

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273)
Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
info@cmac-journal.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование
Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2023.

Содержание

Болезни и возбудители

- Эйдельштейн И.А.
332 *Mycoplasma pneumoniae* – современные данные о строении, молекулярной биологии и эпидемиологии возбудителя
- Зырянов С.К., Бутранова О.И., Абрамова А.А.
350 Профиль госпитализированных пациентов с летальным исходом вследствие COVID-19
- Долгополов И.С., Зайцева А.В., Хамцова Ж.В., Иванова А.В., Цветкова Е.О.
358 Диссеминированная инфекция *Mycobacterium genavense* у ранее здорового ребенка: описание клинического случая и обзор литературы

Антимикробные препараты

- Резолюция совета экспертов
366 Цефподоксима проксетил – новые возможности антибактериальной терапии респираторных инфекций
- Козлов Р.С., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Микотина А.В., Азизов И.С., Трушин И.В., Дехнич А.В.
372 *In vitro* активность цефподоксима в отношении клинических изолятов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes*
- Веселов А.В.
379 Клиническая фармакология и практические аспекты применения изавуконазола
- Гомон Ю.М., Колбин А.С., Арепьева М.А., Каляпин А.А., Балыкина Ю.Е., Курылев А.А., Кузьменков А.Ю., Козлов Р.С.
395 Потребление антимикробных препаратов в РФ в 2008–2022 гг.: фармакоэпидемиологическое исследование

Антибиотикорезистентность

- Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Маянский Н.А., Чеботарь И.В.
401 Новые мутации в генах, связанных с устойчивостью к цефидероколу, у клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa*

Опыт работы

- Коробова А.Г., Мещурова С.Ю., Трушина Е.Е., Самоходская Л.М.
408 Опыт использования автоматического анализатора для диагностики инфекций мочевыводящих путей
- Каражас Н.В., Пульнова Н.Л., Рыбалкина Т.Н., Бошняк Р.Е., Корниенко М.Н., Аветисян Л.Р., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Кабикова О.Ф., Габриэлян Н.И.
415 Значение герпесвирусных инфекций в этиологии бронхолегочных осложнений у пациентов, перенесших трансплантацию сердца
- Лавренчук Л.С., Миногина Т.В., Вахрушева Д.В., Скорняков С.Н.
421 Лекарственная устойчивость клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резектатов костной ткани пациентов с туберкулезными спондилитами
- Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Башкина О.А., Наумов В.З.
428 Роль персонализированной медицины в оценке эффективности лечения лепры

Роль персонализированной медицины в оценке эффективности лечения лепры

Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Башкина О.А., Наумов В.З.

ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань, Россия

Контактный адрес:

Людмила Валентиновна Сароянц
Эл. почта: luda_saroyants@mail.ru

Ключевые слова: лепра, персонализированная медицина, микобактерии лепры, полимеразная цепная реакция, жизнеспособность микобактерий.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Разработать метод определения жизнеспособности *M. leprae* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) для оценки эффективности лечения.

Материалы и методы. Исследованы 54 скарификата и 10 биоптатов кожи от больных лепрой. В качестве мишени использовали рибосомальные гены 16S рРНК.

Результаты. Установлена высокая чувствительность и специфичность разработанного метода ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. *M. leprae* детектировались в среднем в 2 раза чаще методом ОТ-ПЦР по сравнению с методом бактериоскопии как до лечения, так и после его шестимесячного курса ($p < 0,05$).

Выводы. Разработанный способ определения жизнеспособности *M. leprae* с помощью ПЦР с обратной транскрипцией позволяет использовать персонализированный подход к оценке эффективности антимикобактериального лечения у больных лепрой.

Original Article

The role of personalized medicine in evaluating the effectiveness of leprosy treatment

Saroyants L.V., Arnaudova K.Sh., Bashkina O.A., Naumov V.Z.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Contacts:

Lyudmila V. Saroyants
E-mail: luda_saroyants@mail.ru

Key words: leprosy, personalized medicine, mycobacterium leprosy, polymerase chain reaction, viability of mycobacteria.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To develop the method for determining the viability of *M. leprae* using polymerase chain reaction to evaluate the effectiveness of treatment.

Materials and methods. 54 scarifications and 10 biopsies of the skin of patients with leprosy were studied. Ribosomal 16S rRNA genes were used as a target.

