

РАЗРАБОТКА ПЦР-МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ *M.LEPRAE* ДЛЯ
СКРИНИНГОВОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ НАСЕЛЕНИЯ НА ЛЕПРУ

Л.В. САРОЯНЦ^{*,**}, К.Ш. АРНАУДОВА^{***}, В.З. НАУМОВ^{*}

^{*} Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
пр. Н. Островского, д. 3, г. Астрахань, 414057, Россия

^{**} Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный университет»,
ул. Татищева, д. 20а, г. Астрахань, 414000, Россия

^{***} Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Бакинская, д. 121, г. Астрахань, 414000, Россия

Аннотация. Нестабильность эпидемиологической ситуации по заболеваемости лепрой в России подтверждается выявлением новых случаев болезни. Регламентированные в РФ методы лабораторной диагностики в ряде случаев не позволяют поставить диагноз при атипичных и малобактериальных формах лепры, что требует разработки новых подходов при постановке диагноза, основанных на методе полимеразно-цепной реакции. **Цель исследования** – изучение возможности использования полимеразно-цепной реакции для обнаружения *M.leprae*. **Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлись образцы соскобов со слизистой полости носа, полученные от 196 обследованных, из них 67 мигрантов и 31 обследуемый на лепру, 56 больных лепрой и 42 контактных. Для верификации диагноза лепры образцы были исследованы с помощью стандартных гистологических и бактериоскопических методов, с применением коммерческого теста *GenoType Leprae DR* фирмы *Hain Lifescience* (Германия) и предложенной тест-системой на основе полимеразно-цепной реакции с праймерами к *RLEP*-последовательностям *M.leprae*. **Результаты и их обсуждение.** Разработанная тест-система более специфична и чувствительна (93,3%) в сравнении с зарубежной тест-системой. **Заключение.** Высокая специфичность и чувствительность, неинвазивность, скорость, а также дешевизна процедуры идентификации ДНК *M.leprae* с помощью разработанной тест-системы позволяет использовать ее при скрининговом обследовании населения на лепру.

Ключевые слова: лепра, диагностика, ПЦР, соскобы со слизистой носа, *RLEP*-последовательности, скрининговый метод.

DEVELOPMENT OF PCR METHOD FOR *M.LEPRAE* IDENTIFICATION IN POPULATION
SCREENING FOR LEPROSY

L.V. SAROYANTS^{*,**}, K.Sh. ARNAUDOVA^{***}, V.Z. NAUMOV^{*}

^{*} Federal State Budgetary Institution "Scientific Research Institute for the Study of Leprosy" of the Ministry of Health of the Russian Federation,
N. Ostrovsky Ave., 3, Astrakhan, 414057, Russia

^{**} Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Astrakhan State University",
Tatishchev Str., 20a, Astrakhan, 414000, Russia

^{***} Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Astrakhan State Medical University" of the Ministry Health Care of the Russian Federation, Bakinskaya Str., 121, Astrakhan, 414000, Russia

Abstract. The instability of the epidemiological situation in the incidence of leprosy in Russia is confirmed by the detection of new cases of the disease. The methods of laboratory diagnostics regulated in the Russian Federation in some cases do not allow making a diagnosis in atypical and low-bacterial forms of leprosy. This requires the development of new approaches to diagnosis based on the polymerase chain reaction method. **The research purpose** is to study the possibility of using the polymerase chain reaction (PCR) to detect *M.leprae*. **Materials and research methods.** The object of the study were samples of scrapings from the nasal mucosa obtained from 196 examined, including 67 migrants and 31 examined for leprosy, 56 patients with leprosy and 42 contacts. To verify the diagnosis of leprosy, the samples were examined using standard histological and bacterioscopic methods, using the commercial *GenoType Leprae DR test* from *Hain Lifescience* (Germany) and the proposed test system based on a polymerase chain reaction with primers for *M. leprae RLEP* sequences. **Results and its discussion.** The developed test system is more specific and sensitive (93.3%) in comparison with

the foreign test system. **Conclusion.** High specificity and sensitivity, non-invasiveness, speed, and low cost of the *M.leprae* DNA identification procedure using the developed test system make it possible to use it in screening the population for leprosy.

Keywords: leprosy, diagnostics, PCR, nasal scrapings, RLEP sequences, screening method.

