

УДК: 579.834.115

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.72

**АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *LipL32*
ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР ДЛЯ РАЗРАБОТКИ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Шангараев Р.И.* – канд. ветеринар. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3689-1442); **Усольцев К.В.** – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5279-9836); **Хаертынов К.С.** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-4764-560X); **Панкова Е.В.** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-4446-4619); **Горбунова М.Е.** – канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0707-2117); **Хаммадов Н.И.** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5669-1486); **Осянин К.А.** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-2763-8605)

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности»

*rafkat.shangaraev@mail.ru

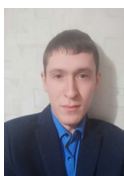
Ключевые слова: лептоспироз, ген *LipL32*, BLAST-анализ, нуклеотидная последовательность, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, полиморфизм, секвенирование, стабильность, тест-система, диагностика

Key words: leptospirosis, *LipL32* gene, nucleotide substitution, BLAST- analysis, nucleotide sequence, real-time polymerase chain reaction, polymorphism, sequencing, stability, test system, diagnosis

Поступила: 25.06.2025

Принята к публикации: 26.08.2025

Опубликована онлайн: 15.09.2025



РЕФЕРАТ

Целью данной работы являлось изучение полиморфизма гена *LipL32* различных сероваров патогенных лептоспир, а также разработка прототипа тест-системы для индикации данного гена с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с оценкой его стабильности. Объектами исследования служили 245 нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* *Leptospira interrogans*, образцы ДНК лептоспир сероваров Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Bataviae и Tarassovi. По результатам биоинформационного анализа 245 нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* установили, что данный ген является высококонсервативным участком генома возбудителя лептоспироза. Для индикации исследуемого патогена по данному гену методом ПЦР-РВ, определили маркерный локус (область липопротеина L32) размером 173 пар нуклеотидов. В пределах данного участка разработали олигонуклеотидные праймеры и зонд, которые по данным множественного выравнивания амплифицируемого локуса оказались идентичными для большинства анализируемых нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* *L. interrogans*. BLAST-анализ отсекуемых нуклеотидных последовательностей патогенных леп-

тоспир сероваров Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Bataviae и Tarassovi показал, что идентичность амплифицированного сконструированными олигонуклеотидами участка гена липопротеина L32 указанных выше изолятов с последовательностями ДНК возбудителя лептоспироза, сохраненных в базе данных NCBI, варьировала от 95,74 до 98,95 %. С использованием разработанных олигонуклеотидов и флуоресцентного зонда сконструирован прототип тест-системы для индикации патогенных лептоспир методом ПЦР-РВ. Установлено, что специфичность представленного в настоящей работе тест-набора составила 100 %, а чувствительность может достигать $5 \cdot 10^2$ копий ДНК в одном мл исследуемого материала. Результат оценки стабильности опытного образца тест-системы показал, что коэффициенты вариации минимальных пороговых значений не превышают 10 %, таким образом компоненты набора устойчивы к длительному хранению.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Лептоспироз характеризуется нетрансмиссивной природно-очаговой инфекционной болезнью, которая занимает первое место среди зоонозов по распространенности, а также по количеству природных и антропоургических очагов [1]. Возбудителями болезни являются патогенные виды бактерий семейства *Leptospiraceae*, характерная особенность которых выражено в высоком фенотипическом и генотипическом разнообразии, что позволяет им адаптироваться к разнообразным условиям окружающей среды [2]. В настоящее время патогенные виды лептоспир объединяют около 250 серологических вариантов, которые отличаются по гостальной специфичности, органотропности, устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, а также по вирулентности. Известно, что патогенные лептоспиры поражают свыше 100 видов животных [3].

В Российской Федерации лептоспироз имеет широкое распространение, что объясняется наличием многочисленных природных и антропоургических очагов. Эпизоотическая ситуация оценивается как эндемичная: неблагополучие имеет восходящий тренд с нисходящей заболеваемостью. Среди крупного рогатого скота и лошадей наблюдается наибольшее количество инфицированных особей. [4].

