

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



<https://elibrary.ru/nzncgq>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Баймова Р.Р., Рябико Е.Г., Останкова Ю.В., Токаревич Н.К.

### ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ДЕТЕКЦИИ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия

*Оптимизирован способ детекции и генотипирования патогенных лептоспир в биологических образцах, на основе классической ПЦР с использованием трёх пар праймеров. При разработке метода использованы образцы, полученные от диких и синантропных мелких грызунов, собранных на территории Санкт-Петербурга. Согласно разработанному методу из клинического материала экстрагируют тотальную ДНК, далее с помощью амплификации по фрагменту гена *lipL32* определяют наличие или отсутствие ДНК патогенных лептоспир. Образцы, содержащие ДНК патогенных лептоспир, амплифицируют последовательно по двум фрагментами генов *rpoB* и *secY*. Регистрируют полученные результаты посредством электрофореза в агарозном геле с последующей детекцией на трансиллюминаторе. Полученные фрагменты секвенируют по Сэнгеру. Оптимизированный способ направлен на усовершенствование и расширение арсенала способов, предназначенных для выявления и генотипирования различных видов патогенных лептоспир в целях улучшения диагностики и профилактики заболевания.*

**Ключевые слова:** *Leptospira*; лептоспироз; генотипирование патогенных лептоспир; метод диагностики лептоспироза

**Для цитирования:** Баймова Р.Р., Рябико Е.Г., Останкова Ю.В., Токаревич Н.К. Оптимизация способа детекции и генотипирования патогенных лептоспир в биологических образцах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (3): 210-217. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-210-217>  
EDN: NZNCGQ

**Для корреспонденции:** Баймова Регина Равилевна, мл. науч. сотр. лаб. зооантропонозных инфекций; e-mail: [baimovar@yandex.ru](mailto:baimovar@yandex.ru)

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.09.2024  
Принята к печати 25.11.2024  
Опубликовано 25.02.2025

*Baimova R.R., Riabiko E.G., Ostankova Yu.V., Tokarevich N.K.*

### OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR DETECTION AND GENOTYPING OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA IN BIOLOGICAL SAMPLES

Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, St. Petersburg, Russia

*The method for detection and genotyping of pathogenic leptospires in biological samples has been optimized, based on classical PCR using three pairs of primers. When developing the method, samples obtained from wild and synanthropic small rodents collected in St. Petersburg were used. According to the method we developed, total DNA is extracted from clinical material, then the presence or absence of pathogenic Leptospira DNA is determined using amplification using a fragment of the *lipL32* gene. Two fragments of the *rpoB* and *secY* genes amplify samples containing DNA of pathogenic Leptospira sequentially. The results obtained are recorded by electrophoresis in an agarose gel, followed by detection on a transilluminator. The resulting fragments are sequenced using Sanger. The optimized method is aimed at improving and expanding the range of methods designed to identify and genotype various types of pathogenic leptospira in order to improve the diagnosis and prevention of the disease.*

**Key words:** *Leptospira*; leptospirosis; genotyping of pathogenic leptospira; diagnostic method for leptospirosis

**For citation:** Baimova R.R., Riabiko E.G., Ostankova Yu.V., Tokarevich N.K. Optimization of the method for detection and genotyping of pathogenic leptospira in biological samples. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 210-217  
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-210-217>  
EDN: NZNCGQ

**For correspondence:** Baimova R.R., junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St.Petersburg Pasteur Institute; e-mail: [baimova@pasteurorg.ru](mailto:baimova@pasteurorg.ru)

#### Information about authors:

Baimova R.R., <https://orcid.org/0000-0002-0145-2653>;  
Riabiko E.G., <https://orcid.org/0000-0001-8738-3021>;  
Ostankova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;  
Tokarevich N.K., <https://orcid.org/0000-0001-6433-3486>.

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 14.09.2024

Accepted 25.11.2024

Published 25.02.2025

**Введение.** Лептоспироз считается одним из самых распространённых зооантропонозных заболеваний, влияющих как на здоровье людей, так и животных, по всему миру. Ежегодно выявляют порядка миллиона заболеваний, и около 60 тыс. смертельных исходов. Наибольшие показатели регулярно регистрируются в развивающихся странах с тропическим климатом [1]. Вспышки лептоспироза связаны как с социальными факторами, так и с природными явлениями, такими как ураганы и наводнения, поскольку это создает благоприятные условия для выживания видов лептоспир в окружающей среде [2, 3].

В последнее десятилетие в Российской Федерации наблюдается тенденция к снижению заболеваемости, однако, в значительной степени это связано с отсутствием высокоточной доступной диагностики, и с тем, что при лёгком течении лептоспироза инфицированные люди не обращаются в медицинские учреждения. При этом активность природных очагов лептоспироза во всех федеральных округах страны сохраняется [4] и может приводить к эпидемиологическим вспышкам в случае природных катастроф.