Results. The high sensitivity and specificity of the developed real-time reverse transcription PCR method was established. *M. leprae* were detected on average 2 times more often by RT-PCR compared with the bacterioscopy method both before treatment and after its six-month course ($p < 0.05$).

Conclusions. The developed method for determining the viability of *M. leprae* using reverse transcription PCR allows using a personalized approach to evaluating the effectiveness of antimycobacterial treatment in patients with leprosy.

Введение

Персонализированная (прецизионная, индивидуализированная) медицина – новая быстро развивающаяся область здравоохранения, направленная на применение обоснованного подхода к лечению пациента, учитывая его конкретные особенности, чтобы сделать само лечение таким же индивидуальным, как и болезнь [1]. Она включает в себя идентификацию генетической,

протеомной и клинической информации для того, чтобы сделать точные прогнозы относительно восприимчивости человека к развитию заболевания, его течения и реакции на лечение [2]. Персонализированная медицина основывается на концепции, согласно которой каждый индивид обладает уникальными биологическими свойствами, определяющими его реакцию на болезнь, и ис-

пользует информацию о них для улучшения диагностики и лечения [3]. Имеются убедительные доказательства того, что персонализированный подход в ведении пациентов с инфекционными заболеваниями довольно эффективен [4, 5]. Инфекционным патологиям присущи две ключевые переменные: инфицирующий патоген и воспринимающий его хозяин. Поэтому при инфекционных заболеваниях для разработки эффективных стратегий их лечения в равной степени важна информация как о последовательностях генома инфицирующего агента, так и об индивидуальных иммуногенетических свойствах инфицированного [6, 7].

Практика использования генетической информации о патогенах для диагностики и лечения инфекционных заболеваний не нова, но методический прогресс последних лет, в первую очередь в области молекулярно-генетических технологий, значительно расширил перспективы широкого применения этой информации в клинике. Применение методов персонализированной медицины при инфекционных заболеваниях для определения видов микроорганизмов в клинических образцах, их численности, а также физиологического состояния возбудителей позволит повысить эффективность лечения и уменьшить риск появления лекарственно-устойчивых штаммов. Фундаментальным состоянием микробных клеток, как и всего живого, является жизнеспособность, которая у большинства возбудителей инфекционных болезней определяется с помощью методов культивирования. Для некультивируемых бактерий, одной из которых является *Mycobacterium leprae*, вызывающая лепру (проказу или болезнь Гансена) [9, 10] возможность выявления жизнеспособности появилась только с внедрением технологии ПЦР [8].

Лепра представляет собой хроническое инфекционное заболевание, поражающее кожу с прогрессирующей периферической невропатией, с потенциальной инвалидизацией и стигматизацией [11]. Несмотря на усилия по контролю этого заболевания, включая использование комбинированной химиотерапии стабилизацию числа зарегистрированных новых случаев болезни за последние десятилетия, лепра остается эндемичной во многих странах [12–14]. Проблемой в лепрологии все еще остаются рецидивы заболевания, приводящие к повторной госпитализации, увеличению степени инвалидизации больных и осложняющие эпидемиологическую ситуацию. Предрасполагающими факторами, влияющими на патогенез рецидива, являются: бациллярная персистенция, присутствующая примерно в 10% случаях при многобактериальной (лепроматозной) лепре; лекарственная устойчивость, обусловленная мутациями в генах-мишенях; повторное заражение, возможно, в результате гиперэндемичности региона [15]. Для предотвращения рецидивов заболевания и развития лекарственно-устойчивых штаммов *M. leprae* необходим персонализированный подход при лечении больных лепрой. На сегодняшний день ВОЗ рекомендует использовать комбинированную трехкомпонентную антимикобактериальную терапию (дапсон, рифам-

пицин, клофазимин) [16]. Для оценки эффективности лечения определяются количество и морфология кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) в скарификатах и биопсиях кожи. Однако данный метод имеет ограничения: относительно невысокую чувствительность и специфичность из-за сложности идентификации КУМ до вида морфологически.

Для определения жизнеспособности возбудителя лепры используется экспериментальная модель, предложенная Shepard С. и соавт. [17], при которой мышью заражают дозированным количеством *M. leprae* от больного в лапу и далее судят об их размножении в месте инокуляции [18]. Однако этот способ требует длительного времени (8–12 месяцев), трудоемкий и дорогостоящий.

