

## ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE

Научная статья

УДК 579.62

doi: 10.34655/bgsha. 2025.78.1.005

### Оптимизация условий постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для индикации патогенных лептоспир

К.В. Усольцев<sup>1</sup>, Р.И. Шангараев<sup>1</sup>, Е.В. Панкова<sup>1</sup>, К.С. Хаертынов<sup>1</sup>,  
М.Е. Горбунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия

Автор, ответственный за переписку: Рафкат Искандарович Шангараев, rafkat.shangaraev@mail.ru

**Аннотация.** Лептоспироз является одним из наиболее распространенных природно-очаговых инфекций, а разработка высокочувствительных экспресс-способов ее диагностики имеют актуальность. Цель исследования – изучение чувствительности, специфичности ПЦР-РВ для индикации патогенных лептоспир, а также оптимизация условий постановки реакции. Были разработаны олигонуклеотидные праймеры и зонд для амплификации локуса гена *LipL32* – возбудителя лептоспироза методом ПЦР-РВ. Результаты определения чувствительности ПЦР-РВ для индикации патогенных лептоспир показали, что в разведениях ДНК возбудителя лептоспироза  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  зарегистрировано накопление специфических продуктов реакции. Максимальное разведение ДНК, при котором зафиксирован положительный результат реакции, составило  $10^{-5}$ , что примерно равнялось 500 бактериальных клеток в 1 мл исследуемого материала. С использованием разработанных праймеров и протокола ПЦР-РВ проведена индикация ДНК основных серогрупп патогенных лептоспир, что показывает высокую внутривидовую специфичность праймеров. Также подтверждена межвидовая специфичность праймеров при постановке ПЦР-РВ с образцами ДНК возбудителя лептоспироза и других видов микроорганизмов. Оптимизацией ПЦР-РВ по температуре отжига праймеров установлено, что при температуре  $58,3^{\circ}\text{C}$  происходит специфический отжиг праймеров на ДНК-матрицу на 8 и 9 циклах реакции. Исходя из этого, оптимальной для отжига праймеров выбрана температура  $58,3^{\circ}\text{C}$ . С целью оптимизации времени амплификации продолжительность денатурации ДНК при температуре  $95^{\circ}\text{C}$  было сокращено от 30 до 15 сек, что дало возможность сократить время прохождения реакции от 1 ч 18 мин до 1 ч 07 мин, при этом не снижая чувствительность анализа.

**Ключевые слова:** лептоспироз, патогенные лептоспиры, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Original article

## Optimization of terms for setting up a real-time polymerase chain reaction for indication of pathogenic leptospirae

Konstantin V. Usoltsev<sup>1</sup>, Rafkat I. Shangaraev<sup>1</sup>, Ekaterina V. Pankova<sup>1</sup>, Kamil S. Khaertynov<sup>1</sup>, Maria E. Gorbunova<sup>1</sup>

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

Corresponding author: Rafkat I. Shangaraev, rafkat.shangaraev@mail.ru

**Abstract.** Leptospirosis is one of the most common natural-focal infections and the development of highly sensitive express methods for its diagnosis is rather relevant. The aim of the research was to study the sensitivity and specificity of RT-PCR to indicate pathogenic leptospirae, as well as to optimize the conditions for setting up the reaction. Oligonucleotide primers and a probe for the amplification of the *LipL32* gene locus, the leptospirosis pathogen, by the RT-PCR method were developed. The results of determining the sensitivity of RT-PCR for the indication of pathogenic leptospirae showed that in dilutions of DNA of the leptospirosis pathogen of  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$ , accumulation of specific reaction products was recorded. The maximum DNA dilution at which a positive reaction result was recorded was  $10^{-5}$  which was approximately equal to 500 bacterial cells in 1 ml of the test material. Using the developed primers and the RT-PCR protocol, DNA indication of the main serogroups of pathogenic leptospirae was carried out, which demonstrated high intraspecific peculiarity of the primers. Interspecific peculiarity of the primers was also confirmed when performing RT-PCR with DNA samples of the leptospirosis pathogen and other types of microorganisms. Optimization of RT-PCR by the annealing temperature of the primers showed that at a temperature of 58.3°C, specific annealing of the primers on the DNA matrix occurred in the 8th and 9th reaction cycles. Based on this, the optimal temperature for primer annealing has become 58.3°C. In order to optimize the amplification time, the duration of DNA denaturation at a temperature of 95°C was reduced from 30 to 15 sec, which made it possible to reduce the reaction time from 1 hour 18 minutes to 1 hour 07 minutes without reducing the sensitivity of the analysis.