Диагностические ошибки при лептоспирозе часто связаны с отсутствием специфических признаков и симптомов. Лёгкое течение лептоспироза часто регистрируется под другими диагнозами, и может наблюдаться как самокупирующееся лихорадочное заболевание. Тяжёлая форма характеризуется полиорганный недостаточностью и смертностью до 40% [5].

Клиническая лабораторная диагностика лептоспироза включает в себя прямые и косвенные методы обнаружения возбудителя. К косвенным методам обнаружения лептоспир, относят серологический метод, направленный на поиск антител: реакция микроагглютинации (РМА), иммуноферментный анализ (ИФА). К прямым методам относят микроскопию в тёмном поле, бактериологический и молекулярно-генетический методы, направленные на поиск самого возбудителя [6]. Молекулярно-генетический метод диагностики лептоспироза, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР), считается наиболее чувствительным и специфичным способом выявления лептоспир на ранних этапах заболевания, ещё до развития иммунного ответа.

Классификация лептоспир до 1989 года основана исключительно на их вирулентности, патогенные лептоспиры относили к виду *Leptospira interrogans*, сапрофитные к *Leptospira biflexa*. Дальнейшая классификация основана на антигенных характеристиках с использованием серологического метода. *L. interrogans* и *L. biflexa* содержат большое количество сероваров, которые, в свою очередь, собираются в серогруппы по антигенному родству [7]. Известно 32 серогруппы и 300 сероваров [8].

Использование серологической классификации в диагностике лептоспирозной инфекции имеет важное эпидемиологическое значение. Стандартной методи-

кой для определения сероваров является реакция микроагглютинации с перекрёстной абсорбцией антител. Основным ограничением данного метода является трудоёмкость, связанная с необходимостью наличия панелли живых культур и постоянной рекультивации этих штаммов [9].

Развитие молекулярно-генетических методов привело к созданию таксономической классификации, основанной на генотипических характеристиках. Помимо патогенных и сапрофитных штаммов, классифицированы виды с умеренным уровнем патогенности, при этом имеющие общего предка с патогенными видами [10].

По генетической классификации, основанной на полногеномном анализе, род *Leptospira* включает в себя 72 вида, сгруппированных в 4 субклады: патогенные (P1), промежуточные (P2), сапрофитные (S1, S2) [8].

Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей геномов лептоспир, позволил выяснить, что виды и серовары не имеют корреляционной связи, и один серовар может относиться к разным видам. На данный момент серотипирования недостаточно для выявления эпидемиологически значимых штаммов и генотипов [11].

Классификация с использованием молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР и секвенирование, является достойной альтернативой классификации на основании серотипирования. Таксономическая классификация необходима для отслеживания эволюционных связей между видами. Род *Leptospira* характеризуется открытым пангеномом и высокой способностью к горизонтальному переносу генов, то есть свободноживущие лептоспиры могут преобразовываться в патогенные виды и инфицировать людей и животных. Открытие новых и изучение генетики известных патогенных и промежуточных штаммов позволит улучшить диагностику, профилактику и контроль за лептоспирозной инфекцией [10].

Полногеномное секвенирование является полезным инструментом для классификации бактерий и может расширить понимание видоспецифичных характеристик штаммов, в зависимости от резервуарного хозяина, отследить эволюцию видов лептоспир [12]. Использование полногеномного анализа в качестве рутинной методики крайне ограничено высокой стоимостью приборов и реагентов, и необходимостью в высококвалифицированном персонале. Полногеномный анализ возможен исключительно из культивированных штаммов, что связано с необходимостью высокой концентрации образца и его чистоты от сторонних примесей. Культивирование лептоспир, сложный и иногда невыполнимый процесс, чаще всего связанный с прихотливостью данного микроорганизма. Помимо специальных питательных сред, и длительного времени инкубации, успех культивирования зависит от правильно собранного клинического материала [13]. Использование метода секвенирования по Сэнгеру представляется более доступным способом

молекулярно-генетического типирования.

В течение долгого времени для изучения видового разнообразия лептоспир использовали методику секвенирования последовательности фрагмента гена 16S рРНК. В настоящее время существует большое количество исследований, сообщающих о его низкой дискриминационной способности различать виды внутри клад, по причине его высокой консервативности [15, 16].

Описан целый ряд других генетических маркеров, используемых для выявления и генотипирования лептоспир. К ним относят фрагменты генов *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligB*, *secY*, *gyrB* и др. Отсутствие стандартного протокола приводит к тому, что исследователи используют разные генетические мишени, и сравнивать результаты затруднительно [14]. Исследование нескольких генов-мишеней позволит избежать дискриминационных ограничений, и поможет повысить актуальность

разработки новых диагностических инструментов [17].

Цель работы - оптимизация способа детекции и генотипирования патогенных лептоспир.

**Материал и методы.** Использованы образцы почек, изъятых из 190 особей диких и синантропных мелких млекопитающих (желтогорлые мыши - *Apodemus flavicollis*, рыжие полевки - *Myodes glareolus*, серые крысы - *Rattus norvegicus*).