Диагностика лептоспироза основывается на анализе клинико-эпидемиолого-эпизоотологических, патоморфологических данных с обязательным подтверждением диагноза лабораторными методами, такими как реакция микроагглютинации

(РМА), полимеразная цепная реакция (ПЦР), бактериологические исследования. Среди лабораторных методов особый интерес представляют молекулярно-генетические исследования, в частности ПЦР, которая характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью. С помощью данного метода можно провести индикацию животных-бактерионосителей, которые представляют опасность для здорового поголовья, а также для человека [5]. К тому же ПЦР является экспресс-методом диагностики: на ранних стадиях развития инфекционного процесса она дает возможность провести индикацию возбудителя, что не удается осуществлять серологическими тестами [6].

Эффективность ПЦР-диагностики определяется многими факторами, среди которых выбор генетического маркера имеет большое значение [7, 8]. Ген *LipL32* длиной 820 пар нуклеотидов (п.н.) расположен на хромосоме С1 возбудителей лептоспироза и отличается высокой степенью стабильности среди патогенных видов возбудителя и, активно экспрессируется в значительном количестве в процессе инфекционного заболевания. [9, 10]. Идентичность нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гена *LipL32* и кодируемого им белка L32 у патогенных лептоспир составляет 97 -100 % [11]. Таким образом, ген *LipL32* можно применять в качестве генетической мишени для молекулярно-генетической индикации патогенных лептоспир, а также для дифференциации основных экологических групп лептоспир: свободноживу-

ших и паразитических.

На основе метода ПЦР для диагностики инфекционных болезней разрабатываются наборы, которые включают неспецифические и специфические компоненты, а также контрольные образцы. Данные наборы рассчитаны на проведение определенного количества реакций. Конструирование диагностических ПЦР тест-систем направлено на обеспечение удобства при их применении потребителями. Одним из основных характеристик ПЦР тест-систем является их стабильность при хранении.

Целью данной работы являлось изучение полиморфизма гена *LipL32* различных сероваров патогенных лептоспир, а также разработка прототипа тест-системы для индикации данного гена с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с оценкой его стабильности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Объектами исследования служили образцы ДНК патогенных лептоспир сероваров *Bataviae*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Romona*, *Tarassovi*, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Пробоподготовка культур включала инактивацию лептоспир при плюс 70 °С в течение 20 мин в лизирующем буфере. Для экстракции ДНК использовали набор «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

При анализе генетического полиморфизма гена *LipL32* использовали 245 нуклеотидных последовательностей *L. interrogans*, депонированных в базе данных GenBank Интернет-ресурса NCBI под следующими номерами: KM211316, KM211311.1, PQ407920.1, PP554249.1, AY461907.1 - AY461910.1, AY461901.1 - AY461905.1, JN683904.1, KP032210.1, JF509262.1 - JF509289.1, AY461906.1, JN886739.1, JN886738.1, GU220823.1, AF181553.1, MT482312.1, MT482305.1 - MT482310.1, DQ092412.1, JQ013518.1, PP357246.1, PP057729.1, PP028460.1,

KY092934.1 - KY092953.1, KT338922.1, KF184517.1 - KF184493.1, AY568679.1, EU871718.1 - EU871720.1, PQ367786.1 - PQ376811.1, PQ208757.1, PQ208756.1, PP481960.1, OR739244.1, OR739243.1, OR739234.1 - 739241.1, OR739232.1, OR739231.1, OP226140.1, MZ292511.1, OK560918.1 - 560920.1, MT776340.1, JQ013520.1, JQ013519.1, HM026175.1, KU219469.1 - 219472.1, AY442332.1, JN210551.1, GQ204279.1 - 204288.1, AY609332.1, AY609327.1 - AY609329.1, AY609323.1 - AY609325.1, AY609321.1, AY423075.1, KC800987.1 - KC800994.1, JN831363.1, EU871723.1, EU871716.1, AJ580493.1, OR920506.1, OR920501.1, OR920496.1, OR920491.1, OR920486.1, OR920481.1, OR920476.1, OR920471.1, OR920466.1, OR920461.1, OR920456.1, OR920451.1, OR920446.1, OR920441.1, OR920436.1, OR920431.1, OR920426.1, OR920421.1, OR920416.1, OR920411.1, OR920406.1, OR920401.1, OR920396.1, MT776334.1 - MT776339.1, OR858825.1, OP763442.1, OP763441.1, OQ269497.1, OQ269496.1, OQ269489.1, AF245281.1, AY609333.1, AY609331.1, AY609330.1, AY609326.1, AY609322.1, AY568680.1, DQ149595.1, AY763509.1, AY776292.1 - AY776294.1, AY223718.1. Множественное выравнивание вышеперечисленных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программах Vector NTI 9.1 (алгоритм ClustalW, модуль AlignX) и MEGA11 (алгоритм MUSCLE) (Версия 11.0.13, разработчики: K. Tamura, S. Kumar, G. Stecher).

