

**АРНАУДОВА**

**Кристина Шотаевна**

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

14.01.10 – кожные и венерические болезни

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Астрахань – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук

**Дуйко Виктор Васильевич**

Доктор медицинских наук

**Сароянц Людмила Валентиновна**

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук

**Соколова Татьяна Вениаминовна**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра хирургии ФДПО, профессор

Доктор медицинских наук, профессор

**Щербина Анна Юрьевна**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение иммунологии, заведующая

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.10 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://rsmu.ru> ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Шарова Наталья Михайловна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Лепра – хроническое инфекционное заболевание человека, вызываемое *Mycobacterium leprae*, приводящее к поражению кожи, периферической нервной системы и внутренних органов. Заболеваемость лепрой в Российской Федерации носит спорадический характер, однако за последние годы число новых случаев заболевания увеличилось [Дуйко В.В. с соавт., 2018]. Следует отметить, что в эндемичных по лепре странах показатели заболеваемости лепрой не снижаются, несмотря на усилия ВОЗ по глобальному внедрению комбинированной химиотерапии (MDT) [Tatipally S. et al., 2018]. Кроме того, в последнее время заметно активизировался поток лиц, въезжающих в Россию по туристическим или рабочим визам из стран эндемичных по лепре.

Для ранней диагностики лепры, выявления бессимптомного носительства, а также для дифференциальной диагностики с различными заболеваниями существует необходимость в разработке и внедрении в практику современных лабораторных методов исследования. Это связано с тем, что проблема быстрой, эффективной идентификации *M. leprae* в исследуемом материале до настоящего времени трудно разрешима из-за невозможности культивирования возбудителя лепры на искусственных питательных средах [Inskip S.A. et al., 2015]. Несмотря на ряд применяемых методов лабораторной диагностики их информативность в силу ряда причин недостаточна.

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 и на ранних стадиях заболевания, остается невысокой.

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* [Williams D.L. et al., 2010]. Данные методы помогают расшифровать генетические структуры возбудителя лепры и определить его место среди многочисленных видов микобактерий, а также оценивать жизнеспособность *M. leprae* в различных исследуемых образцах, то есть имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение. В нашей стране метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и его модификации для идентификации возбудителя лепры практически не применяется и не регламентирован. Поэтому разработка и внедрение отечественных молекулярно-генетических тестов идентификации возбудителя лепры, в частности на основе ПЦР, будет способствовать ранней диагностике заболевания, выявлению случаев заболевания лепрой среди лиц, контактирующих с больными лепрой, и лиц, въезжающих из эндемичных по лепре стран, а также дополнительным подтверждающим тестом в диагностике лепры и оценке эффективности лечения.

**Степень разработанности темы исследования.** К настоящему времени накопилось достаточно исследований, посвященных молекулярной диагностике лепры (Martinez A.N. et al., 2009; Kamal R. et al., 2016; Alam M.S. et al., 2017; Azevedo M.C. et al., 2017). Однако встречаются лишь единичные работы по ранней диагностике лепры и мониторингу противолепрозного лечения (Phetsuksiri B. et al., 2006; Martinez A.N. et al., 2009; Avanzi C. et al., 2016). 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 работы.** 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).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** 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.

**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.

**Основные положения, 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.

**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.

**Внедрение результатов исследования в практику.** 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.

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

**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.).

**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, результаты собственных исследований, обсуждение полученных данных, выводы. Диссертация иллюстрирована 3 рисунками и 17 таблицами. Список литературы включает 218 источников, в том числе 15 отечественных и 203 зарубежных.

**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».

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

**Общая характеристика клинического материала.** В процессе выполнения работы проведено обследование 275 человек, из них 87 больных с различными формами лепры и активностью процесса, 42 здоровых контактных с больными лепрой лица, 67 мигрантов и 66 здоровых доноров. Группу сравнения составили 13 больных сахарным диабетом (СД), осложненным трофическими язвами. Изучено 423 клинических образца: 48 биоптатов кожи, 232 соскоба со слизистой носа, 86 скарификатов с поверхности кожи, 28 соскобов с трофических язв и 29 сывороток крови.