Введение. Ежегодно более чем в 100 странах мира регистрируется свыше 200 тыс. новых случаев заболевания лепрой и около 4 млн. человек имеют инвалидизирующие последствия [9]. В Индии показатели заболеваемости достигли плато, но выявление числа новых случаев болезни не имеет тенденции к снижению, что отмечается в настоящее время и в России. Следует отметить, что в Российской Федерации увеличивается численность мигрантов из Центральной и Юго-Восточной Азии, обязанных проходить обследование, в том числе на лепру, основным лабораторным методом которого является бактериоскопическое исследование. Однако, чувствительность и специфичность данного метода невелики. Таким образом, проблема ранней диагностики лепры остается актуальной во всем мире. В связи с тем, что основной путь передачи инфекции воздушно-капельный распространение заболевания может быть обусловлено носителем в назальном секрете *M.leprae* у контактных с больными лепрой лиц [4, 6] и у клинически здоровых лиц, проживающих в эндемичных странах [10], что в свою очередь определяет необходимость проведения скринингового обследования населения на лепру. При таком обследовании предпочтительным помимо высокой специфичности и чувствительности метода является его неинвазивность. В связи с этим, наиболее целесообразным представляется взятие соскоба со слизистой поверхности носа, являющейся входными воротами для *M.leprae*. Для обнаружения ДНК *M.leprae* используются праймеры к различным мишеням. Одними из них являются RLEP-праймеры [11], применение которых повышает чувствительность полимеразно-цепной реакции (ПЦР) благодаря их присутствию в нескольких местах геномной ДНК [7, 14].

Материалы и методы исследования. Объектом исследования явились образцы соскобов со слизистой носа, полученные от 196 обследованных, из них 67 мигрантов и 31 обследуемый на лепру, 56 больных лепрой и 42 контактных. Экстракцию ДНК проводили с использованием 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА). После центрифугирования пробирок с образцами соскобов в течение 10 мин при 13000 об/мин к примерно 100 мкл осадка добавляли 40 мкл 5% раствора БСА и 100 мкл физиологического раствора; затем пробирки нагревали до 95°C 1 мин и охлаждали 1 мин при -20°C 4 раза и затем еще раз инкубировали 20 мин при 95°C и центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин; 5 мкл выделенной ДНК отбирали в отдельную пробирку для дальнейшей постановки ПЦР. Амплификационная смесь имела следующий подобранный нами состав [3]: 5 мкл ДНК, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris HCl (pH 8,8), 5 ед/мкл ДНК-полимераза 6,25 мМ MgCl₂, смесь dNTP, концентрация каждого нуклеотида 25 мМ, Tween 20, глицерол, по 10 пкмоль/мкл флуоресцентного зонда и праймеров, 25 мМ MgCl₂. В каждой постановке помимо пробирок с образцами готовили 3 пробирки: пробирка с отрицательным контрольным образцом (ОКО); пробирка «К-» – 5 мкл стерильной дистиллированной воды; пробирка «К+» – положительный контрольный образец (биопсия от больного лепрой). Праймеры и флуоресцентный зонд к RLEP-последовательностям, предложенные нами, синтезировались в НПК ООО «Синтол» (Россия): MLRLEPTaq-F: 5'- GCA-GCA-GTA-TCG-TGT-TAG-TGA-A-3'; MLRLEPTaq-R: 5'- CGC-TAG-AAG-GTT-GCC-GTA-T-3'; MLRLEPTaq-Probe: (R6G) -CGC-CGA-CGG-CCG-GAT-CAT-CGA-(BHQ2). Отработанный режим амплификации составил: 95°C – 5 мин 1 цикл, 60°C – 50 сек; 95°C – 15 сек, 62°C – 40 сек 40 циклов; хранение – 10°C, которая проводилась на термоциклере «ДТ-96 Real time» («НПФ ДНК-Технология», Россия). Специфичность теста, проверенная как на кожных биоптатах от больных лепрой, так и на музейных штаммах различных микобактерий составила 100%. Статистически значимые различия чувствительности метода вычислялись с помощью критерия Пирсона с уровнем достоверности $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для проверки чувствительности ПЦР-метода сравнивали результаты, полученные с помощью разработанной тест-системы и теста *GenoType Leprae DR*. Результаты представлены на рисунке.

При определении частоты выявления *M.leprae* у разных контингентов обследуемых лиц было установлено, что стандартным бактериоскопическим методом исследования ни в одном случае *M.leprae* в соскобе со слизистой носа не обнаружены. Чувствительность разработанной тест-системы составила 93,3%. При сравнении чувствительности разработанной нами тест-системы на основе ПЦР с праймерами к RLEP-последовательности с зарубежной тест-системой *Leprae DR* было установлено, что отечественная тест-система имеет более высокую чувствительность ($p < 0,05$). Апробацию данной тест системы проводили параллельно со стандартными методами обследования при постановке диагноза у лиц, обследуемых на лепру.