Классический метод ПЦР не дифференцирует ДНК жизнеспособной бактериальной клетки от инактивированных или свободных фрагментов нуклеиновых кислот. Сочетание ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) нивелирует этот недостаток.

В качестве праймеров при проведении ПЦР при лепре использовались праймеры к различным участкам ДНК *M. leprae* [19–21]. Ранее было показано, что одним из наиболее перспективных является участок, кодирующий 16S рРНК [22]. РНК – более нестабильная молекула, чем ДНК, и при гибели она деградирует быстрее. В связи с этим детекция РНК более точно коррелирует с присутствием живых бактерий. Известно, что матричная РНК (мРНК) имеет самый короткий период полураспада и, таким образом, может быть идеальной мишенью для разработки зондов при определении жизнеспособности возбудителя. Препятствием этому служит слишком короткий период полураспада РНК и технические трудности очистки и обнаружения мРНК. Рибосомная РНК (рРНК) представляет собой молекулу-мишень, присутствующую в большом количестве копий. Из-за эволюционно консервативных, а также вариабельных областей, наличия большого количества копий (10^3 – 10^4 на клетку) и корреляции с жизнеспособностью использование именно 16S рРНК мишени для ПЦР наиболее выгодно [23].

Цель исследования – разработать метод оценки эффективности антимикобактериальной терапии лепры на основе определения жизнеспособности *M. leprae* с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись 64 образца, полученные от больных лепрой (54 скарификата и 10 биопсий кожи). Проведено 126 молекулярно-генетических исследований.

Для выделения нуклеиновых кислот из биоптатов и скарификатов кожи применяли метод экстракции, основанный на их лизисе, преципитации, многократной отмывки полученного препарата с помощью набора «Проба-НК» (ООО «НПО ДНК-технология», Москва). Использовали кожные биоптаты размером 10–25 мм³

на границе здоровой и пораженной кожи, взятые после предварительной местной анестезии. Для взятия кожных скарификатов на пораженных участках делали небольшой разрез (глубиной 1–2 мм), стерильным одноразовым зондом собирали тканевую жидкость. Полученные образцы помещали в пробирки с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. и удаляли надосадочную жидкость, оставляя в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием комплекта реагентов для обратной транскрипции (ООО «НПФ ДНК-технология», Москва). Выделенные 5 мкл ДНК добавляли в амплификационную смесь, общим объемом 25 мкл. Последовательность нуклеотидов праймеров и зонда к 16S рРНК *M. leprae*: 5'-CATGTCTTGTGGTGGAAAGC-3'; 5'-CACCCACCAACAAGCTGAT-3'; 5'-CATCCTGCACCGCA-3'. ПЦР проводили в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Отработанный режим амплификации для проведения ПЦР-РВ: 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; хранение при 10°C. Для проведения и учета результатов использовали термоциклер «ДТ-96 Real-time» (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия).

Специфичность метода оценивали на кожных биоптатах, полученных от больных лепрой, и музейных штаммах различных микобактерий: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. vaccae*, *M. intracellulare*, *M. clegg*, *M. duvalii*, *M. phlei*, *M. avium*, *M. lufu*, *M. gastri*, *M. goodii*, *M. bovis*, *M. smegmatis*, *M. paratuberculosis*. Изоляты исследовали в пределах 100 клеток в образце. Ни один из них не показал неспецифичного сигнала в ПЦР. Для определения значимости различий при сравнении двух независимых выборок применялся критерий Манна – Уитни. Значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

Для определения чувствительности предлагаемой тест-системы проведено сравнительное изучение выявления *M. leprae* с помощью стандартного бактериоскопического метода и разработанного способа на основе ОТ-ПЦР. Результаты, демонстрирующие более высокую чувствительность метода ОТ-ПЦР по сравнению с бактериоскопическим методом, представлены в Рисунке 1.

Так, если методом бактериоскопии в скарификатах кожи от больных лепрой *M. leprae* обнаруживались в 59,3% случаев, то при использовании ОТ-ПЦР – в 66,7%. При идентификации возбудителя лепры в биоптатах кожи во всех образцах от больных лепрой (100%) были обнаружены *M. leprae* с помощью метода ОТ-ПЦР, тогда как стандартным методом бактериоскопии только в 90% случаев.