**Keywords:** leptospirosis, pathogenic leptospirae, real-time polymerase chain reaction.

**Введение.** Лептоспироз представляет собой зооантропонозную болезнь, которая лидирует по широте распространённости и наличию природно-антропургических очагов. Этому способствует наличие большого количества резервуарных хозяев и восприимчивых к возбудителям лептоспироза животных [1].

Возбудителями болезни являются бактерии рода *Leptospira*, основной особенностью которых является большой генотипический и фенотипический полиморфизм. По данным литературы известно, что в настоящее время существуют 8 патогенных, 6 промежуточных и 5 сапрофитных видов [2].

Патогенные лептоспиры поражают большое количество сельскохозяйственных животных во многих странах мира, также представляют опасность и для людей. Наряду с туберкулезом и бруцелле-

зом лептоспироз относится к эпидемиологически значимым болезням, причиняющим огромный экономический ущерб. В России у сельскохозяйственных и мелких домашних животных наиболее часто встречаются следующие серогруппы патогенных лептоспир: Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Canicola. В природных очагах циркулируют серогруппы Grippotyphosa, Pomona, Sejroe, Javanica, Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Australis, Autumnalis [3]. Эпизоотическая ситуация по лептоспирозу сельскохозяйственных животных в России характеризуется как эндемичная. Среди сельскохозяйственных животных лептоспироз наиболее часто встречается у крупного рогатого скота (КРС) и лошадей [4].

Инфекция, вызванная патогенными лептоспирами, клинически проявляется

желтухой, нарушениями нервной системы, патологиями репродуктивного тракта. Однако у многих животных часто регистрируются бессимптомные формы [5]. Лептоспирозу, как и другим инфекционным болезням, не характерны патогномичные симптомы, что, в свою очередь, в условиях хозяйства приводит к поздней диагностике, нерациональным лечебным подходам, развитию эпизоотической ситуации [6, 7].

Основу мер борьбы и профилактики инфекционных болезней, в том числе и лептоспироза, составляет лабораторная диагностика и иммунопрофилактика [8]. Применение высокочувствительных экспресс-лабораторных тестов дает возможность вести эпизоотологический надзор на территориях с наличием природных очагов, тем самым прогнозируя и контролируя эпизоотическую ситуацию [9].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется как для индикации, так и для идентификации патогенных лептоспир, а также является способом экспресс-диагностики [10]. На ранних сроках заболевания, а также при циркуляции возбудителей в крови, ПЦР показывает высокую диагностическую эффективность [11, 12]. В отличие от серологических тестов, для ПЦР-анализа можно использовать разные патологические материалы: кровь, мочу, внутриглазную жидкость, биоптаты различных внутренних органов и т.д. [13]. В качестве генетических маркеров для ПЦР-индикации патогенных лептоспир используют гены *lipL32*, *lfb1*, *ompL1* [14], которые кодируют липопротеин L32, фибронектин-связывающий протеин и трансмембранный белок соответственно. Ген *lipL32* является фактором патогенности, отсутствует у сапрофитных представителей рода *Leptospira*. Использование данного гена как маркерного локуса дает возможность провести дифференциацию патогенных лептоспир от сапрофитов и тем самым повысить специфичность ПЦР-анализа [15]. Однако кроме выбора наиболее специфичного генетического маркера и подбора праймеров, существенное значение имеет оптимизация

условий проведения ПЦР. Усовершенствование параметров реакции дает возможность повысить чувствительность и специфичность анализа, минимизирует риск появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Исходя из этого, **целью** данной работы являлась оптимизация полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для индикации патогенных лептоспир, а также определение ее чувствительности и специфичности.