Геномную ДНК получали с использованием набора «Рибопреп» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), согласно инструкции производителя.

Выявление и генотипирование патогенных лептоспир в образцах проведено с использованием олигонуклеотидов на основе классической ПЦР, с регистрацией результатов посредством электрофоретической детекции и последующим секвенированием по Сэнгеру (табл. 1).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для выявления и генотипирования патогенных лептоспир

Праймер	Нуклеотидная последовательность
Lept_1900f	5'- CCTCATGGGTTCCAACATGCA - 3'
Lept_2500R	5'- CGCATCCTCRAAGTTGTAWCCTT - 3'
SecY-F1	5'- ATGCCGATCATTTTTGCTTC - 3'
SecY_IVR	5'- GAGTTAGAGCTCAAATCTAAG - 3'
Lipl32_F5	5'- СТААГТТСАТАССГТГАТТТ - 3'
Lipl32R	5'- TGGGAAAAGCAGACCAACAGA - 3'

Состав амплификационной смеси представляет собой буферный раствор, содержащий Трис HCl (рН 8,8), сульфат аммония, MgCl<sub>2</sub>; ЭДТА; меркаптоэтанол; БСА; dNTP; Taq ДНК-полимеразу [15].

На первом этапе ПЦР проводили выявление положительных образцов с использованием прямого

и обратного праймеров *lipL32* (см. табл. 1) при указанных параметрах амплификации (табл. 2).

На следующем этапе из ДНК образцов, позитивных по *lipL32*, амплифицировали фрагменты генов *secY* и *rpoB* с использованием соответствующих праймеров SecY и Lept\_ (см. табл. 1).

Таблица 2

Параметры программ амплификации на программируемом термостате «Терцик»

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
<i>lipL32</i>			
1	95	5 мин	1
2	95	15 с	50
	60	20 с	
	72	30 с	
3	72	5 мин	1
<i>secY</i>			
1	95	5 мин	1
2	95	15 с	40
	56	20 с	
	72	40 с	
3	72	5 мин	1
<i>rpoB</i>			
1	95	5 мин	1
2	95	15 с	35
	63	20 с	
	72	40 с	
3	72	5 мин	1

Продукты амплификации визуализировали в 1,5% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием в сравнении с маркёром молекулярного веса. Электрофорез проводили при 150 V в течение 20 мин и визуализировали под ультрафиолетом.

Результаты интерпретировали на основании наличия или отсутствия фрагмента искомого размера в сравнении с коммерческим набором фрагментов ДНК известной длины. Результат амплификации считали положительным, если при использовании праймеров

*lipL32*, образуется фрагмент длиной 742 нуклеотида, праймеров *secY* фрагмент длиной 400 нуклеотидов, праймеров *proV* фрагмент длиной 600 нуклеотидов.

Секвенирующую реакцию проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили в генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems).

Полученные последовательности штаммов сравнивали с последовательностями, доступными в ба-

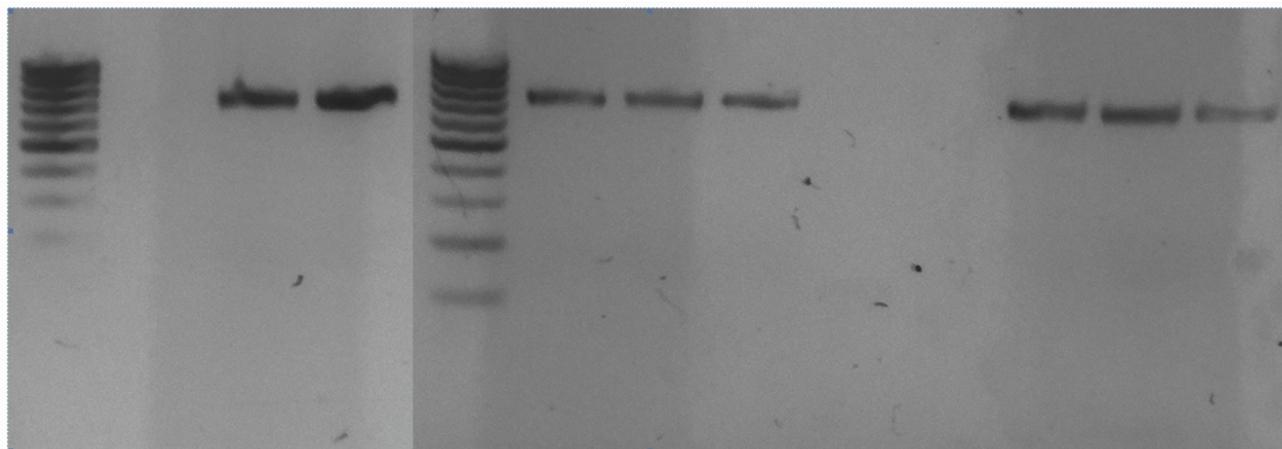


Рис. 1. Электрофореграмма положительных образцов по фрагменту гена *lipL32*.

