапсулой толщиной от 5 до 15 нм, состоящей из мукополисахаридов, что определяет антигенность *M. leprae* и формирование лекарственной устойчивости. Под микрокапсулой находится трехслойная клеточная стенка толщиной от 8 до 20 нм, к которой примыкает трехслойная цитоплазматическая мембрана. Способ размножения *M. leprae*, как правило, поперечное деление, скорость одного деления около 12 сут. Основной путь распространения лепры — воздушно-капельный.

Попытки культивирования *M. leprae* и заражение лепрой экспериментальных животных начались сразу после открытия возбудителя и продолжаются до настоящего времени. Особое место среди экспериментальных моделей заняла модель, предложенная С. Shepard в 1960 г. [4]. Моделирование заключалось в заражении мышей дозированным количеством *M. leprae* в подушечки лапок и дальнейшим размножением микобактерий в месте инокуляции. После завершения эксперимента (период 8—12 мес) подсчитывалось число микобактерий в лапке по методу С. Shepard и D. McRae [5] и сравнивалось с числом введенных микобактерий. Несмотря на то что данная модель общепризнана и занимает значимое место в экспериментальной лепрологии, особенно при изучении новых лекарственных препаратов и получении антигенного материала, она имеет и ряд недостатков: длительность эксперимента из-за медленного локального размножения микобактерий, а также отсутствие генерализации процесса. Кроме того, при моделировании лепрозной инфекции не было возможности с достаточной степенью достоверности подтвердить, что микобактерии, пассируемые на животных, идентичны микобактериям, выделенным от больного лепрой. Поэтому вопрос идентификации микобактерий при смене организма-хозяина является актуальным.

Лепра представляет собой сложный спектр клинических форм, которые развиваются после инкубационного периода длительностью от 2 до 30 лет [6]. В клинической практике диагноз основывается на оценке кожных проявлений, гистологическом исследовании образцов кожи и положительном бактериоскопическом анализе (мазок по Цилю—Нильсену). Однако чувствительность бактериоскопического анализа невелика, что существенно затрудняет диагностику лепры на ранних стадиях болезни и при малобактериальных формах 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 (*Dasypus novemcinctus*) [8, 9], обитающие в Южной Америке.

По данным ВОЗ ежегодно в мире регистрируются около 300 тыс новых случаев заболевания лепрой [10]. В нашей стране в последние годы отмечается значительное снижение числа зарегистрированных больных лепрой, при этом поток мигрантов из эндемичных по ле-

пре стран увеличивается. Значительный полиморфизм клинических проявлений, разнообразный характер течения, а также длительный инкубационный период практически исключают возможность постановки диагноза на ранних стадиях болезни. В связи с этим диагностика лепры остаётся актуальной проблемой для общественного здравоохранения. Решению проблем идентификации возбудителя инфекционных заболеваний, особенно некультивируемых форм, помогли разработанные в последнее время молекулярно-генетические методы, которые открыли принципиально новые возможности для создания высокочувствительных и специфичных методов диагностики вирусных и бактериальных заболеваний, в том числе и лепры [11—15].

Цель данного исследования — сконструировать систему олигонуклеотидов для идентификации *M. leprae*, отработать методы пробоподготовки, экстракции ДНК из различного клинического материала, режимы ПЦР-амплификации ДНК, и апробировать чувствительность и специфичность разработанной тест-системы.

Материал и методы. Для оценки чувствительности и специфичности разработанной тест-системы использовали ДНК из клеток различных видов организмов: *M. intracellulare*, *M. Кедровского (белый утам)*, *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 утам)*, *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis*.

Выделение ДНК проводили тремя методами: М1 — с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-НК» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия); М2 — использовали комплект реагентов «ПРОБА-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия); М3 — автоматический методом выделения ДНК набором реагентов (GXT DNA/RNA GenoExtraction Kit, «Hain Lifescience», Германия) на станции GenoXtract («Hain Lifescience», Германия), при котором микобактерии связываются с магнитными частицами, происходит лизис и осаждение ДНК на частицах, а последующей магнитной сепарацией и удалением остатков клеток, отмывкой и переносом образцов в пробирки. Процедура пробоподготовки и метода экстракции зависели от природы исследуемого образца.