Для амплификации и секвенирования участка гена *LipL32* размером 173 п.н. от изолятов *L. interrogans*, сероваров *Romona* образец - №1, *Grippotyphosa* - №2, *Canicola* - №7, *Bataviae* - №8 и *Tarassovi* - №9 применяли разработанные в рамках данной работы праймеры: *lipL32FPin2* (5'→3') - tctttgtctgagcgaggacac; *lipL32RPin2* (5'→3') - acggcgaatccaacataga; *lipL32Z2* - ROX-ccagggacaacgaaccgtaaaaac-RTQ2. Дизайн нуклеотидных последовательностей праймеров и анализ их термодинамических характеристик выполняли с использова-

нием программы Vector NTI 9.1.0. ПЦР проводили на амплификаторе CFX 96 (Био-Рад, США) с использованием 2,5 кратной реакционной смеси «ПЦР-микс» («Синтол», Россия). Секвенирование образцов ДНК выполнили по методу Сэнгера в ЗАО «Евроген» (Москва). Идентификацию нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью онлайн Интернет ресурса BLAST, программ BioEdit 5.0.9, MEGA11 и Vector NTI 9.1.

При конструировании прототипа ПЦР-РВ тест-системы для индикации патогенных лептоспир использовали 2,5 кратную реакционную смесь «ПЦР-микс» («Синтол», Россия), положительный контрольный образец – ДНК *L. interrogans* в разведении 10^{-2} и отрицательный контрольный образец (ОКО) – деионизированная вода. Оптимизацию температурного режима ПЦР-РВ выполняли с использованием образцов ДНК патогенных лептоспир сероваров *Tomona*, *Grippotryphosa*, *Canicola*, *Bataviae* и *Tarassovi* с применением температурного градиента от плюс 50 °С до 60 °С. Реакцию проводили в трех повторах с определением минимальных пороговых значений – Ct (цикл ПЦР, при котором относительные единицы флуоресценции превышают пороговое значение). В качестве оптимальной температуры отжига праймеров выбирали то значение, при котором минимальный пороговый цикл был наименьшим.

Для определения чувствительности прототипа тест-системы для индикации патогенных лептоспир методом ПЦР-РВ использовали серию десятикратных разведений препарата ДНК – 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} и 10^{-4} , полученного из лизата бактериальной культуры вида *L. interrogans* серовара *Canicola*. Концентрацию бактериальных клеток в культуре *L. interrogans* определяли по стандарту мутности, прописанной в Общей фармакопейной статье ОФС 1.7.2.0008.15. Выделение ДНК осуществляли из бактериального лизата объемом 50 мкл, количество бактерий в котором примерно составило $5 \cdot 10^6$ клеток.

Оценку стабильности прототипа тест-

системы проводили с помощью анализа коэффициента вариации (V, %) значений Ct, полученных при амплификации контрольных образцов разрабатываемого прототипа тест-системы. Коэффициент вариации значений Ct (V, %) вычисляли по формуле согласно ГОСТ Р 70150-2022.

Прототип тест-системы считали устойчивой к длительному хранению, если значение коэффициента вариации V не превышало 10 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Белки внешней мембраны и липополисахариды патогенных лептоспир относятся к основным антигенам, на которые синтезируются специфические антитела. Также данные антигены участвуют во взаимодействиях возбудителей лептоспироза с организмом хозяина [12]. Ген *LipL32* кодирует липопротеин внешней мембраны патогенных лептоспир, который считается фактором вирулентности данных возбудителей [13]. По данным литературы известно, что идентичность аминокислотных последовательностей липопротеина L32 у всех патогенных видов лептоспир составляет более 98 % [14]. Ген *LipL32* является высококонсервативным среди патогенных и промежуточных видов лептоспир [15]. В настоящей работе с целью определения генетического полиморфизма гена *LipL32* проведено множественное выравнивание 245 нуклеотидных последовательностей данного гена у различных сероваров *L. interrogans*, по результатам которого установили высокую степень его консервативности (рисунок 1).