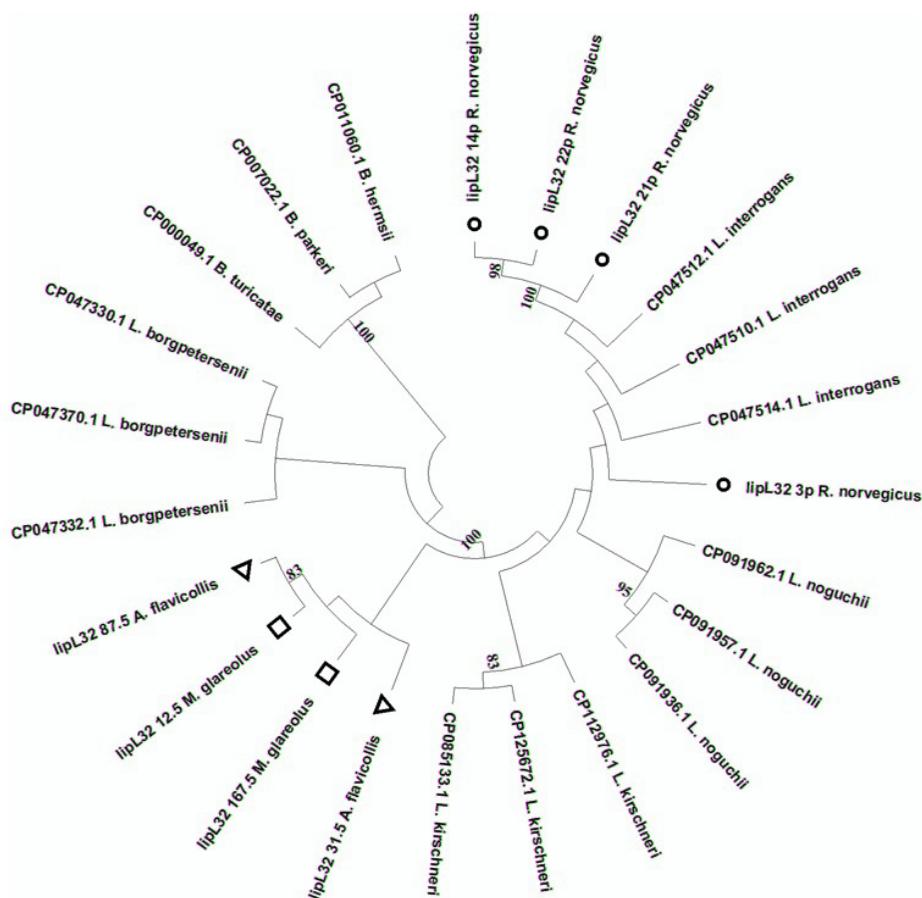


Рис. 2. Филогенетический анализ полученных последовательностей фрагмента гена *lipL32* в сравнении с последовательностями, полученными из GenBank. Внешней группой выбраны последовательности *Borrelia* spp. В зависимости от видовой принадлежности грызуна установлены маркёры, круг - серая крыса, треугольник - желтогорлая мышь, квадрат - жёлтая полёвка.

зе данных GenBank с помощью NCBI Blast. Оценка коэффициента расхождения нуклеотидных последовательностей проводилась в UGENE по алгоритму ClustalW. Построение филогенетических деревьев проводилось в MEGA 11 с использованием метода Maximum Likelihood, бустреп 1000. 24 полученные нуклеотидные последовательности, депонированы в международную базу данных GenBank, под номерами OR917411-OR917434.

**Результаты и обсуждение.** Оптимизирован способ выявления и генотипирования патогенных лептоспир в биологическом материале на основе классической ПЦР с регистрацией результатов посредством электрофоретической детекции и последующим секвенированием по Сэнгеру.

Согласно разработанному способу, выявление ДНК патогенных лептоспир проводилось с использованием праймеров (см. табл. 1), подобранных для фрагмента гена *lipL32*. Данный ген выбран благодаря его широкому использованию для диагностики лептоспироза из различного биологического материала [14]. Из 190 исследованных образцов, у 8 зафиксировано наличие искомого фрагмента длиной 742 нуклеотида (рис. 1).

С целью исключения ложноположительного результата, данные образцы секвенированы. Полученные последовательности сравнивали с референсными последовательностями, представленными в базе данных GenBank с использованием алгоритма BLASTn. По результатам анализа все исследуемые последова-

тельности отнесены к *Leptospira* spp. (рис. 2).

Использование данного гена для генотипирования патогенных лептоспир малоэффективно, так как коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей слишком низок (от 1% у видов *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*) (рис. 3).

Для дальнейшего генотипирования выбраны наиболее значимые, на наш взгляд, гены *secY* и *rpoB*. Данные гены успешно использованы в генотипических целях в различных исследованиях, и показали высокую дискриминационную способность [14, 16].

