

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 мМ 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 термошейкера «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 – 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 MgCl₂, 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 MgCl₂, концентрация каждого нуклеотида 25 mM, глицерол, Tween 20, по 10 пкмоль/мкл каждого праймера и флуоресцентного зонда, 25 mM MgCl₂ и деионизированная вода. Затем вносили в пробирку 20 мкл минерального масла

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

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⁺⁺ 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.**