**Материал и методы.** *Бактериальная культура.* В работе использованы культуры серогрупп *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Bataviae*, *Canicola*, *Cynopteri*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Mini*, *Pomona*, *Pyroegenes*, *Sejroe*, *Tarassovi* вида *Leptospira interrogans*, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Инактивацию культур лептоспир осуществляли в лизирующем буфере при температуре плюс 70°C в течение 20 мин с использованием термостата ТТ-1 («ДНК-технология», Россия). Для оценки межвидовой специфичности разработанных праймеров использовали образцы ДНК микроорганизмов *L. interrogans* (серогруппа *Grippotyphosa*), *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Moraxella bovis*, и *Proteus vulgaris*, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Концентрацию бактериальных клеток при определении чувствительности ПЦР-РВ в лизате культуры *L. interrogans* определяли по стандарту мутности [16].

*Дизайн праймеров.* В качестве генетической мишени был выбран ген *lipL32*, конструирование праймеров и флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда осуществляли с помощью программы Vector NTI 9.1 (Invitrogen Corporation, Карлсбад, США). При разработке праймеров были учтены следующие принципы: наличие минимальных вторичных структур и димеров, отсутствие остатка гуанина на 3' конце флуоресцентно-меченого зонда, отличие температур плавления прямого

и обратного праймеров не более 1 °С [17].

**Выделение ДНК.** Для экстракции ДНК из культур лептоспир использовали набор «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия).

**Постановка ПЦР-РВ.** Реакцию амплификации проводили на детектирующем амплификаторе BIO-RAD CFX96 (BIO

RAD, США). Реакционную смесь готовили с использованием набора «ПЦР-микс» («Синтол», Россия), олигонуклеотиды синтезированы в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Состав реакционной смеси и температурно-временные условия амплификации представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Состав реакционной смеси для выявления патогенных лептоспир методом ПЦР-РВ

Компоненты	Количество на один образец, мкл
2,5-кратная реакционная смесь	8,0
25 мМ раствор магния хлорида	1,0
Тақ-полимераза (5 ед / мкл)	0,5
lipL32FPin2	0,5
lipL32RPin2	0,5
lipL32Z2	0,5
деионизированная вода	4,0
матричная ДНК	5,0
общий объем	20,0
Температурно-временной режим	Количество циклов
95 °С – 5 мин	1
95 °С – 30 сек	40
58,3 °С – 30 сек	

Детекция результатов амплификации проводилась по каналу ROX в режиме реального времени.

**Результаты исследования.** В качестве маркерного локуса был выбран ген *lipL32*. С помощью биоинформационного анализа был определен наиболее консервативный участок, для амплификации ко-

торого сконструированы олигонуклеотиды. По расчетным данным программы Vector NTI температура плавления разработанных праймеров и флуоресцентно-меченного зонда составила 55,1 и 61,6°С соответственно. Основные характеристики разработанных праймеров представлены в таблице 2.

**Таблица 2** – Характеристики использованных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда

Название праймера	Позиция в целевой нуклеотидной последовательности (GenBank: AF181553.1)	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Расчетная температура отжига, °С
Прямой праймер	113 -135	tcttttgtctgagcgaggacac	55,1
Обратный праймер	264 - 285	acggcaggaatccaacataga	55,1
Флуоресцентно-меченный зонд	140 - 165	ROX- ccagggacaacsgaaaccgtaaaaac- RTQ2	61,6

С целью определения чувствительности ПЦР-РВ для индикации возбудителей лептоспироза в качестве ДНК-матрицы

использованы образцы ДНК, полученные от *L. interrogans* (серогруппа Grippotyphosa) в разведениях 10<sup>1</sup>, 10<sup>-2</sup>,

10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> и 10<sup>-5</sup> с первоначальной концентрацией бактериальных клеток 1 x 10<sup>7</sup> в 1 мл лизата. Для экстракции ДНК применяли лизат культуры *L. interrogans* в объеме 50 мкл с концентрацией бактериальных клеток 5 x 10<sup>6</sup>. В таблице 3 представ-