Положительные образцы, в количестве 8 штук, амплифицировали с двумя парами праймеров (см. табл. 1), подобранных для фрагментов генов *secY* и *rpoB*, визуализация результатов проведена с использованием электрофоретической детекции (рис. 4).

CP047514.1 <i>Leptospira interrogans</i>	0%
CP047512.1 <i>Leptospira interrogans</i>	0%
CP047510.1 <i>Leptospira interrogans</i>	0%
<i>lipL32</i> 21p <i>Rattus norvegicus</i>	2%
<i>lipL32</i> 14p <i>Rattus norvegicus</i>	2%
<i>lipL32</i> 3p <i>Rattus norvegicus</i>	0%
<i>lipL32</i> 22p <i>Rattus norvegicus</i>	2%
CP047332.1: <i>Leptospira borgpetersenii</i>	4%
CP047370.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	5%
CP047330.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	5%
<i>lipL32</i> 31.5 <i>Apodemus flavicollis</i>	4%
<i>lipL32</i> 167.5 <i>Myodes glareolus</i>	5%
<i>lipL32</i> 87.5 <i>Apodemus flavicollis</i>	5%
<i>lipL32</i> 12.5 <i>Myodes glareolus</i>	6%
CP125672.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	1%
CP085133.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	1%
CP112976.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	1%
CP091962.1 <i>Leptospira noguchii</i>	1%
CP091957.1 <i>Leptospira noguchii</i>	1%
CP091936.1 <i>Leptospira noguchii</i>	1%

Рис. 3. Коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей основных видов патогенных лептоспир по фрагменту гена *lipL32*.

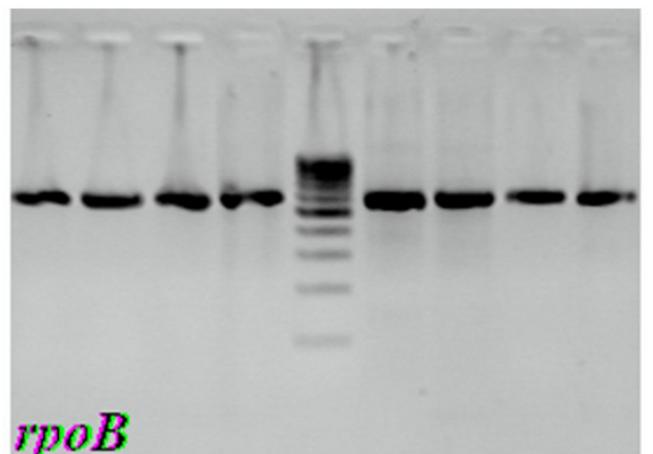
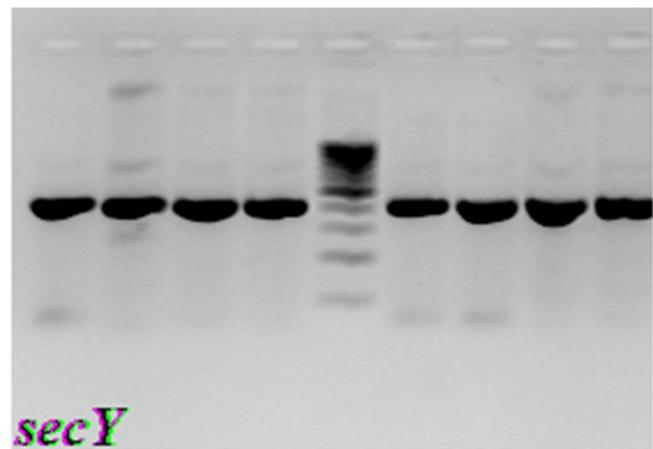


Рис. 4. Электрофореграмма в агарозном геле с продуктами амплификации по генам *secY* и *rpoB*.

По результатам филогенетического анализа полученных после секвенирования последовательностей по фрагментам генов *secY* и *rpoB*, с последовательностями, загруженными в GenBank, установлено, что искомые последовательности, полученные от серых крыс, имеют сходство с последовательностями, относящимися к виду *L. interrogans*, последовательности от рыжих полёвок и жёлтогорлых мышей к *L. borgpetersenii* (рис. 5, а, б).