Экстракция ДНК из различного клинического материала для определения эффективности ее выделения проведена 8 методами: метод «M1» – согласно

инструкции к набору реагентов «Проба-НК» (НПФ «ДНК-технология», Москва); метод «М2» – согласно инструкции к набору реагентов «Проба ГС» (НПФ «ДНК-технология», Москва); метод «М3» – согласно инструкции к набору реагентов «ДНК-сорб-С» (ООО «Интерлабсервис», Москва); метод «М4» – автоматический метод выделения ДНК набором реагентов (GXT DNA/RNA GenoExtraction Kit, «HainLifescience», Германия) на станции GenoXtract («HainLifescience», Германия); метод «М5» – согласно инструкции к набору реагентов «GenoLyse» («HainLifescience», Германия); метод «М6» – выделение ДНК с помощью 5% бычьего сывороточного альбумина (СБА); метод «М7» – выделение ДНК с использованием протеиназы К; метод «М8» – выделение РНК из биологического материала для дальнейшей реакции обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием фенол-хлороформа. Независимо от метода экстракции отбирали 5 мкл выделенной ДНК на дальнейшую постановку в ПЦР, оставшийся материал хранили при температуре -20° С.

Для оценки разрабатываемых тест-систем и возможностей применения ПЦР для диагностики лепры в качестве тест-системы сравнения использовали набор реагентов «GenoType Leprae DR» («HainLifescience», Германия).

Для идентификации возможной сопутствующей микобактериальной флоры образцы тестировались набором GenoType Mycobacterium CM «Common Mycobacteria» («HainLifescience», Германия) на 14 видов микобактерий: *M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. interjectum*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. peregrinum* и комплекс *M. tuberculosis*; а также набором «GenoType Mycobacterium AS» («HainLifescience», Германия) на 16 видов редко встречающихся микобактерий: *M. mucogenicum*, *M. celatum*, *M. goodii*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. genavense*, *M. heckeshornense*, *M. lentiflavum*, *M. haemophilum*, *M. phlei*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. shimoidei*, *M. asiaticum* и *M. gastri*.

ПЦР проводили в объеме 50 мкл. Амплификационная смесь для всех наборов содержала: 35 мкл PNM (смесь праймеров/нуклеотидов), 5 мкл 10-

кратного буфера для инкубации, 0,2 мкл термостабильной Tag ДНК полимеразы, 3 мкл воды, 25 mM раствора  $MgCl_2$ , 5 мкл выделенной ДНК. Режим амплификации для праймеров «GenoType Leprae DR», «GenoType Mycobacterium CM» и «GenoType Mycobacterium AS» («HainLifescience», Германия): 1 цикл  $95^{\circ}C$  – 15 мин; 10 циклов  $95^{\circ}C$  – 30 сек,  $58^{\circ}C$  – 2 мин; 20 циклов  $95^{\circ}C$  – 25 сек,  $53^{\circ}C$  – 40 сек,  $70^{\circ}C$  – 40 сек; 1 цикл  $70^{\circ}C$  – 8 мин.

Амплификацию ДНК проводили в термоциклерах «Терцик» («НПФ-ДНК-Технология», Россия) с последующим учетом результатов с помощью гибридизации на автоматическом приборе «GT-Blot-48» («HainLifescience», Германия) или вручную с использованием термощейкера «TwinCubator» («HainLifescience», Германия), а также с помощью электрофореза в агарозном геле. При разработке тестов с использованием флуоресцентных зондов амплификацию ДНК проводили в режиме реального времени на амплификаторе «ДТ-96» («НПФ-ДНК-Технология», Россия). Применяли от 30 до 50 циклов амплификации в зависимости от выбранных праймеров.

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.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных с кожи больных лепрой**

На первом этапе работы проводилось изучение возможностей использования ПЦР для детекции *M. leprae* у больных лепрой с применением набора реагентов «GenoType LepraeDR» («HainLifescience», Германия). Установлено, что наиболее часто ДНК *M. leprae* обнаруживаются в биоптатах и

скарификатах кожи от больных лепрой, причем с помощью ПЦР *M. leprae* в биоптатах кожи детектировалась на 14,2% чаще, а в скарификатах кожи на 4,2%, чем при бактериоскопии. При исследовании соскобов со слизистой поверхности носа от больных лепрой бактериоскопически *M. leprae* не детектировались, в то время как методом ПЦР выявлялись в 8,9% случаев. В скарификатах кожи и соскобах со слизистой носа, полученных от здоровых лиц, микобактерии лепры не обнаруживались ни стандартными методами, ни в ПЦР.