Из всех исследованных последовательностей точечные нуклеотидные замены встречались преимущественно в сиквенсе KC800994 (серовар *Sejroe*), а также одна замена в последовательности JN831363 (серовар *Canicola*) (таблица 1).

Полученные результаты указывают на то, что генетический локус *LipL32* *L. interrogans* характеризуется высокой степенью консервативности и может служить основой для разработки праймерной комбинации, предназначенной для проведения ПЦР-РВ с целью выявления широко-

го спектра сероваров *L. interrogans*. Проведенное множественное выравнивание 245 нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* позволило определить маркерный локус размером 173 п.н. в области от 113 до 285 нуклеотидов (относительно последовательности GenBank: AF181553.1). В пределах данного участка были сконструированы праймеры и флуоресцентно-меченный зонд. Анализ внутривидовой специфичности спроектированных олигонуклеотидов, проводился относительно нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* различных представителей *L. interrogans* депонированных в базе данных GenBank под следую-

щими номерами: KC800994, DQ092412, HM026175, OR920496, OR920501, OR920506, KC800993, KC800990, JN831363, AY461910, EU871716, GU220823, KU219472, KC800987, KC800988, AY609323, EU871723, JN886738, AY609328, KC800989, KC800992, JN210551, AY609321, AY609324, AY423075, DQ149595, AY609325 и AY609327. На рисунке 2 представлены результаты множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей *L. interrogans* в местах гибридизации разработанных праймеров и флуоресцентно-меченного зонда.

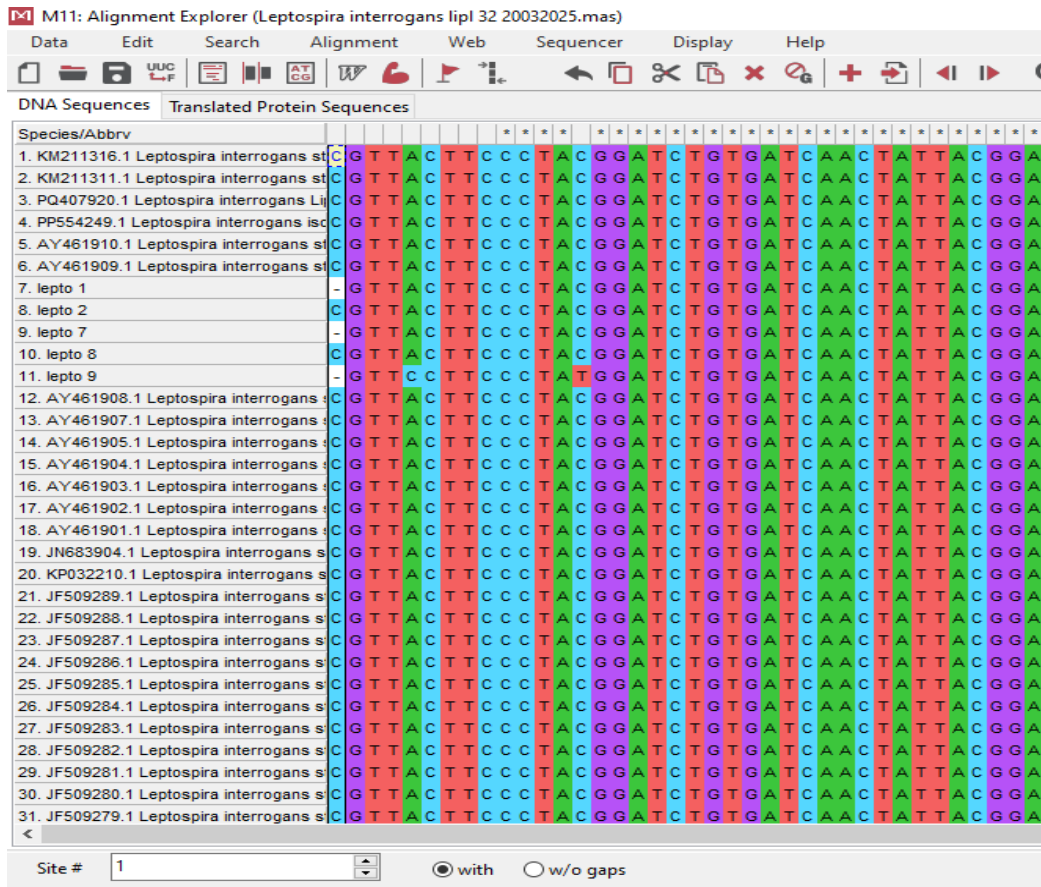


Рисунок 1 – Результаты множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* *L. interrogans* (интерфейс программы MEGA 11).