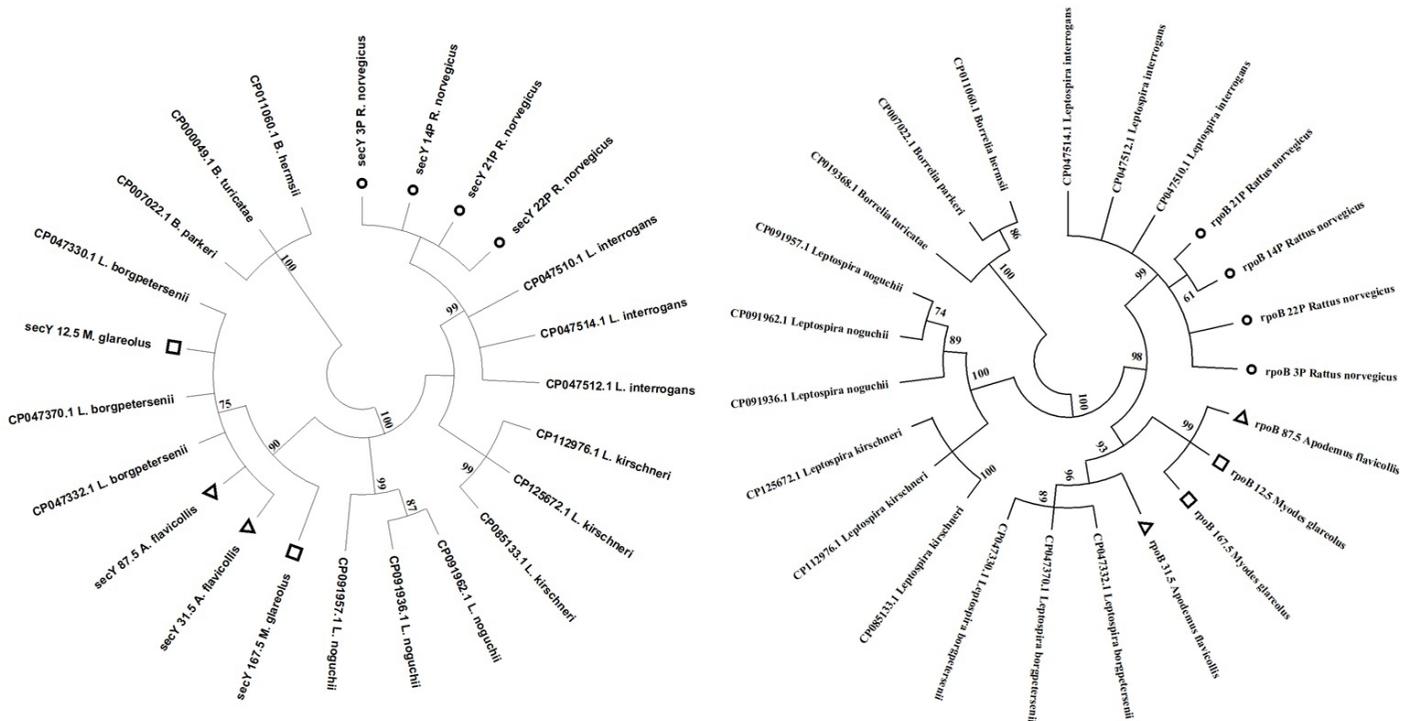


Рис. 5. Филогенетический анализ полученных последовательностей фрагментов гена *secY* (а) и *rpoB* (б) в сравнении с последовательностями, полученными из GenBank. Внешней группой выбраны последовательности *Borrelia* spp. В зависимости от видовой принадлежности грызуна установлены маркеры, круг – серая крыса, треугольник – желтогорлая мышь, квадрат – желтая полёвка.

Анализ выравнивания последовательностей показал коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей между основными патоген-

ными видами лептоспир по фрагменту гена *secY* от 9% до 18%, по фрагменту гена *rpoB* от 9% до 63% (рис. 6).

<b>CP047514.1 <i>Leptospira interrogans</i></b>	<b>0%</b>	<b>CP047514.1 <i>Leptospira interrogans</i></b>	<b>0%</b>
CP047512.1 <i>Leptospira interrogans</i>	0%	CP047512.1 <i>Leptospira interrogans</i>	0%
CP047510.1 <i>Leptospira interrogans</i>	0%	CP047510.1 <i>Leptospira interrogans</i>	0%
<i>secY</i> 21P <i>Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB</i> 21P <i>Rattus norvegicus</i>	0%
<i>secY</i> 14P <i>Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB</i> 14P <i>Rattus norvegicus</i>	0%
<i>secY</i> 3P <i>Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB</i> 3P <i>Rattus norvegicus</i>	0%
<i>secY</i> 22P <i>Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB</i> 22P <i>Rattus norvegicus</i>	0%
CP047332.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	18%	CP047332.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	9%
CP047370.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	18%	CP047370.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	9%
CP047330.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	18%	CP047330.1 <i>Leptospira borgpetersenii</i>	9%
<i>secY</i> 31.5 <i>Apodemus flavicollis</i>	18%	<i>rpoB</i> 31.5 <i>Apodemus flavicollis</i>	9%
<i>secY</i> 167.5 <i>Myodes glareolus</i>	19%	<i>rpoB</i> 167.5 <i>Myodes glareolus</i>	9%
<i>secY</i> 87.5 <i>Apodemus flavicollis</i>	18%	<i>rpoB</i> 87.5 <i>Apodemus flavicollis</i>	9%
<i>secY</i> 12.5 <i>Myodes glareolus</i>	18%	<i>rpoB</i> 12.5 <i>Myodes glareolus</i>	9%
CP125672.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	9%	CP125672.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	60%
CP085133.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	9%	CP085133.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	60%
CP112976.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	9%	CP112976.1 <i>Leptospira kirschneri</i>	60%
CP091962.1 <i>Leptospira noguchii</i>	11%	CP091962.1 <i>Leptospira noguchii</i>	62%
CP091957.1 <i>Leptospira noguchii</i>	12%	CP091957.1 <i>Leptospira noguchii</i>	62%
CP091936.1 <i>Leptospira noguchii</i>	11%	CP091936.1 <i>Leptospira noguchii</i>	63%

Рис. 6. Коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей основных видов патогенных лептоспир по фрагментам генов *secY* и *rpoB*. Последовательности, полученные в рамках настоящего исследования, выделены полужирным шрифтом.