В настоящее время в мире наблюдается рост заболеваемости микобактериозами, которые, как правило, встречаются у лиц с иммунодефицитами [Prevots D.R. et al., 2017]. Нарушение клеточного иммунитета в патогенезе лепры является основополагающим фактором в развитии болезни. Можно предположить, что на коже больных лепрой могут персистировать, помимо *M. leprae*, и другие виды микобактерий. Наши исследования подтвердили этот факт. С помощью метода ПЦР с дальнейшей гибридизацией и использовании наборов реагентов «GenoType Mycobacterium CM и AS» установлено, что в биоптатах и скарификатах кожи от больных лепрой детектировались *M. malmoense* от 2,1% до 19,1% случаев, а в 4,8% случаев – *M. avium*.

На сегодняшний день накоплен большой опыт выявления бактериальной флоры у больных лепрой в трофических язвах и соответствующего лечения [Шац Е.И. 2000, Gellati L.C. et al., 2014]. Однако, лечение трофических язв у больных лепрой часто сопровождается рецидивированием и осложнением остеомиелитами. Проведенное исследование отделяемого трофических язв с помощью ПЦР у больных лепрой выявило, что в 20% случаев детектируются *M. leprae*, причем в 13,3% выявлялся «дикий» штамм *M. leprae* с чувствительностью к основным противолепрозным препаратам (дапсону, рифампицину и офлоксацину), а в 6,7% случаев с вялотекущими и плохо поддающимися лечению трофическими язвами обнаружен «мутантный» штамм *M. leprae*, резистентный к MDT. Кроме того, в 46,7% случаев в трофических язвах были идентифицированы различные виды микобактерий: *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*.

Учитывая патогенетическую схожесть при развитии трофических язв у больных лепрой и сахарным диабетом (СД), а также сходную клиническую картину в качестве группы сравнения взята группа больных СД с трофическими язвами на подошвенной поверхности стоп, аналогичными язвам у больных лепрой. У больных СД также идентифицировались различные нетуберкулезные микобактерии: *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense*, *M. fortuitum*, однако, частота встречаемости их была гораздо меньше, чем у больных лепрой.

Таким образом, в трофических язвах у больных лепрой выявлена колонизация не только *M. leprae*, но и другими микобактериями, что, возможно, помимо других факторов, создает трудности в терапии и приводит к хронизации процесса.

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 существовало. Поэтому вторым этапом исследования явилась разработка отечественных тест-систем для детекции возбудителя лепры с целью решения различных диагностических задач.

#### **Разработка метода идентификации возбудителя лепры с использованием праймеров к 16S рРНК**

При разработке тест-системы основными этапами являются: отработка пробоподготовки и методов выделения ДНК из клинического материала, конструирование системы олигонуклеотидов для детекции возбудителя лепры, подбор режимов амплификации ДНК и способа детекции продуктов амплификации, проверка чувствительности и специфичности тест-системы.

Для определения наиболее эффективного метода экстракции ДНК в зависимости от клинического образца (биоптаты и скарификаты кожи, соскобы со слизистой поверхности носа и с трофических язв, кровь) апробированы 8 методов (М1-М8). Установлена различная степень эффективности методов выделения в

зависимости от типа клинического образца. Лучшими методами экстракции ДНК из биоптатов и скарификатов кожи оказались методы М1, М2, а из соскобов со слизистой поверхности носа и с трофических язв – М1, М2 и М6. Это послужило основой для разработки методов экстракции ДНК в тест-системах. Для исключения ложноотрицательных результатов и контроля качества выделения ДНК/РНК использовали экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО).

Данные литературы позволили подобрать и апробировать праймеры к различным ДНК-мишеням *M. leprae* в зависимости от поставленных задач. Для разработки тест-системы для идентификации возбудителя лепры из различного клинического материала на основе ПЦР использовали праймер к 16S рРНК. Он входит в состав микобактериальных рибосом и транскрибируется в большом количестве копий ( $10^3$ - $10^4$  на клетку), а также является наиболее широко применимым в идентификации *M. leprae* [Sharma R. et al., 2008; Martinez A.N. et al., 2009; Gama R.S. et al., 2018].

Подбор олигонуклеотидных последовательностей к 16S рРНК осуществлен путём анализа данных ДНК *M. leprae* из базы NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Мишени для ПЦР выбраны с учётом гуанин-цитозин состава матрицы, наличия гомологичных участков ДНК у других организмов и расчётной температуры гибридизации. Для подбора олигонуклеотидных проб и праймеров применялось программное обеспечение Oligo 6.0.