Таблица 1 – Нуклеотидные замены в структуре гена *LipL32* исследуемых изолятов *L. Interrogans*

Сиквенсы (GenBank ID)	Позиции нуклеотидных замен					
	T → C	A → T	C → T	C → A	A → G	G → A
KC800994	39, 178, 205, 283	280	276, 241	169	145, 131	137
JN831363			237			

KC800994	48	52	552	139
DQ092412	29	53	553	57
HM026175	92	552	552	120
OR920496	47	552	552	75
OR920501	47	552	552	75
OR920506	47	552	552	75
KC800993	48	552	552	76
KC800990	111	552	552	139
JN831363	92	552	552	120
AY461910	90	552	552	118
EU871716	92	552	552	120
GU220823	110	552	552	138
KU219472	26	537	537	54
KC800987	48	552	552	76
KC800988	48	487	487	76
AY609323	92	552	552	120
EU871723	92	552	552	120
JN886738	92	486	486	120
AY609328	92	486	486	120
KC800989	48	486	486	76
KC800992	48	552	552	76
JN210551	92	486	486	120
AY609321	92	486	486	120
AY609324	92	500	500	120
AY423075	59	211	211	87
DQ149595	29	477	477	57
AY609325	92	477	477	120
AY609327	92	477	477	120

Consensus	111	552	139
-----------	-----	-----	-----

A

B

B

Рисунок 2 – Анализ внутривидовой специфичности в нуклеотидных последовательностях гена *LipL32* *L. interrogans*: А – прямой праймер (*lip32FPin2*); Б – обратный праймер (*lip32RPin2*); В – флуоресцентно-меченный зонд (*lip32Z2*) (интерфейс программы Vector NTI 9.1).

Из рисунка 2 видно, что прямой и обратный праймеры являлись достаточно консервативными. Нуклеотидные замены были обнаружены только в последовательности KC800994 (серовар Sejroe) – для прямого праймера (*lip32FPin2*) в позициях 131 вместо G → A и 132 - A → G; для обратного праймера (*lip32RPin2*) в позиции 556 A → G, 559 T → A и 561 G → A; зонда *lip32Z2* в позиции 145 G → A. Остальные использованные при множественном выравнивании нуклеотидные последовательности *L. interrogans* в местах «отжига» олигонуклеотидов и зонда были идентичными.

Следует отметить, что изучение полиморфизма гена *LipL32* также дает возможность провести дифференциацию разных видов патогенных лептоспир. В настоящей работе проведен анализ полиморфизма гена *LipL32* пяти сероваров *L. interrogans* - Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Bataviae и Tarassovi. Для пяти изолятов патогенных лептоспир (серовар Pomona - №1, Grippotyphosa - №2, Canicola - №7, Bataviae - №8 и Tarassovi - №9) секвенированием получили пять нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* размером 173 п.н. Результаты BLAST-анализа данных сиквенсов представлены

в таблице 2.

BLAST-анализ нуклеотидных последовательностей, исследованных изолятов патогенных лептоспир показал, что их идентичность с сиквенсами гена липопротеина L32 *L. interrogans*, депонированных в базе данных NCBI, варьировала от 95,74 до 98,95 %. Полученные нами результаты коррелируют с данными других исследователей. Так по данным А.Н. Вагановой [16] с соавторами рестрикционный профиль нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* для трех геном-

ных видов патогенных лептоспир (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*) на внутривидовом и серогрупповом уровне был схожим. Проведенный анализ внутривидовой специфичности, спроектированной праймерной комбинации также подтверждает высокую консервативность гена *LipL32* внутри вида *L. interrogans*. Таким образом из-за высокой степени консервативности ген *LipL32* можно использовать как маркерный локус для индикации патогенных лептоспир методом ПЦР.