Фрагмент гена *secY* является перспективной мишенью для генотипирования лептоспир, так как он имеет достаточный уровень дискриминационной способности. В исследовании 2008 года В. Victoria и соавт. [18] описали анализ локуса *S10-spc-α*, и в заключении отметили, что фрагмент гена *secY*, обеспечивает надежную идентификацию видов патогенных лептоспир. В 2020 году L. Grillová и соавт. [19] описали молекулярно-эпидемиологическое исследование, с использованием вложенной ПЦР нацеленной на локус *secY*. Результатом данного исследования была идентификация 20 генотипов *Leptospira*, циркулирующих как у людей, так и у животных [19]. L.D.S Medeiros и соавт. [20] в 2020 году опубликовали данные исследования мелких млекопитающих в лесах бразильской Западной Амазонки, видовая идентификация образцов проводилась с использованием генетического маркера *secY*.

Полученные нами результаты совпадают с данными других исследователей, использование данного гена в генотипических целях эффективно для широкого спектра исследуемого материала [21-23]. В международной базе данных GenBank представлено более четырех тысяч последовательностей гена *secY*, протяженностью от 200 до 4000 нуклеотидов, что облегчает сравнение и быструю идентификацию лептоспир.

Фрагмент гена *rpoB* для генотипирования используют реже, в GenBank загружено около 800 последовательностей, протяженностью от 560 до 3500 нуклеотидов. Однако высокий уровень различий между основными патогенными видами лептоспир по указанному региону генома открывает перспективы для его использования.

Анализ двух мишеней в целях генотипирования снижает риски ошибочной интерпретации полученных результатов.

Нуклеотидные последовательности, полученные при секвенировании фрагмента гена *lipL32*, показали низкую степень расхождения между основными патогенными видами лептоспир. Данная мишень, по нашему мнению, совпадающему с выводами некоторых исследователей, может использоваться в диагностических целях как инструмент скрининга [24].

**Заключение.** Оптимизированный способ детекции и генотипирования патогенных лептоспир в биологических образцах на основе классической ПЦР с использованием трех пар праймеров позволяет идентифицировать различные геномовиды лептоспир. Результаты нашего исследования свидетельствуют об эффективности разработанного способа для определения генотипов лептоспир, циркулирующих в популяциях диких и синантропных мелких млекопитающих.

онных штаммов *LEPTOSPIRA* spp. Санкт-Петербургского института Пастера на основе данных секвенирования гена 16S рРНК. *Инфекция и иммунитет*. 2023; (6): 1040-8. DOI: 10.15789/2220-7619-MAG-17028.