Реакционная смесь для ПЦР содержала: 1,1 мкмоль каждого dNTP; 10 пмоль каждого праймера; 25 мкмоль  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 64 мкмоль Tris-HCl (pH 8,6); 2,5 мкмоль –  $\text{MgCl}_2$ ; 5 ед. Taq ДНК-полимеразы и 5 мкл образца ДНК.

Отработанный режим амплификации: 80°C – 30 сек, 94°C – 1 мин 30 сек 1 цикл; 94°C – 30 сек, 64°C – 15 сек 5 циклов; 94°C – 10 сек, 64°C – 15 сек 45 циклов; 10°C – хранение. Амплификация ДНК проводилась в термоциклере «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология, Россия). Для детекции продуктов амплификации первоначально применялся метод электрофореза в агарозном геле, при этом синтез ампликона размером 290 п.н. был зафиксирован только в образцах, полученных от больных лепрой (биоптаты и скарификаты кожи,

соскобы со слизистой оболочки носа и с трофических язв). Полученные результаты совпали со стандартными гистологическими и бактериоскопическими методами исследования.

В дальнейшем для снижения риска контаминации был разработан флуоресцентный метод детекции результатов реакции на основе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-RT). Синтез праймеров и олигонуклеотидных флуоресцентномеченых зондов осуществляли на синтезаторах ASM-102 и ASM-800 (Новосибирск, Россия). Флуорофоры (FAM, HEX) и гасители флуоресценции (BHQ1) сконструировали в лаборатории Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (табл.1). Олигонуклеотиды были очищены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением обращеннофазных колонок Диасфер-110-C18 (Россия). Контроль чистоты олигонуклеотидов проводился методом аналитического вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле. Последовательность праймеров и зонда представлена в таблице 1.

Таблица 1 – 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)	

Условия ПЦР отработаны с помощью подбора количества праймеров в реакционной смеси и оптимальной температуры отжига. Амплификация и детекция ДНК при использовании ПЦР-RT проводилась в амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с тем же режимом амплификации, что указан выше. Детекцию флуоресценции осуществляли при температуре 64°C.

Контроль за ходом ПЦР проводили с помощью внутреннего контроля – ВК (клонированные фрагменты гена рецептора фактора роста человека, праймеры и

олигонуклеотидный зонд). Пригодность ВК определяли по отсутствию ингибирования специфической реакции.

Проверку специфичности проводили на кожных биоптатах, полученных 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. gordonae*, *M. lufu*, *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis*, *M. Кедровский*. Все изоляты исследовали в образце в пределах 100 клеток, при этом ни один не показал реактивности в ПЦР. Специфичность теста составила 100%.

Клиническое апробирование тест-системы на основе ПЦР-РТ для выявления возбудителя лепры осуществлено на больных лепрой и здоровых лицах, находящихся с ними в семейном контакте. Чувствительность ПЦР зависела от вида клинического образца (табл.2).

Таблица 2 – Частота выявления *M. leprae* у больных лепрой различными методами идентификации

Клинический материал	Число исследуемых образцов	Бактериоскопия, гистология		ПЦР Real time на 16S рРНК	
		абс.	%	абс.	%
Скарификаты кожи	54	32	59,3	36	66,7
Биоптаты кожи	18	16	88,9	18	100
Соскобы со слизистой носа	32	20	62,5	22	68,8
Соскобы с язв	15	0	0	3	20,0
Сыворотки крови	29	0	0	0	0

У больных лепрой наиболее часто ДНК *M. leprae* идентифицировались в биоптатах, причём более эффективными оказались методы экстракции М1 и М2. Методом М1 *M. leprae* обнаруживались в 18 (100%) гистологически положительных биоптатах, методом М2 – в 17 (94,4%). В 54 скарификатах кожи при выделении методами М1 и М2 ДНК *M. leprae* обнаруживались с одинаковой частотой в 66,7% случаях, тогда как при бактериоскопии - в 59,3%. При ПЦР-анализе 32 соскобов со слизистой поверхности носа *M. leprae* на 6,3% случаев

детектировались чаще, чем при бактериоскопическом исследовании. Все образцы отделяемого с трофических язв были бактериоскопически негативны, тогда как ДНК *M. leprae* детектировалась в 20% случаев. В образцах сывороток крови ДНК *M. leprae* не выявлялась при использовании всех методов экстракции. Чувствительность теста составила 95,2%.