Соскоб со слизистой носа и с поверхности трофических язв производили с помощью стерильных одноразовых зондов. Биоптат кожи после иссечения разрезали на мелкие кусочки и гомогенизировали. При взятии скарификатов на пораженных участках кожи скальпелем делали небольшой разрез (глубиной 1—2 мм) и стерильным одноразовым зондом собирали тканевую жидкость. Все пробы после забора материала помещали в пробирки с 300 мкл стерильного физиологического раствора.

Выбор олигонуклеотидных праймеров для ПЦР осуществлялся путём анализа последовательностей ДНК *M. leprae*, полученных из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), а также с использованием данных литературы [16—18]. 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.

Синтез праймеров и олигонуклеотидных флуоресцентномеченых зондов для ПЦР в реальном времени проводили на синтезаторах ДНК ASM-800 и ASM-102 (Россия, Новосибирск), позволяющих синтезировать

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)	

как экспериментальные (20 нмоль), так и препаративные количества (0,5 мкмоль). Использовали флуорофоры (FAM, HEX) и гасители флуоресценции (BHQ1), синтезированные в лаборатории изотопных методов анализа Института биоорганической химии им. академикова М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Олигонуклеотиды очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием обращеннофазных колонок Диасфер-110-С18 (Россия). Чистоту полученных олигонуклеотидов контролировали методом аналитического вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле (табл. 1).

ПЦР проводили в 35 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл образца ДНК и следующие компоненты: 10 пмоль каждого праймера; 1,1 мкмоль каждого dNTP; 64 мкмоль TRIS-HCl (pH 8,6); 25 мкмоль (NH₄)₂SO₄; 2,5 мкмоль — MgCl₂, а также 5 единиц Taq-полимеразы. Для предотвращения изменения концентрации компонентов реакционную смесь покрывали 20 мкл минерального масла. Для осуществления «горячего старта» и предотвращения неспецифического отжига праймеров использовали парафиную прослойку, разделяющую компоненты реакционной смеси.

Отработанный режим амплификации: 80°C — 30 с, 94°C — 1 мин 30 с 1 цикл; 94°C — 30 с, 64°C — 15 с 5 циклов; 94°C — 10 с, 64°C — 15 с 45 циклов; 10°C — хранение. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология, Россия») для дальнейшей постановки в электрофорезе. Учёт реакции проводился в трансиллюминаторе. При использовании ПЦР в реальном времени амплификация и детекция ДНК проводили в амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). 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.

Метод ПЦР был апробирован 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 (47), скарификаты кожи (54), соскобы с трофических язв (15) и сыворотки крови (29). Всего исследовано 148 образцов диагностического материала. Одновременно одни и те же образцы исследовали различными методами. У группы больных диагноз подтверждён клинически, бактериоскопически и гистологически.

Результаты. Первоначально оценку специфичности

тест-системы на основе ПЦР к 16S рРНК проводили электрофоретически в агарозном геле с использованием ДНК различных видов микроорганизмов (см. выше), ДНК от больных лепрой и экспериментальных животных (модель Шепарда). В результате проведения ПЦР и последующего электрофореза был зафиксирован синтез ампликона размером 290 п.н. только в биологических образцах от больных лепрой (скарификаты и биоптаты кожи, соскобы со слизистой носа и с трофических язв). Во всех случаях результаты совпали со стандартными бактериоскопическими и гистологическими методами исследования.

После установления высокой степени чувствительности и специфичности данных праймеров была разработана последовательность флуоресцентных зондов для создания тест-системы в Real time. Клиническое апробирование тест-системы для выявления *M. leprae* методом ПЦР в реальном времени также проведено у больных лепрой и здоровых лиц, находящихся в семейном контакте с больными лепрой. Чувствительность метода зависела от характера модельного образца клинического материала (табл. 2).

Чувствительность бактериоскопического метода составила 88,9%. Самая высокая частота обнаружения ДНК *M. leprae* отмечалась в биоптатах кожи от больных лепрой, причём более эффективный метод выделения ДНК был М1. При выделении ДНК методом М1 *M. leprae* идентифицировалась во всех 18(100%) гистологически подтверждённых биоптатах кожи, методом М2 — в 17(94,4%). Таким образом, методом ПЦР *M. leprae* об-

Таблица 2

Частота выявления *M. leprae* различными методами идентификации

Клинический материал	Число исследуемых образцов	Бактериоскопия		ПЦР Real time на 16S рРНК	
		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

наруживалась 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. 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 методом М3 *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 выделялась.