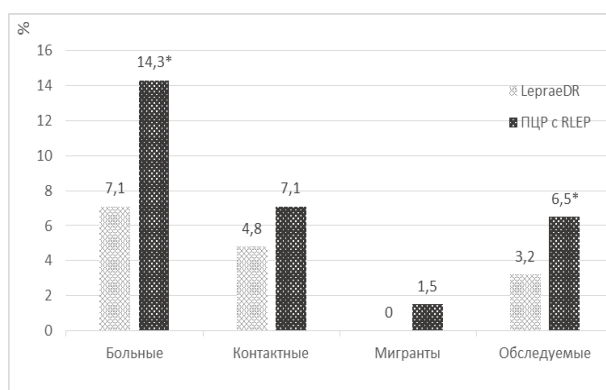


Рис. 1. Результаты выявления ДНК *M.leprae* со слизистой поверхности носа различными тест-системами

Пример №1. В июле 2018г. на консультацию в НИИЛ поступил пациент Ш-в 1981 г.р. с подозрением на лепру. Пациент проходил обследование в клиниках другого региона и для установления диагноза был направлен в НИИЛ. При клиническом осмотре у пациента выявлены элементы на коже, с которых взяты скарификаты и соскоб со слизистой носа. При бактериоскопическом исследовании в соскобе со слизистой поверхности носа *M.leprae* не обнаружены. В результате ПЦР исследования с использованием разработанной методики, ДНК *M.leprae* была выявлена. В дальнейшем расширенное обследование пациента с привлечением гистологического метода подтвердило эти результаты. Пациенту поставлен диагноз наиболее контагиозной многобактериальной формы лепры. Использование ПЦР-анализа, по предлагаемому нами способу, позволило бы своевременно установить диагноз лепры и вовремя начать специфическое лечение, тем самым снизив риск инфицирования *M.leprae* контактных лиц и прервав эпидемиологическую цепочку болезни.

Пример 2. В ноябре 2020 г по подозрению на лепру в клинику НИИЛ поступил пациент Щ., 1965 г.р., житель г. Астрахань. При проведении стандартного метода обследования, кроме клинического осмотра, у пациента взяты соскоб со слизистой оболочки носа и скарификаты кожи для бактериоскопического исследования. Параллельно с этим у пациента взяли образцы для ПЦР-анализа. Бактериоскопически *M.leprae* не обнаруживались. При проведении ПЦР-теста, последовательность проведения которого описана выше, было обнаружено что на 27 цикле амплификации поднималась кривая флуоресценции в обследуемом образце, что было на 5 циклов позже, чем в положительном контрольном образце (биопсия от больного в активной стадии), что объясняется меньшим количеством возбудителя. В отрицательном контрольном образце флуоресценция не отмечалась. По результатам ПЦР-анализа пациенту решено провести никотиновую пробу, после чего на коже обнаружены гипопигментные пятна, с которых был взят биоптат кожи для гистологического исследования. При гистологическом исследовании обнаружены *M.leprae* с характерным инфильтратом. Таким образом, с помощью ПЦР за короткий период времени у пациента детектировалась *M.leprae* на слизистой оболочке носа и в скарификатах кожи, что позволило провести дальнейшее обследование и поставить диагноз – малобактериальная лепра.