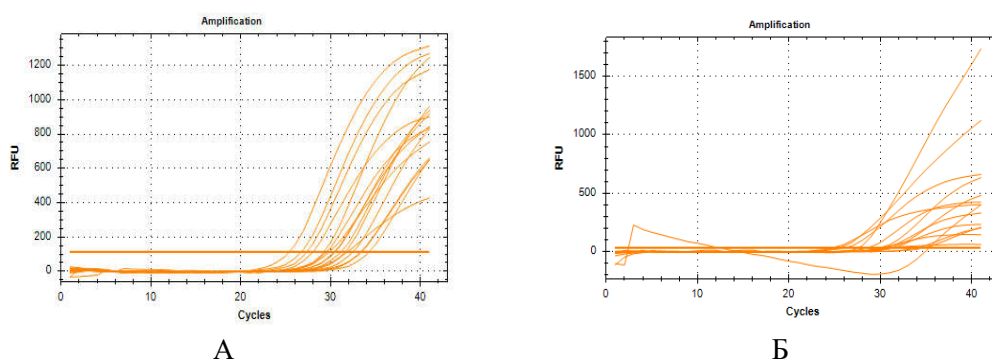
лены минимальные пороговые величины Ct и накопление флуоресцентного сигнала – 1400 Relative fluorescence units (относительные единицы флуоресценции RFU) в ПЦР-РВ при использовании ДНК возбудителя лептоспироза в разных разведениях.

**Таблица 3** – Результаты определения чувствительности ПЦР РВ для индикации патогенных лептоспир

Разведение ДНК	Наименьшая пороговая величина Ct	Графическое изображение результатов ПЦР-РВ
10 <sup>-1</sup>	33,1	
10 <sup>-2</sup>	32,8	
10 <sup>-3</sup>	31,5	
10 <sup>-4</sup>	33,4	
10 <sup>-5</sup>	34,4	

Результаты определения чувствительности ПЦР-РВ для индикации патогенных лептоспир показали, что во всех разведениях ДНК возбудителя лептоспироза зарегистрировано накопление флуоресцентного сигнала. Максимальное разведение ДНК, при котором зафиксирован положительный результат реакции, равнялось 10<sup>-5</sup>, что количественно выражается примерно 500 бактериальных клеток в 1 мл образца.

С целью определения внутривидовой специфичности разработанных праймеров была проведена ПЦР-РВ с образцами ДНК лептоспир серогрупп Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Mini, Pomona, Pyrogenes, Sejroe и Tarassovi. Результаты реакции представлены на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Результаты ПЦР-РВ с образцами ДНК патогенный лептоспир в разведениях 10<sup>-2</sup> и 10<sup>-3</sup>: А - серогруппы Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Grippotyphosa, Javanica, Pomona и Sejroe; Б – серогруппы Ballum, Cynoptery, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pyrogenes и Tarassovi

Из рисунка видно, что во всех образцах ДНК, использованных 15 серогрупп патогенных лептоспир, зарегистрирован положительный результат, что свидетель-

ствует от том, что разработанные праймеры имеют высокую внутривидовую специфичность.

Результаты ПЦР-РВ с использовани-

ем образцов ДНК *L. interrogans* и гетерогенных микроорганизмов показали, что амплификация прошла только с ДНК *L. interrogans*. Следовательно, разработанные праймеры специфичны только для возбудителя лептоспироза.

С целью повышения эффективности прохождения ПЦР была проведена оптимизация реакции по температуре отжига праймеров, используя температурный градиент от 50 до 60°C. Результаты определения оптимальной температуры отжига праймеров показали, что при температуре 58,3°C при разведении образцов ДНК 10<sup>-2</sup> и 10<sup>-3</sup> зарегистрированы наиболее низкие пороговые величины Ct – 8,35 и 9,08 соответственно. Это свидетельствует о том, что при данной температуре на 8

и 9 циклах реакции праймеры специфически отжигаются ДНК-матрицей и происходит синтез продуктов амплификации. Следовательно, оптимальная температура отжига праймеров составила 58,3°C.