Специфичность теста проверялась на биологических образцах (биоптаты, скарификаты кожи, сыворотка крови, соскобы со слизистой поверхности носа), полученных от здоровых лиц. Специфичность праймеров составила 100%. Ни в одном из образцов ДНК *M. leprae* не обнаруживалась, что и подтвердилось стандартными методами.

Таким образом, при сопоставлении результатов, полученных различными методами идентификации *M. leprae* в разных биологических образцах, метод ПЦР показал более высокую чувствительность при сравнении со стандартным бактериоскопическим исследованием. При этом 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 как для диагностики активной протекающей лепрозной инфекции, так и для выявления асимптомного носительства возбудителя у клинически здоровых людей.

Обсуждение. 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.

На данный момент охарактеризованы и используются в качестве мишени различные специфические для *M. leprae* последовательности, позволяющие дифференцировать *M. leprae* от других видов. В то же время создание

высокоспецифичной и чувствительной тест-системы на основе ПЦР для идентификации возбудителя лепры, как и для идентификации любого возбудителя инфекционного заболевания, зависит от нескольких этапов.

Первый этап — экстракция ДНК. Основной задачей на этом этапе является получение максимального количества ДНК возбудителя в зависимости от биологического образца (соскобы со слизистой носа, скарификаты и биоптаты кожи, пробы сыворотки крови от больных лепрой и здоровых) с наименьшими экономическими затратами. На этом этапе нами были отработаны три метода экстракции ДНК как отечественного, так и зарубежного производства. Показано, что все методы экстракции ДНК имеют практически сопоставимую эффективность при выделении ДНК из биоптатов после их предварительного гомогенизирования. Для разработки скринингового теста идентификации возбудителя лепры особенно важным является использование образцов, полученных неинвазивным способом, таких как соскобы со слизистой поверхности носа. В этом случае наиболее информативными оказались метод выделения с использованием спиртовой преципитации нуклеиновых кислот («ПРОБА-НК» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и метод выделения с использованием сорбента («ПРОБА-ГС» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). При экстракции ДНК из скарификатов кожи и соскобов с трофических язв эти методы также показали высокую чувствительность. Ограничением метода М3 является невозможность выделения ДНК из образцов крови и необходимость использовать для работы только наборы реагентов фирмы «Hain Lifescience» (Германия).

Второй этап — подбор специфических праймеров. Правильный выбор ДНК-мишени позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности. При лепре для идентификации *M. leprae* методом ПЦР применялись различные праймеры, в частности, фланкирующие участки генов белков 18 кДа [11], 65 кДа [12], супероксиддисмутазы *M. leprae* [13].

Однако особое внимание уделяется праймерам, фланкирующим участок гена 16S рРНК, который является компонентом микобактериальных рибосом и экспрессируется в большом количестве копий (от 10^3 до 10^4 на клетку). Бактериальный ген 16S рРНК содержит не только общие для всех бактерий последовательности, но и специфические для каждого вида [19], поэтому наиболее широко используется для идентификации бактерий. Исследования с использованием этого гена внесли большой вклад в открытие новых видов микобактерий и продолжают служить в качестве важного инструмента как альтернатива фенотипическим методам идентификации.

При выявлении *M. leprae* методом ПЦР с праймерами, фланкирующими участок гена 16S рРНК [20—24], было показано отсутствие перекрестной реакции микобактерий лепры со штаммами 22 других различных микобактерий. М. De Wit и Р. Klaster [21] сообщали, что микобактерии лепры из различных источников имеют идентичные по 16S рРНК межгенные спейсерные области.

В настоящее время на смену визуальной оценке результатов ПЦР методом электрофореза и для снижения риска контаминации уверенно приходят флуоресцентные методы детекции продуктов амплификации. Одним из таких методов является метод ПЦР в реальном времени, который стал признанным стандартом при исследовании

довании ДНК и РНК. Поэтому в дальнейшем разработка метода детекции возбудителя лепры проводилась с использованием праймеров и зондов для регистрации результатов в режиме реального времени [14, 15].