Комбинированная специфическая терапия больных лепрой проводится в течение 6 месяцев (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 29 декабря

2012 г. N 1681н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при лепре, активная стадия»). По окончании терапии проводили повторные лабораторные исследования. Для изучения возможности использования разработанной тест-системы для оценки эффективности специфического противолепрозного лечения исследовались скарификаты с 5 участков кожи от 6 пациентов с активной стадией заболевания (5 вновь выявленных больных с лепроматозным типом лепры и один больной с рецидивом) (Рисунок 2).

Как видно на Рисунке 2, *M. leprae* детектировались в среднем в 2 раза чаще методом ОТ-ПЦР по сравнению с методом бактериоскопии как до лечения, так и после его шестимесячного курса ($p < 0,05$). Так, у 5 вновь выявленных больных лепрой до начала лечения бактериоскопически КУМ обнаруживались в 17 скарификатах, тогда как методом ОТ-ПЦР жизнеспособные *M. leprae* выявлялись в 25 скарификатах. После подтверждения диагноза больные получали антимикобактериальную терапию по схеме, рекомендованной ВОЗ. Через 6 месяцев лечения отмечалось снижение процента положительных образцов как при бактериоскопическом исследовании (2 скарификата), так и при ОТ-ПЦР-анализе (5 скарификатов), что свидетельствует об эффективности проводимого противолепрозного лечения. Однако, только у одного пациента *M. leprae* не обнаруживались ни одним из использованных методов детекции. Именно у него отмечался выраженный регресс заболевания, что обусловило прекращение специфической антимикобактериальной терапии. У другого пациента *M. leprae* выявлялись обоими методами, а у трех пациентов – только методом ОТ-ПЦР. Кроме того, на коже этих пациентов сохранялась диффузная инфильтрация. Всем четырем больным был продолжен курс терапии, так как ОТ-ПЦР анализ на 16S рРНК детектирует именно жизнеспособные *M. leprae*. После 9 месяцев лечения у трех больных ни в одном исследовании *M. leprae* не обнаруживались, а у одного пациента курс терапии пришлось продлить до 12 месяцев, после чего он стал бактерионегативным. Ранее авторами из Индии [24] было показано, что у больных с высокой бактериальной нагрузкой в 3,3% случаев жизнеспособные микобактерии лепры сохраняются и после 12 месяцев терапии.

Таким образом, использование ОТ-ПЦР анализа позволило индивидуально подойти к продолжительности лечения, что, в конечном счете, способствовало предотвращению персистенции *M. leprae* в организме больных и в дальнейшем снизило степень риска рецидива заболевания. Для подтверждения жизнеспособности возбудителя лепры нами была использована модель Shepard С.С. Материалом от больных лепрой были заражены мыши линии СВА. Макроскопических изменений в зараженных лапках спустя 12 месяцев после заражения не отмечалось. При микроскопическом исследовании у всех животных отмечалось размножение *M. leprae*, при ПЦР анализе на 16S рРНК микобактерии лепры также детектировались.



Рисунок 1. Результаты обнаружения *M. leprae* в кожных образцах различными методами



Рисунок 2. Результаты обнаружения *M. leprae* в скарификатах кожи у больных с активным лепрозным процессом в ходе лечения

* различия между группами статистически значимы ($p < 0,05$).

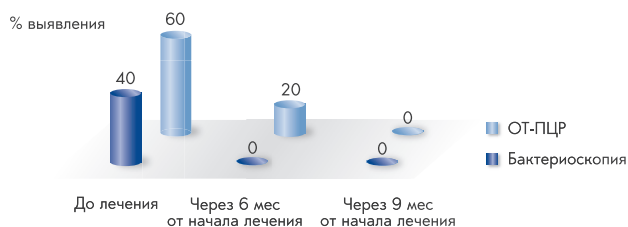


Рисунок 3. Результаты обнаружения *M. leprae* в скарификатах кожи больного Л. в зависимости от сроков лечения

Для иллюстрации вышеизложенных результатов приводим клинический пример. В процессе проведения исследования у больного Л., 1967 г.р. с лепроматозным типом лепры выявлен рецидив заболевания, который был подтвержден бактериоскопическим методом (в 2-х скарификатах обнаружены КУМ) и методом ПЦР (в 3 скарификатах кожи выявлена ДНК жизнеспособных *M. leprae*). После постановки диагноза назначено противорецидивное лечение. Через 6 и 9 месяцев у больного повторно взяты скарификаты (5 локусов) для оценки эффективности проводимого лечения (Рисунок 3).