Продолжительность ПЦР-РВ для выявления возбудителей лептоспироза составила 1 ч 18 мин. С целью оптимизации времени реакции были применены следующие условия амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 сек (вместо 30 сек); 58,3°C – 30 сек. Для постановки ПЦР-РВ были использованы образцы ДНК *L. interrogans* серогруппы Grippotyphosa в разведениях 10<sup>-2</sup> и 10<sup>-3</sup>. Результаты оптимизации времени ПЦР-РВ представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты оптимизации ПЦР-РВ по времени прохождения реакции

До оптимизации			После оптимизации		
Продолжительность реакции	Ct при разведениях ДНК		Продолжительность реакции	Ct при разведениях ДНК	
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
1 ч 18 мин	29,3	32,3	1 ч 07 мин	29,6	31,1
Графическое изображение результатов ПЦР-РВ					
До оптимизации			После оптимизации		

Продолжительность реакции после оптимизации времени составила 1 ч 07 мин. В то же время была отмечена незначительная разница между минимальными пороговыми величинами до и после сокращения времени реакции: при разведении ДНК 10<sup>-2</sup> – 29,3 и 29,6; 10<sup>-3</sup> – 32,3 и 31,1. Однако незначительное варьирование минимальных пороговых показателей не должно снижать чувствительность реакции.

**Заключение.** В настоящем исследовании определена чувствительность и специфичность ПЦР-РВ для индикации

патогенных лептоспир, проведена оптимизация условий постановки реакции по температуре отжига праймеров, усовершенствовано время амплификации. Результаты определения чувствительности ПЦР-РВ для выявления возбудителей лептоспироза показали, что максимальное разведение образцов ДНК патогенных лептоспир, при котором проходила амплификация, составило 10<sup>-5</sup>, то есть примерно 500 бактериальных клеток в 1 мл материала. Также установлено, что сконструированные праймеры обладают высокой внутривидовой и межвидовой

специфичностью, что подтверждается выявлением ДНК основных серогрупп *L. interrogans* с использованием разработанных праймеров в ПЦР-РВ и отсутствием неспецифического отжига праймеров при использовании в качестве матрицы образцов ДНК других видов микроорганизмов. Оптимизацией температуры отжига праймеров было определено, что при температуре 58,3°C происходит специфический отжиг олигонуклеотидов в

ДНК-матрицу на 8 и 9 циклах, следовательно, оптимальная температура отжига праймеров составляет 58,3°C. Результаты усовершенствования времени постановки ПЦР-РВ показали, что сокращение времени денатурации ДНК на втором цикле от 30 до 15 сек не снижает чувствительность реакции, при этом сокращается время анализа от 1 ч 18 мин до 1 ч 07 мин.