Разработанная нами тест-система на основе амплификации участка гена 16S рРНК в режиме реального времени показала высокую специфичность и чувствительность, что позволит решить вопрос быстрой идентификации *Mycobacterium leprae*, она может быть использована в эпидемиологических исследованиях при изучении распространения возбудителя заболевания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hulse E.V. Leprosy and ancient Egypt. *Lancet*. 1972; 2: 1024—5.
2. Hansen G.A. *Spedalshedens Arsager. Norsk Magazin for Laevidenskaben*. 1874; 4: 76—9.
3. Shinnick T.M., Good R.C. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microb.* 1990; 13(3): 884—901.
4. Shepard C.C. The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into footpads of mice. *J. Exp. Med.* 1960; 112: 445—54.
5. Shepard C.C., McRae D.H. A method for counting acid-fast bacteria. *Int. J. Lepr.* 1968; 36: 78—82.
6. Ridley D.S., Jopling W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr.* 1966; 34: 255—73.
7. Domínguez J., Blanco S., Lacoma A., García-Sierra N., Prat C., Ausina V. Utility of molecular biology in the microbiological diagnosis of mycobacterial infections. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 2008; 26(9): 33—41.
8. Kirchheimer W.F., Sanchez R.M. Quantitative aspects of leprosy in armadillos. *Lepr. India*. 1977; 49: 48—53.
9. Scollard D.M., Adams L.B., Gillis T.P., Krahenbuhl J.L., Truman R.W., Williams D.L. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 338—81.
10. *World Health Organization*. Global leprosy: situation 2016—2020. 2016: 1—20.
11. Lamb F.I., Singh N.B., Colston M.J. The specific of 18 kDa antigen of *Mycobacterium leprae* is present in *Mycobacterium habana* and functions as a heat-shock protein. *J. Immunol.* 1990; 144: 1922—5.
12. Shinnick T.M., Vodkin M.H., Williams J.C. The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen to the *Escherichia coli* GroEl protein. *Infect. Immun.* 1988; 56: 446—51.
13. Mostafa H.M., Kazda M.V.D., Irgens L.M., Luesse H.G. Acid-fast bacilli from former leprosy regions in coastal Norway showing PCR positivity for *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* 1995; 63: 97—9.
14. Martinez N.A., Lahiri R., Pittman L.T., Scollard D., Truman R., Moraes M.O. et al. Determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 2124—30.
15. Sharma R., Lavania M., Katoch K., Chauhan D.S., Gupta A.K., Gupta U.D. et al. Development and evaluation of real-time RT-PCR assay for quantitative estimation of viable mycobacterium leprae in clinical samples. *Indian J. Lepr.* 2008; 80: 315—21.
16. Santos A.R., Balassiano V., Oliveira M.L., Pereira M.A., Santos P.B., Degraive W.M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 1129—33.
17. Ebenezer G.J., Daniel S., Norman G., Daniel E., Job C.K. Are viable *Mycobacterium leprae* present in lepromatous patients after completion of 12 months and 24 months multi-drug therapy? *Indian J. Lepr.* 2004; 76(3): 199—206.
18. Martinez A.N., Ribeiro-Alves M., Sarno E.N., Moraes M.O., Ozcel M.A. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5: e1354.
19. Turrene C.Y., Tschetter L., Wolfe J., Kabani A. Necessity of Quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3637—48.
20. Cox R.A., Kempell K., Fairclough L., Corston M.S. The 16S ribosomal RNA of *Mycobacterium leprae* contains unique sequence, which can be used for identification by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 1991; 35: 284—90.
21. De Wit M.Y.L., Klatser P.R. *Mycobacterium leprae* isolates from different sources have identical sequences of the spacer region between the 16S and 23S ribosomal RNA genes. *Microbiology*. 1994; 140: 1982—7.
22. Dobner P., Feldmann K., Rifai M., Löscher T. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter regions. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 806—9.
23. Haile Y., Ryon J.J. Colorimetric microtitre plate hybridization assay for the detection of *Mycobacterium leprae* 16S rRNA in clinical specimens. *Lepr. Rev.* 2004; 75: 40—9.
24. Rampini S.K., Bloemberg G.V., Keller P.M., Büchler A.C., Dollenmaier G., Speck R.F. et al. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *J. Infect. Dis.* 2011; 53: 1245—51.

Поступила 31.07.17
Принята к печати 01.08.17