Специфичность разрабатываемого теста проверялась на образцах от здоровых лиц (скарификаты кожи, соскобы со слизистой поверхности носа, сыворотки крови) и составила 100%. Ни в одном из образцов ДНК *M. leprae* не детектировалась, что подтверждалось результатами бактериоскопии.

Сравнительный анализ результатов стандартных методов детекции *M. leprae* в разных образцах с методом ПЦР при использовании праймера к 16S рРНК показал более высокую чувствительность последнего. При этом во всех случаях обнаружения *M. leprae* стандартными методами при ПЦР результаты были также положительными (коэффициент ассоциации Пирсона  $r_a+1$ ). Разработанная нами тест-система позволяет за короткие сроки идентифицировать *M. leprae* в любом клиническом материале и подтверждать диагноз. Однако с помощью разработанной тест-системы невозможно отличить живые *M. leprae* от мертвых, то есть данный метод актуален только для диагностики лепры, но не для мониторинга противолепрозного лечения. В связи с этим следующим этапом исследования являлась разработка тест-системы для определения жизнеспособности *M. leprae* на основе ПЦР для оценки эффективности противолепрозного лечения.

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

Методом оценки эффективности лечения лепры в настоящее время является подсчет бактериоскопического индекса (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 экспериментальная модель лепрозной инфекции на мышах, разработанная С.С.

Shepard [Shepard C.C., 1960]. Однако, данная модель имеет ряд недостатков, препятствующих применению ее в рутинной практике: длительность (10-12 мес.) и высокая стоимость эксперимента. Методом, исключаящим эти недостатки, 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 [Martinez A.N., 2009]. Поэтому для разработки отечественной тест-системы для оценки эффективности противолепрозного лечения нами сконструированы праймеры и флуоресцентный зонд к 16S рРНК *M. leprae*, которые синтезировались в ООО НПК «Синтол» (Россия), их последовательность представлена в таблице 3.

Из всех применяемых методов экстракции выбран метод М8. Только с помощью этого метода можно выделить РНК возбудителя. Так как в инструкции к набору в качестве биологического материала не указаны кожные биоптаты, мы модифицировали метод и адаптировали его к выделению РНК/ДНК из образца путем предварительной гомогенизации биоптатов.

Таблица 3 – Последовательность праймеров и зонда к 16S рРНК *M. leprae*

ML16S rRNATaq-F:	5'GCATGTCTTGTGGTGGAAAGC -3'
ML16S rRNATaq-R:	5'- CACCCACCAACAAGCTGAT - 3'
ML16S rRNATaq probe	(FAM) 5'- CA-(T-LNA)C(C-LNA)-TGC-AC (C-LNA)-GCA-3'(RTQ1)

Выделенные 5 мкл ДНК добавляли в амплификационную смесь, содержащую 50 мМ KCl, 10 мМ Tris HCl (pH8,8), 6,25мМ MgCl<sub>2</sub>, Taq - полимеразу (5 ед/мкл), 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 объем 25 мкл). Амплификацию и учет результатов проводили на термоциклере «ДТ-96 Real time» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Для проведения амплификации отработали следующий режим: 95°C - 5 мин, 60°C - 50 сек 1 цикл; 95°C - 15 сек, 62°C - 40 сек 40 циклов; 10°C хранение.

Для изучения возможности использования данной тест-системы в оценке эффективности противолепрозного лечения были исследованы кожные скарификаты и биоптаты от больных лепрой в активной стадии заболевания с помощью предлагаемого способа и стандартным бактериоскопическим методом. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты обнаружения *M. leprae* (%) в кожных образцах различными методами

		Бактериоскопия		ПЦР Real time	
		абс.	%	абс.	%
Скарификат 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 регламентирован 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 противолепрозного лечения исследованы кожные скарификаты и биоптаты от больных лепрой в процессе курса специфической терапии (табл.5).

Таблица 5 – Результаты обнаружения *M. leprae* (%) в зависимости от сроков лечения

Время проведения	Количество скарификатов	Методы исследования	
		Бактериоскопический	ПЦР с 16S rRNA
До лечения	42	90,5%	100%
Через 6 мес от начала лечения	42	27,3%	45,5%
Через 9 мес от начала лечения	42	7,1%	14,3%

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 1,7 раза чаще ( $p < 0,05$ ), а через 9 мес. в 2,0 раза чаще ( $p < 0,05$ ), чем при бактериоскопии. Это дает основание для продолжения специфической терапии. В работах индийских ученых ранее [Santos A.R. et.al, 2001] было показано, что в 3,3% случаев у больных с высоким БИН жизнеспособные *M. leprae* сохраняются и после 12 месяцев лечения.