#### Список источников

1. Оценка информативности лабораторных тестов для диагностики варианта коагулопатии при лептоспирозе / Д.Л. Мойсова, С.В. Усатилов, Т.В. Шкиря, В.Н. Городин // Инфекционные болезни. 2018. Т. 16, № 4. С. 22-33. EDN: VSJGRY. doi: 10.20953/1729-9225-2018-4-22-33.
2. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST) / A. Rettinger [et al.] // BMC Microbiol. 2012. 12. Pp. 1-14. doi: 10.1186/1471-2180-12-185.
3. Соболева Г.Л., Непоклонова И.В. Лептоспироз кошек: заблуждения и реальность // Российский ветеринарный журнал. 2021. № 3. С. 5-13. EDN: KPODGW. doi 10.32416/2500-4379-2021-3-5-13.
4. Обзор эпизоотической ситуации по лептоспирозу в Российской Федерации за период 2013-2023 гг. / Р.И. Шангараев [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2024. № 10 (240). С. 65-72. EDN: KXLTE. doi 10.53083/1996-4277-2024-240-10-65-72.
5. Медведева К.С., Абрамов П.Н. Течение и диагностика лептоспироза у лошадей на территории Омской области // Ветеринария, зоотехния и биотехнология // 2022. № 3. С. 23-27. EDN: AZNJWC. doi 10.36871/vet.zoo.bio.202203003.
6. Сравнение гематологических показателей крупного рогатого скота, инфицированного различными подгруппами вируса лейкоза / М. Е. Горбунова [и др.] // Ветеринарный врач. 2024. № 1. С. 34-39. EDN RPZAZW. doi 10.33632/1998-698X\_2024\_1\_34.
7. Лептоспирозы в России: проблемы контроля и диагностики. Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных / Ананьина Ю.В., Петров Е.М., Самсонова А.П., Земская М.С. // Материалы Московской международной конференции по лептоспирозу. Москва. 2007. С. 10-11.
8. Применение прямой реакции иммунофлуоресценции в технологическом контроле матричных расплодов вируса классической чумы свиней / А. Р. Ахунова [и др.] // Ветеринарный врач. 2024. № 3. С. 27-33. EDN: MNSWGM. doi 10.33632/1998-698X\_2024\_3\_27.
9. Остякова М.Е., Литвинова З.А., Емельянов О.Н. Диагностика и профилактика лептоспироза животных в Хабаровском крае: научно-практические рекомендации // Благовещенск: Дальневосточный государственный аграрный университет, 2023. 41 с. EDN: ZUGUTO. ISBN 978-5-9642-0594-4.
10. Методы лабораторной диагностики лептоспирозов: особенности постановки, преимущества и недостатки / Е.Ю. Киселева [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2015. № 3 (103). С. 85-93. EDN: UFEBWR.
11. Конструирование специфических праймеров для ПЦР-диагностики классической чумы свиней / Н.И. Хаммадов [и др.] // Ветеринарный врач. 2024. № 3. С. 41-46. EDN: GRODKJ. doi 10.33632/1998-698X\_2024\_3\_41.
12. Самсонова А.П., Петров Е.М. Сравнение показателей эффективности методов диагностики лептоспирозов в разные сроки с момента заболевания // Бактериология. 2023. Т. 8. № 3. С. 99. EDN DRRWEZ.
13. Ваганова А.Н., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Адаптация ПЦР для диагностики лептоспироза и эпидемиологического надзора за лептоспирозной инфекцией // Национальные приоритеты России. 2011. № 2 (5). С. 162-164. EDN: XQXMZP.
14. Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real-Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of *Leptospira* at the Onset of Disease / L.M. Esteves [et al.] // Sci. Rep. 2018. Vol. 15. P. 92-113. doi: 10.1038/s41598-018-27555-2.
15. Evaluation of real-time PCR targeting the *lipL32* gene for diagnosis of *Leptospira* infection / D. Podgoršek [et al.] BMC Microbiol. 2020. Vol. 20. P. 50-59. doi: 10.1186/s12866-020-01744-4.
16. Общая фармакопейная статья ОФС 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток, 2015. URL: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0008.15-Opredelenie-kontsentratsii-mikrobnnyh-kletok.pdf>?ysclid=m4qx651ifn784938351 (дата обращения: 13.11.2024).

17. ПЦР «в реальном времени» / под ред. Д.В. Ребрикова. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с.