Скрининговое обследование на лепру лиц, проживающих в эндемичных регионах, а также наблюдение за контактными с больными лепрой с помощью молекулярных методов диагностики способствует раннему обнаружению случаев заболевания. ПЦР может способствовать ранней диагностике лепры даже при отсутствии подтверждения другими диагностическими исследованиями [12]. Глобальная стратегия ВОЗ по борьбе с лепрой на 2021-2030 рекомендует улучшить лабораторный потенциал, включая молекулярную диагностику [8]. Диагностика малобактериальных форм заболевания всегда является сложной задачей, однако ПЦР может служить полезным инструментом для этой цели [5]. ПЦР также может помочь дифференцировать лепру от других кожных заболеваний. Кроме того, было показано, что обнаружение ДНК *M.leprae* методом ПЦР у больных лепрой свидетельствует о том, что больной является бактериовыделителем и представляет опасность для окружающих, что значительно увеличивает вероятность развития болезни у контактных лиц [10]. Особенно это актуально для Астраханской области, являющейся эндемичной по лепре, где выявляются новые случаи болезни. Все это диктует необходимость создания быстрого и точного скринингового метода идентификации *M.leprae*. В настоящее время в Российской Федерации нет зарегистрированных тест-систем для идентификации *M.leprae* с использованием ПЦР анализа, а имеющиеся методы применяются в научных целях в качестве чувствительных диагностических тестов для обнаружения инфицирования *M.leprae* [1,2,3]. Среди доступных диагностических методов, применимых для лабораторного подтверждения, ПЦР анализ с использованием RLEP-праймеров показал самую высокую специфичность и чувствительность для обнаружения *M.leprae* в биопсиях и скарификатах кожи больных лепрой [15]. Однако данных о валидации мазков из носа, менее инвазивного метода отбора проб, применяемого в полевых условиях, недостаточно, поэтому целью данного

исследования была разработана ПЦР-метод с использованием праймеров к *RLEP*-последовательности *M.leprae*, применимых для соскобов со слизистой оболочки носа. Сравнительный анализ чувствительности и специфичности разработанной тест-системы показал ее превосходство над бактериоскопией. Предпочтительность ее применения в России по сравнению с зарубежной тест-системой, основанной на ПЦР с гибридизацией, для которой необходимо специализированное дорогостоящее оборудование и реактивы, совместимые только с данным оборудованием, также очевидна.

Таким образом, разработанный метод детекции возбудителя лепры на основе ПЦР позволяет проводить неинвазивное взятие биологического материала, значительно сокращает время выполнения исследования при использовании отечественного оборудования и реактивов. Применение данной тест-системы будет способствовать выявлению заболевания на ранних стадиях, что особенно актуально в эндемичных регионах.

Заключение. Существенную роль в развитии методов ранней диагностики лепры может сыграть разработанная тест-система идентификации ДНК *M.leprae*, а высокая чувствительность, специфичность, скорость, неинвазивность позволяет использовать ее при скрининговых обследованиях населения на лепру, контактных лиц и мигрантов.

Работа выполнялась в рамках государственного задания №056-00113-21-00 «Разработка методов диагностики и лечения лепрозной инфекции на основе принципов персонализированной медицины»

Литература

1. Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д. Г. Совершенствование ПЦР-диагностики лепры путем амплификации видоспецифичного повторяющегося элемента генома *Mycobacterium leprae* // Клиническая лабораторная диагностика. 2018. №63 (8). P. 511–516.
2. Сароянц Л.В., Арнаутова К.Ш., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции // Клиническая лабораторная диагностика. 2018. №63(1). P. 55–59.
3. Патент РФ №2641060, 15.01.2018. Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции. / Сароянц Л.В., Арнаутова К.Ш. [и др.]. Патент России №2641060. 2018. Бюл. № 2.
4. Araujo S.L. Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy // Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2016. №63. P. 1412–1420.
5. Barbieri R.R., Manta F.S.N., Moreira S.J.M., Sales A.M. Nery J.A.C., Nascimento P.R. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study // PLoS Negl Trop Dis. 2019. №13(3). P. e0007147.
6. Carvalho R.S., Foschiani I.M., Costa M., Marta S. N., Virmond M.C. Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018. № 37(10). P. 1863–1867.
7. Cole S.T., Supply P., Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity // Lepr Rev. 2001. №72. P. 449–461.
8. Cooreman E. Contact Tracing and Post-exposure Prophylaxis in Global Consultation of NLP Managers, Partners and Affected Persons on Global Leprosy Strategy 2021-2030 In: WHO Report of the Virtual Meeting. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020. P. 12–14.
9. Daps P. Why we should stop using the word leprosy // Lancet Infect. Dis. 2020. №1. P. 10–11.
10. Gama R.S., Gomides T.A.R., Gama C.F.M., Moreira S.J.M. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts // BMC Infectious Diseases. 2018. № 18(1). P. 153.
11. Martinez A.N., Talhari C., Moraes M.O., Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic // PLoS Negl Trop Dis. 2014. № 8(4). P. e2655.
12. Mostafa kamel, N., Hashem, O., Khodair, H., Abd El-Samee, H. Polymerase Chain Reaction versus Slit Skin Smear in Diagnosis of Leprosy; A Cross Sectional Study // International Journal of Medical Arts. 2020. №2(3). P. 650–654.
13. Reis E.M., Araujo S., Lobato J. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset // Clin Microbiol Infect. 2014. № 20(5). P. 447–452.
14. Saar M., Beissner M., Gültekin F. RLEP LAMP for the laboratory confirmation of leprosy: towards a point-of-care test // BMC Infect Dis. 2021. № 21. P. 1186.
15. Turankar R.P., Pandey S., Lavania M. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples // Int J Mycobacteriology. 2015. № 4(1). P. 54–59.