Существенно, что бактериоскопическим методом невозможно определить жизнеспособность возбудителя, тогда как ОТ-ПЦР анализ на 16S рРНК позволил детектировать жизнеспособные *M. leprae*, что демонстрирует высокую информативность теста. Чувствительность тест- системы составила 98,7%.

Таким образом, с помощью разработанного теста установлено, что и после окончания курса лечения, регламентированного ВОЗ, в организме больного продолжают сохраняться жизнеспособные *M. leprae*. Предложенная тест-система позволяет дифференцировано подходить к срокам лечения больных лепрой в зависимости от сохранения жизнеспособности возбудителя, что очень важно в эпоху персонализированной медицины.

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

В условиях спорадической заболеваемости возникла необходимость совершенствования методов скринингового обследования населения на лепру. Для такого обследования важны неинвазивность и быстрота способа детекции *M. leprae*. Соскобы со слизистой поверхности носа – наиболее подходящий материал для создания такого теста, так как основным путем проникновения возбудителя лепры является воздушно-капельный. В эндемичных странах в назальном секрете *M. leprae* идентифицируются у больных лепрой и клинически здоровых лиц [Araujo S.L. et al., 2016, Fischer M., 2017].

У исследуемых людей соскоб со слизистой оболочки полости носа брали с помощью стерильных одноразовых зондов. Метод М6 из всех методов экстракции ДНК *M. leprae* для скринингового теста оказался наиболее простым, дешевым и результативным.

Для амплификации ДНК выбраны праймеры и флуоресцентный зонд к повторяющимся участкам ДНК, так называемым RLEP-последовательностям. Хромосома *M. leprae* содержит семейство из 29 мультикопийных повторов (RLEP) с переменной структурой и неизвестной функцией [Woods S.A. et al., 1990], каждая из которых содержит инвариантный фрагмент в 545 bp, фланкирующих в некоторых случаях дополнительные фрагменты от 44 до 100 bp. Использование RLEP-последовательностей в качестве ДНК-мишеней для ПЦР имеет преимущество по чувствительности в сравнении с другими мишенями ДНК, поскольку они присутствуют в нескольких местах геномной ДНК. [Turankar R.P. et al., 2015; Kamal R. et al., 2016]. Последовательность праймеров и флуоресцентного зонда к RLEP *M. leprae*, предложенные нами, синтезированы в НПК ООО «Синтол» (Россия), последовательности представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Последовательность RLEP-праймеров *M. leprae* и зонда

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)

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 MgCl<sub>2</sub>, концентрация каждого нуклеотида 25 mM, глицерол, Tween 20, по 10 пкмоль/мкл каждого праймера и флуоресцентного зонда, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 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+».

Для проведения амплификации отработывали следующие условия: время и температура денатурации от 1 мин до 10 мин при 94°–95° С, отжиг праймеров при температуре 60°, 62°, 64° С, концентрации ионов Mg<sup>++</sup> в пределах 0,8 – 10,5 mM, количество циклов амплификации и время каждого 15 – 60 сек 30 – 45 циклов. В

итоге был отработан следующий режим амплификации: 95°C - 5 мин, 60°C - 50 сек 1 цикл; 95°C - 15 сек, 62°C - 40 сек 40 циклов; 10°C - хранение.

Для каждого этапа критерием правильности режима служило наличие ДНК *M. leprae* из заведомо положительного биоптата кожи больного лепрой. Амплификацию и учет результатов проводили на термоциклере «ДТ-96 Real time» («НПФ ДНК-Технология», Россия).

Для характеристики чувствительности предлагаемой тест-системы провели сравнительное изучение выявления микобактерий лепры с помощью предлагаемого способа, бактериоскопического исследования и с использованием коммерческого теста «GenoType Leprae DR» («HainLifescience», Германия). Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты выявления *M. leprae* со слизистой поверхности носа различными тест-системами

Группы лиц	Число 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-последовательностям обладает достоверно более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с импортной тест-системой и бактериоскопическим методом ( $p < 0,05$ ). При проведении бактериоскопического исследования *M. leprae* не обнаруживалась ни в одном случае. Чувствительность разработанной тест-системы составила 93,3%.