## REFERENCES

1. Her R., Crespín L., Etougbéché J., Groud K., Gnolonfoun M., Chapron A. et al. Seroprevalence and renal carriage of pathogenic *Leptospira* in livestock in Cotonou, Benin. *Veterinary medicine and science*. 2024; 10(3): e1430. DOI: 10.1002/vms3.1430.
2. Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Vaganova A.N. *Leptospirosis: a manual for doctors*. St. Petersburg: NIEM im. Pastera; 2010. (in Russian)
3. Pinto G.V., Senthilkumar K., Rai P., Kabekkodu S.P., Karunasagar I., Kumar B.K. Current methods for the diagnosis of leptospirosis: Issues and challenges. *Journal of microbiological methods*. 2022; 195: 106438. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106438.
4. Trankvilevsky D.V., Kiseleva E.Yu., Korzun V.M., Breneva N.V., Verzhutskaya Yu.A., Zarva I.D. et al. Epizootiological and epidemiological situation on leptospirosis in the Russian Federation over the period of 2013–2022 and the forecast for 2023. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2023; (3): 43-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-43-50. (in Russian)
5. Alexopoulou C., Proklou A., Kokkini S., Raissaki M., Konstantinou I., Kondili E. A fatal case of presumptive diagnosis of Leptospirosis involving the Central Nervous System. *Healthcare (Basel)*. 2024; 12(5): 568. DOI: 10.3390/healthcare12050568.
6. Verma V., Goyal M., Kala D., Gupta S., Kumar D., Kaushal A. Recent advances in the diagnosis of leptospirosis. *Frontiers in bioscience (Landmark ed.)*. 2020; 25(9): 1655-81. DOI: 10.2741/4872.
7. Levett P.N. Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*. 2001; 14(2): 296-326. DOI: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
8. Ca Ferreira L., de Fa Ferreira Filho L., V Cosate M.R., Sakamoto T. Genetic structure and diversity of the *rflB* locus of pathogenic species of the genus *Leptospira*. *Life science alliance*. 2024; 7(6): e202302478. DOI: 10.26508/lsa.202302478.
9. Sohm C., Willixhofer D., Fasching E., Waldner K., Deitzer N., Steiner J. et al. First isolation and genotyping of pathogenic *Leptospira* spp. from Austria. *Scientific reports*. 2024; 14(1): 4467. DOI: 10.1038/s41598-024-53775-w.
10. Vincent A.T., Schietekatte O., Goarant C., Neela V. K., Bernet E., Thibaux R. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019; 13(5): e0007270. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007270.
11. Bourhy P., Herrmann Storck C., Theodose R., Olive C., Nicolas M., Hochedez P. et al. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013; 7(3): e2114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002114.
12. Kakita T., Kuba Y., Kyan H., Okano S., Morita M., Koizumi N. Molecular and serological epidemiology of *Leptospira* infection in cats in Okinawa Island, Japan. *Scientific reports*. 2021; 11(1): 10365. DOI: 10.1038/s41598-021-89872-3.
13. Ružić-Sabljić E., Podgoršek D., Strašek Smrdel K., Celar Šturm, A., Logar M., Pavlović A. et al. First report on *Leptospira* species isolated from patients in Slovenia. *Microorganisms*. 2023; 11(11): 2739. DOI: 10.3390/microorganisms11112739.
14. Di Azevedo M.I.N., Lilenbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in applied microbiology*. 2021; 72(5): 496-508. DOI: 10.1111/lam.13442.
15. Baimova R.R., Ostankova Yu.V., Blinova O.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Molecular and genetic characterization of *LEPTOSPIRA* spp. collection strains from the St. Petersburg Pasteur institute based on 16S rRNA gene sequencing data. *Infektsiya i immunitet*. 2023; 13: 6. DOI: 10.15789/2220-7619-MAG-17028. (in Russian)
16. Guernier V., Allan K.J., Goarant C. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology*. 2018; 145(5): 595-607. DOI: 10.1017/S0031182017001147.
17. Thibaux R., Girault D., Bierque E., Soupé-Gilbert M.E., Rettinger A., Douyère A. et al. Biodiversity of environmental *Leptospira*: improving identification and revisiting the diagnosis. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9: 816. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00816.
18. Victoria B., Ahmed A., Zuermer R. L., Ahmed N., Bulach D. M.,

## ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1, 3, 5-21, СМ. REFERENCES)

2. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Ваганова А.Н. Лептоспирозы: пособие для врачей. СПб: НИИЭМ им. Пастера; 2010.
4. Транквилевский Д.В., Киселева Е.Ю., Корзун В.М., Бренёва Н.В., Вержуцкая Ю.А., Зарва И.Д. и др. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по лептоспирозам в Российской Федерации в период с 2013 по 2022 г. и прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; (3): 43-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-43-50.
15. Баймова Р.Р., Останкова Ю.В., Блинова О.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Молекулярно-генетическая характеристика коллекци-

- Quinteiro J., et.al. Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS One*. 2008; 3(7): e2752. DOI: 10.1371/journal.pone.0002752.
19. Grillová L., Angermeier H., Levy M., Giard M., Lastère S., Picardeau M. Circulating genotypes of *Leptospira* in French Polynesia: an 9-year molecular epidemiology surveillance follow-up study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2020; 14(9): e0008662. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008662.
20. Medeiros L.D.S., Braga Domingos S.C., Azevedo M.I.N.D., Perugueti R.C., de Albuquerque N.F., D'Andrea P.S. et. al. Small mammals as carriers/hosts of *Leptospira* spp. in the Western Amazon forest. *Frontiers in veterinary science*. 2020; 7: 569004. DOI: 10.3389/fvets.2020.569004.
21. Ma X. J., Gong X. Q., Xiao X., Liu J. W., Han H. J., Qin X. R. et al. Detection of *Leptospira interrogans* in hedgehogs from Central China. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 2020; 20(6): 427-31. DOI: 10.1089/vbz.2019.2544.
22. Chaiwattananarungruengpaisan S., Thepapichaikul W., Paungpin W., Ketchim K., Suwanpakdee S., Thongdee M. Potentially pathogenic *Leptospira* in the environment of an elephant camp in Thailand. *Tropical medicine and infectious disease*. 2020; 5(4): 183. DOI: 10.3390/tropicalmed5040183.
23. Guernier V., Richard V., Nhan T., Rouault E., Tessier A., Musso D. *Leptospira* diversity in animals and humans in Tahiti, French Polynesia. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017; 11(6): e0005676. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005676.
24. Di Azevedo M.I.N., Lilenbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology*. 2021; 72(5): 496-508. DOI: 10.1111/lam.13442.