Через 6 месяцев после начала лечения в ОТ-ПЦР исследовании в одном скарификате детектировались *M. leprae*, тогда как бактериоскопический анализ был отрицательным, а изменения на коже сохранялись. На основании этого лечение было продолжено и через 9 месяцев микобактерии лепры не выявлялись ни одним из методов. Клинически у больного отмечался регресс заболевания, после чего он был выписан под амбулаторное наблюдение.

Таким образом, на основании полученных результатов, разработанный нами способ идентификации микобактерий лепры с помощью ПЦР с обратной транскрипцией можно использовать для персонифицированного подхода к оценке эффективности антимикобактериального лечения у больных лепрой.

Заключение

По мере того, как мы вступаем в эру растущей устойчивости к противомикробным препаратам, роль персонализированной медицины для лучшего понимания клинических исходов и осложнений инфекционных болезней становится все более важной [25, 28]. В конечном счете улучшение результатов лечения пациентов с более высокими и более быстрыми показателями излечения может привести к снижению затрат на здравоохранение в связи с длительным пребыванием пациента в больнице и снижению злоупотребления антибиотиками.

Персонализированная медицина в области микобактериологии может применяться на разных уровнях управления, таких как профилактика, прогнозирование, диагностика, лечение [1]. Концепция прецизионной медицины при туберкулезе в последнее время стала предметом дискуссий. Было замечено, что не каждый человек считается полностью излеченным в конце определенного режима лечения, что диктует необходимость изучения индивидуальной генетической изменчивости у больных туберкулезом в ответ на лекарства (например, эффективность метаболизма лекарств). Кроме того, различия в штаммах микобактерий с точки зрения чувствительности к лекарственным средствам также могут определять эффективность лечения (например, заражение лекарственно-устойчивыми штаммами *M. tuberculosis*). Эти факторы (эффективность индивидуальной способности метаболизировать лекарство у человека и заражение лекарственно-устойчивыми микобактериями) определяют успех лечения туберкулеза и, следовательно, способствуют успеху программы его элиминации [26]. Соответственно, новые терапевтические руководства рекомендуют персонализированное лечение на основе результатов изучения лекарственной чувствительности [27], что в идеале должно сочетаться с информацией о фармакокинетике и фармакодинамике антибиотиков. Все это в полной мере можно отнести и к стратегии лечения лепры. На наш взгляд, все длительно текущие микобактериальные инфекции, к которым относятся туберкулез и лепра, должны дополниться и определением жизнеспособности возбудителя заболевания, что позволит сделать шаг вперед к персонализированной медицине, способной своевременно обеспечить наилучшее лечение, соответствующее конкретному пациенту.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка методов диагностики и лечения лепрозной инфекции на основе принципов персонифицированной медицины».