Для оценки специфичности и чувствительности разрабатываемой тест-системы применяли ДНК различных видов микобактерий: *M. Кедровского* (белый штамм), *M. Кедровского* (розовый штамм), *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. duvalli*, *M. marinum*, *M. clegg*, *M. vaccae*, *M. gastri*, *M. lufu*, *M. paratuberculosis*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis*, *M. kansasii*, *M. phlei*, *M. bovis*. Все изоляты исследовали в образце в пределах 100 клеток, при этом ни один не

показал реактивности в ПЦР. Специфичность разрабатываемого теста проверялась на образцах от здоровых лиц (соскобы со слизистой поверхности носа) и составила 100%. Ни в одном из образцов ДНК *M. leprae* не детектировалась, что подтверждалось результатами бактериоскопии.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что разработанная отечественная тест-система для идентификации *M. leprae* проста в исполнении, неинвазивна, информативна и значительно дешевле импортных тест-систем, выполняется на отечественном оборудовании и отличается повышенной чувствительностью, точностью и скоростью выполнения.

## ВЫВОДЫ

1. Метод ПЦР позволяет определить у больных лепрой наличие *M. leprae* и других видов микобактерий на кожном покрове, слизистой оболочке носа и в отделяемом трофических язв. Оценка микобактериальной флоры с помощью ПЦР позволяет правильно интерпретировать результаты бактериоскопического исследования на наличие кислотоустойчивых микобактерий у больных лепрой.

2. Разработанная тест-система с использованием ПЦР на основе амплификации участка гена 16S рРНК *M. leprae* в режиме реального времени для идентификации возбудителя лепры в различных клинических образцах обладает 100% специфичностью. Чувствительность теста составила 95,2%.

3. Оценка эффективности противолепрозной терапии с помощью разработанной тест-системы на основе ОТ-ПЦР к 16S рРНК *M. leprae* позволяет дифференцировано подходить к срокам лечения больных лепрой в зависимости от сохранения жизнеспособности возбудителя.

4. Разработанная тест-система на основе ПЦР с использованием праймеров к RLEP-последовательностям *M. leprae* для скринингового обследования населения на лепру неинвазивным способом обладает 100% специфичностью и 93,3% чувствительностью и может быть использована для совершенствования противоэпидемических мероприятий при лепре.

5. Разработанные тест-системы в сравнении со стандартными методами исследования (бактериоскопия, гистология) при лепре и зарубежными

аналоговыми тест-системами обладают более высокой специфичностью и чувствительностью.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для быстрой идентификации *M. leprae* и постановки диагноза лепры рекомендуется использовать разработанную тест-систему на основе амплификации участка гена 16S рРНК *M. leprae* в режиме реального времени.

2. В процессе проведения и завершения противолепрозной терапии рекомендуется оценивать ее эффективность с помощью разработанной тест-системы на основе ОТ-ПЦР, позволяющей определять жизнеспособность возбудителя лепры (патент № 2688156).

3. Для совершенствования противоэпидемических мероприятий при скрининговом обследовании населения на лепру рекомендуется применять разработанную тест-систему на основе ПЦР с использованием праймеров к RLEP-последовательностям *M. leprae* (патент № 2641060).

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Арнаудова, К.Ш. Разработка методов экстракции ДНК *Mycobacterium leprae* / К.Ш. Арнаудова, Л.В. Сароянц // Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем здравоохранения: сборник статей IX международной научно-практической конференции (6-8 мая 2013 г., г. Астрахань). – Астрахань, 2013 г. – С. 33-34.

2. Arnaudova, K.Sh. Detection of *M.leprae* specific PCR testing of leprosy patients and households contacts / L.V. Saroyants, K.Sh. Arnaudova // 18th International leprosy congress: abstract, 2013, Belgium, Brussels. – Brussels, 2013. – 110 p.

3. Арнаудова, К.Ш. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных из тканей экспериментальных животных / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова, М.Ю. Юшин // 90-летие противолепрозной службы страны и 65-летие научно-исследовательского института по изучению лепры: сборник статей международной научно-практической конференции (10-11 октября 2013г., г. Астрахань) – Астрахань, 2013. – С. 122-129

4. Арнаудова, К.Ш. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных с кожи больных лепрой / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова // 95-летие АГМА: сборник статей научно-практической конференции (17-19 октября 2013г., г. Астрахань) – Астрахань, 2013. – С. 22 – 23.