### References

1. Moissova D.L., Usatkov S.V., Shkirya T.V., Gorodin V.N. The evaluation of information laboratory tests to diagnose the type of coagulopathy of patients with leptospirosis. *Infectious diseases*. 2018;Vol.16,No4:22-33 (In Russ.) doi: 10.20953/1729-9225-2018-4-22-33.
2. Rettinger A. [et al.] *Leptospira spp.* strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol.* 2012;12:1-14. doi:10.1186/1471-2180-12-185.
3. Soboleva G.L., Nepoklonova I.V. Leptospirosis in cats: misconceptions and reality. *Russian Veterinary Journal*. 2021;3:5-13 (In Russ.). doi 10.32416/2500-4379-2021-3-5-13.
4. Shangaraev R.I. [et al.]. Review of the epizootic situation of leptospirosis in the Russian Federation from 2013 through 2023. *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2024;10(240):65-72 (In Russ.). doi 10.53083/1996-4277-2024-240-10-65-72.
5. Medvedeva K.S., Abramov P.N. Course and diagnosis of equine leptospirosis in the Omsk region. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*. 2022;3:23-27 (In Russ.). doi 10.36871/vet.zoo.bio.202203003.
6. Gorbunova M.E. [et al.]. Comparison of hematological parameters of cattle infected with various subgroups of leukemia virus. *The Veterinarian*. 2024;1:34-39 (In Russ.). doi: 10.33632/1998-698X\_2024\_1\_34.
7. Ananyina Yu.V., Petrov E.M., Samsonova A.P. Leptospirosis in Russia: problems of control and diagnostics. Diagnostics, prevention and treatment of leptospirosis in humans and animals. Proc. of the Moscow Int. Conf. on Leptospirosis. Moscow, 2007. Pp.10-11 (In Russ.)
8. Akhunova A.R. [et al.] Application of direct fluorescent antibodies test in process control of classical swine fever virus master seeds. *The Veterinarian*. 2024; 3:27-33 (In Russ.). doi 10.33632/1998-698X\_2024\_3\_27.
9. Ostyakova M.E., Litvinova Z. A., Emelianov O. N. Diagnostics and prevention of animal leptospirosis in Khabarovsk Krai: Scientific and practical recommendations. Blagoveshchensk: Far Eastern State Agrarian University, 2023. 41 p. (In Russ.)
10. Kiseleva E. Yu. [et al.] Methods for leptospirosis laboratory diagnostics: features of experimentation, advantages and limitations. *Acta biomedica scientifica*. 2015;3(103):85-93 (In Russ.)
11. Khammatov N.I. [et al.]. Design of specific primers for PCR diagnosis of classical swine fever. *The Veterinarian*. 2024;3:41-46 (In Russ.). doi:10.33632/1998-698X\_2024\_3\_41.
12. Samsonova A.P., Petrov E.M. Comparison of the efficiency indicators of leptospirosis diagnostic methods at different times after the disease. *Bacteriology*. 2023;Vol.8.No3:99 (In Russ.)
13. Vaganova A.N., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Adaptation of PCR for the diagnosis of leptospirosis and epidemiological surveillance of leptospirosis infection. *National Priorities of Russia*. 2011;2(5):162-164 (In Russ.)
14. Esteves L.M. [et al.]. Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real-Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of *Leptospira* at the Onset of Disease. *Sci. Rep.* 2018;Vol.15:92-113. doi:10.1038/s41598-018-27555-2.
15. Podgoršek D. [et al.]. Evaluation of real-time PCR targeting the *lipL32* gene for diagnosis of *Leptospira* infection. *BMC Microbiol.* 2020;20:50-59. doi: 10.1186/s12866-020-01744-4.
16. General pharmacopoeial article OFS 1.7.2.0008.15 Determination of the concentration of microbial cells, 2015. URL: <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0008.15-Opredelenie-kontsentratsii-mikrobnnyh-kletok.pdf?ysclid=m4qx651ifn784938351> (date of access: 13.11.2024) (In Russ.)
17. Real-time PCR / Ed. by D.V. Rebrikov. Moscow: BINOM. Knowledge Laboratory, 2009. 215 p. (In Russ.)

### Информация об авторах

**Константин Валерьевич Усольцев** – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического анализа, [ukv3@mail.ru](mailto:ukv3@mail.ru);

**Рафкат Искандарович Шангараев** – кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического анализа, [rafkat.shangaraev@mail.ru](mailto:rafkat.shangaraev@mail.ru);

**Екатерина Витальевна Панкова** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Государственной коллекции микроорганизмов, [katerinka\\_ja@bk.ru](mailto:katerinka_ja@bk.ru);

**Камил Саубанович Хаертынов** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического анализа, [khaerkamil@mail.ru](mailto:khaerkamil@mail.ru);

**Мария Евгеньевна Горбунова** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического анализа, [maria.metax@bk.ru](mailto:maria.metax@bk.ru).



**Information about of the authors**

**Konstantin V. Usoltsev** – Candidate of Science (Veterinary), Leading Researcher, Laboratory of molecular genetic analysis, ukv3@mail.ru;

**Rafkat I. Shangaraev** – Candidate of Science (Veterinary), Researcher, Laboratory of molecular genetic analysis, rafkat.shangaraev@mail.ru;

**Ekaterina V. Pankova** – Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, State Collection of Microorganisms, katerinka\_ja@bk.ru;

**Kamil S. Khaertynov** – Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Laboratory of molecular genetic analysis, khaerkamil@mail.ru;

**Maria E. Gorbunova** – Candidate of Science (Biology), Researcher, Laboratory of molecular genetic analysis, maria.metax@bk.ru.

Статья поступила в редакцию 06.02.2025; одобрена после рецензирования 20.02.2025; принята к публикации 25.02.2025.

The article was submitted 06.02.2025; approved after reviewing 20.02.2025; accepted for publication 25.02.2025.