References

1. Obraztsova OA, Verbenko DA, Karamova AE, Semyonova VG, Kubanov AA, Deryabin DG. Sovershenstvovanie PCR-diagnostics lepry putem amplifikacii vidospecifichnogo povtorjajushhegosja jelementa genoma Mycobacterium leprae [Improvement of PCR diagnostics of leprosy by amplification of a species-specific repeating element of the Mycobacterium leprae genome]. Clinical laboratory diagnostics. 2018; 63 (8): 511-6. Russian.
2. Saroyants LV, Arnaudova KSh, Abramov DD, Trofimov DYu. Razrabotka laboratornoj diagnostiki lepry s pomoshh'ju polimeraznoj cepnoj reakcii [Development of laboratory diagnostics of leprosy using polymerase chain reaction]. Clinical laboratory diagnostics. 2018; 63 (1): 55-9. Russian.
3. Saroyants LV, Arnaudova KSh. RF patent No. 2641060, 15.01.2018. Sposob identifikacii DNK mikobakterij lepry s pomoshh'ju polimeraznoj cepnoj reakcii [Method for identifying DNA of mycobacterium leprosy using polymerase chain reaction]. Russian federation Patent No. 2641060. Bul. No. 2.
4. Araujo SL. Molecular evidence for the aerial route of infection of Mycobacterium leprae and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2016;63: 1412-20.
5. Barbieri RR, Manta FSN, Moreira SJM, Sales AM, Nery JAC, Nascimento PR. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(3): e0007147.
6. Carvalho RS, Foschiani IM, Costa M, Marta SN, Virmond MC. Early detection of M. leprae by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018; 37(10): 1863-7.
7. Cole ST, Supply P, Honoré N, et al. Repetitive sequences in Mycobacterium leprae and their impact on genome plasticity. Lepr Rev. 2001;72: 449-61.
8. Cooreman E. Contact Tracing and Post-exposure Prophylaxis in Global Consultation of NLP Managers, Partners and Affected Persons on Global Leprosy Strategy 2021-2030 In: WHO Report of the Virtual Meeting. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020.
9. Deps P. Why we should stop using the word leprosy. Lancet Infect. Dis; 2020
10. Gama RS, Gomides TAR, Gama CFM, Moreira SJM. High frequency of M. leprae DNA detection in asymptomatic household contacts. BMC Infectious Diseases. 2018; 18(1):153.
11. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(4): e2655.
12. Mostafa kamel N, Hashem O, Khodair H, Abd El-Samee H. Polymerase Chain Reaction versus Slit Skin Smear in Diagnosis of Leprosy; A Cross Sectional Study. International Journal of Medical Arts. 2020; 2(3): 650-4.
13. Reis EM, Araujo S, Lobato J, et al. Mycobacterium leprae DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(5):447-52.
14. Saar M, Beissner M, Gültekin F, et al. RLEP LAMP for the laboratory confirmation of leprosy: towards a point-of-care test. BMC Infect Dis. 2021; 21 1186.
15. Turankar RP, Pandey S, Lavania M, et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of M. leprae DNA from clinical and environmental samples. Int J Mycobacteriology. 2015; 4(1):54-9.

Библиографическая ссылка:

Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Наумов В.З. Разработка ПЦР-метода идентификации *M.leprae* для скринингового обследования населения на лепру // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2022. №2. Публикация 3-5. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-2/3-5.pdf> (дата обращения: 21.04.2022). DOI: 10.24412/2075-4094-2022-2-3-5*

Bibliographic reference:

Saroyants LV, Arnaudova KSh, Naumov VZ. Razrabotka PCR-metoda identifikacii M.leprae dlja skринингoвoгo oбsлeдoвaния нaсeлeния нa лeпpy [Development of per method for m.leprae identification in population screening for leprosy]. Journal of New Medical Technologies, e-edition. 2022 [cited 2022 Apr 21];2 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-2/3-5.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-2-3-5

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-2/e2022-2.pdf>