Литература

- Mirsaeidi M. Personalized medicine approach in mycobacterial disease. *Int J Mycobacteriol.* 2012;1(2):59-64. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2012.03.001
- Torkamani A., Andersen K.G., Steinhubl S. R., Topol E.J. High-definition medicine. *Cell.* 2017;170:828-843. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.007
- Maha A.A.M., Michael K.M. Personalized medicine. Is it time for infectious diseases? *Saudi Med J.* 2016; 37(12):1309-1311. DOI: 10.15537/smj.2016.12.16837
- Gardy J.L., Loman N.J. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nat Rev Genet.* 2018;19:9-20. DOI: 10.1038/nrg.2017.88
- Collins F.S., Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Eng J Med.* 2015;372:793-795. DOI: 10.3389/fpsyt.2015.00088
- Ladner J.T., Grubaugh N.D., Pybus O.G., Andersen K.G. Precision epidemiology for infectious disease control. *Nat Med.* 2019;25:206-211. DOI: 10.1038/s41591-019-0345-2
- Bissonnette L., Bergeron M.G. Infectious disease management through point-of-care personalized medicine molecular diagnostic technologies. *J Pers Med.* 2012;2:50-70. DOI: 10.3390/jpm2020050
- Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
- Montalvo N.F., Davis J., Vicente J., Pittiglio R., Ravel J., Hill R.T. Integration of culture-based and molecular analysis of a complex sponge-associated bacterial community. *PLoS One.* 2014;9:e90517. DOI: 10.1371/journal.pone.0090517
- Tomic-Canic M., Perez-Perez G.I., Blumenberg M. Cutaneous microbiome studies in the times of affordable sequencing. *J Dermatol Sci.* 2014;75:82-87. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.05.001
- Chen K.H., Lin C.Y., Su S.B., Chen K.T. Leprosy: a review of epidemiology, clinical diagnosis, and management. *J Trop Med.* 2022;35:1-13. DOI: 10.1155/2022/8652062
- Reza N.R., Kusumaputro B.H., Alinda M.D., Listiawan M.Y., Thio H.B., Prakoeswa C.R.S. Pediatric leprosy profile in the postelimination era: a study from Surabaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2022;106:775-778. DOI: 10.4269/ajtmh.21-0458
- Naaz F., Mohanty P.S., Bansal A.K., Kumar D., Gupta U.D. Challenges beyond elimination in leprosy. *Int J Mycobacteriol.* 2017;6(3):222-228. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_70_17
- WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. Available at: www.who.int/publications/i/item/who-9736-429-450. Accessed December 2022.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. Coordenação geral da Hanseníase e Doenças de eliminação: Nota informativa N° 51 sobre recidiva, insuficiência, falência e resistência a medicamentos na hanseníase, Brasília. 2015. Available at: www.saude.pr.gov.br/. Accessed December 2022.
- Ministry of Health, Health Surveillance Secretariat. 2020. *Epidemiological leprosy Bulletin.* 2020;48:1.
- Shepard C.C. The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into footpads of mice. *J Exp Med.* 1960;112:445-454. DOI: 10.1084/jem.112.3.445
- Shepard C.C., McRae D.H. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr.* 1968;36:78-82. PMID: 4869698.
- De Wit M.Y., Klatser P.R. Purification and characterization of a 36 kDa antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol.* 1988;134:1541-1548. DOI: 10.1099/00221287-134-6-1541
- Kurabachew M., Wondimu A., Ryon J.J. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1988;36:1352-1356. DOI: 10.1128/JCM.36.5.1352-1356.1998
- Martinez N.A., Lahiri R., Pittman L.T., Scollard D.M. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2124-2130. DOI: 10.1128/JCM.00512-09
- Saroyants L.V., Arnaudova K.Sh., Abramov D.D., Trofimov D.Yu. Development of laboratory diagnostics of leprosy using polymerase chain reaction. *Russian clinical laboratory diagnostics.* 2018;63(1):55-59. Russian. (Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(1):55-59.) DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-1-55-59
- Singh V., Kumari G., Kumar M., Vijayasimha M., Kumar Jha R. Assessment of the viability of *Mycobacterium leprae* by 16S rRNA using different methods for rapid extraction of rRNA. *Journal of Advances and Scholarly Researches in Allied Education.* 2019;16(5):345-352.
- Kamble R.R., Shinde V.S., Madhale S.P., Kamble A.A., Ravikumar B.P., Jadhav R. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28:57-59. DOI: 10.4103/0255-0857.58732
- Jensen S.O., van Hal S.J. Personalized medicine and infectious disease management. *Trends Microbiol.* 2017;25(11):875-876. DOI: 10.1016/j.tim.2017.09.006
- Khan N., Aparup D. Can the personalized medicine approach contribute in controlling tuberculosis in general and India in particular? *Prec Clin Med.* 2020;3(3):240-243. DOI: 10.1093/pccmedi/pbaa021
- Nahid P., Mase S.R., Migliori G.B., Giovanni S., Graham H.B., Jan L.B., et al. Treatment of drug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200:e93-e142. DOI: 10.1164/rccm.201909-1874ST
- Benjak A., Avanzi C., Singh P., Loiseau C., Girma S., Busso P., et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nat Commun.* 2018;24(9):352. DOI: 10.1038/s41467-017-02576-z