5. Арнаудова, К.Ш. Использование ПЦР в диагностике лепры / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова // **Российский аллергологический журнал.** – 2013. – №2. – С. 259-261.
6. Арнаудова, К.Ш. Применение праймера к 16S рРНК в молекулярно-генетической идентификации *Mycobacterium leprae* / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова, В.В. Дуйко // Молекулярная диагностика 2014: сборник статей VIII всероссийской научно-практической конференции (18-20 марта 2014 г., г. Москва). – Москва, 2014. – Т.1. – С. 86-88.
7. Арнаудова, К.Ш. Молекулярно-генетическая идентификация *Mycobacterium leprae* с использованием RLEP-ПЦР / К.Ш. Арнаудова, Л.В. Сароянц. // Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы: сборник статей научно-практической конференции с международным участием (14-17 мая 2014 г., г. Казань). – Казань, 2014. – С. 18-20.
8. Арнаудова, К.Ш. Применение праймеров к 16S рРНК и SOD A в молекулярно-генетической идентификации *Mycobacterium leprae* / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова, Д.Д. Абрамов // **Вестник последиplomного медицинского образования.** –2015. – №4. – С. 61-62.
9. Арнаудова, К.Ш. Идентификация микобактерий, выделенных из содержимого трофических язв больных лепрой / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова, В.В. Дуйко // **Клиническая дерматология и венерология.** – 2015. – Т.14. – С. 28-31.
10. Arnaudova, K.Sh. Identification of *Mycobacterium leprae* species from trophic ulcers of leprosy patients / L.V. Saroyants, K.Sh. Arnaudova, V.V. Duiko // 19th International leprosy congress: abstract, 2016 г., Beijing, China. – Beijing, 2016. – P.18-19.
11. Арнаудова, К.Ш. Идентификация микобактерий, выделенных от больных лепрой / К.Ш. Арнаудова, Л.В. Сароянц // **Международный научный журнал «Евразийский союз ученых».** – 2016. – Т. 24. – №3. – С. 11-14.
12. Арнаудова, К.Ш. Идентификация микобактерий лепры методом ПЦР с использованием различных праймеров / К.Ш. Арнаудова, Л.В. Сароянц // 120-летие Астраханского лепрозория: сборник статей научно-практической конференции (6-7 октября 2016 г, г. Астрахань). – Астрахань, 2016. – С.25-28.
13. Арнаудова, К.Ш. Детекция *Mycobacterium leprae* в соскобах со слизистой поверхности носа у больных лепрой и контактных лиц / К.Ш. Арнаудова, Л.В. Сароянц // Молекулярная диагностика 2017: сборник статей всероссийской научно-практической конференции (18-20 апреля 2017 г, г. Москва). – Москва, 2017. – Т.1. – С.513-514.

14. Арнаудова, К.Ш. Случай семейной лепры / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова, В.В. Дуйко, В.З. Наумов // **Клиническая дерматология и венерология**. – 2018. – Т.17. – №5. – С.47-51.

15. Арнаудова, К.Ш. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова, Д.Д. Абрамов, Д.Ю. Трофимов // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2018. – Т.1. – №61 – С.55-59.

16. Арнаудова, К.Ш. Оценка эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции / Л.В. Сароянц, К.Ш. Арнаудова, В.З. Наумов // 95-летие противолепрозной службы страны и 70-летие научно-исследовательского института по изучению лепры: сборник статей международной научно-практической конференции (11 октября 2018 г, г. Астрахань). – Астрахань, 2018. – С.51-58.

**17. Пат. 2641060** Российской Федерации, МПК G 01 N 33/58, C 12 Q 1/68. Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции / Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш.; заявитель и патентообладатель Науч.-исслед. ин-т по изуч. лепры. - N 2641060; заявл. 19.08.16; опубл. 15.01.18, Бюл. N 2. - **3 с.: ил.**

**18. Пат. 2688156** Российской Федерации, МПК G 01 N 33/58, C 12 Q 1/68. Способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции / Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш.; заявитель и патентообладатель Науч.-исслед. ин-т по изуч. лепры. - N 2688156; заявл. 21.08.17; опубл. 20.05.19, Бюл. N 14. - **3 с. : ил.**