Таблица 2 – Результаты BLAST-анализа нуклеотидных последовательностей изолятов *L. Interrogans*

Изоляты	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Результаты BLAST-анализа	
		Покрытие (Query Cover), %	Идентичность (Per. Ident.), %
№1	gttacttcctacggatctgtgatcaactattacggatacgtaaa-gccaggacaagcgccggacggttagtcgatggaacaaaaaacgatactatctctatgtttggattcctgccgtaatgccgaaatgggagttcgaatgattccccaacaggcgaaatcggtgaac	99	98,92-98,38
№2	cgftacttcctacggatctgtgatcaactattacggatacgtaaa-gccaggacaagcgccggacggttagtcgatggaacaaaaaacatactatctctatgtttggattcctgccgtaatgctgaaatgggagttcgaataattccccaacaggcgaaatcggtgaa	100	98,39-97,85
№7	cgftacttcctacggatctgtgatcaactattacggatacgtaaa-gccaggacaagcgccggacggttagtcgatggaacaaaaaacatactatctctatgtttggattcctgccgtaatgctgaaatgggagttcaaatgattccccaacaggcgaaatcggtgaa	100	98,33-97,78
№8	cgftacttcctacggatctgtgatcaactattacggatacgtaaa-gccaggacaagcgccggacggttagtcgatggaacaaaaaacatactatctctatgtttggattcctgccgtaatgctgaaatgggagttcaatgattccccaacaggcgaaatcggtga	100	98,95-98,42
№9	cgftccttcctatggatctgtgatcaactattacggatgtaaa-gccaggacaagcgccggacggttactcgtatggaacaaaaaacatactatctctatgtttggattcctgccgtaatgctgaaatgggagttcaatgattccccaacaggcgaaatcggtgaa	100	96,28-95,74

На следующем этапе работы сконструировали прототип тест-системы для индикации патогенных лептоспир методом ПЦР-РВ. Состав прототипа тест-системы представлен следующими компонентами: ПЦР-комплект 1 – представляет собой 2,5 кратную реакционную смесь; ПЦР-комплект 2 состоящий из

специфических компонентов – 10 пмоль растворов прямого, обратного праймеров и флуоресцентно-меченного зонда.

Также проводили оптимизацию условий реакции по температурно-временным параметрам, результаты которых представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Определение оптимальной температуры гибридизации праймеров для индикации патогенных лептоспир

Температура, °С	Изолят				
	№1	№2	№7	№8	№9
	Пороговый цикл Ct				
60	34,09±1,46	33,85±0,95	35,13±0,48	38,53±0,61	35,37±1,26
59,4	33,84±0,23	32,88±1,31	35,32±0,73	38,69±1,16	34,41±0,79
58,3	33,99±1,04	32,35±1,76	36,12±1,26	38,11±0,52	36,60±0,53
56,3	33,92±0,83	32,35±0,45	35,97±0,94	35,57±0,71	34,23±0,48
53,9	34,26±0,21	32,31±0,14	34,72±0,08	34,86±0,14	33,77±0,09
52	33,41±1,27	31,97±2,05	35,85±1,24	34,21±0,82	35,01±0,76
50,7	34,19±1,15	33,05±1,82	37,53±0,97	34,03±1,39	35,09±1,23
50	34,31±1,73	32,81±11,57	34,45±0,44	32,68±0,54	36,40±0,87

Оптимальная температура гибридизации праймеров составила 53,9 °С, при которой среднее значение минимальных пороговых циклов Ct равнялось 33,98. Разработанная программа имела следующие этапы: денатурация при 95 °С – 5 мин, 10 циклов; денатурация ДНК – 95 °С 30 с, отжиг праймеров и элонгация при 53,9 °С – 30 с; 40 циклов: денатурацию ДНК – 95 °С 30 с, отжиг праймеров и элонгация при 53,9 °С – 30 с (детекция по каналу ROX).

Также проводили оценку аналитической чувствительности образца ПЦР-РВ тест-системы для индикации патогенных лептоспир, которую определяли с использованием десятикратных разведений препарата ДНК, полученного из лизата бактериальной культуры вида *L. interrogans* серовара *Canicola* с начальной концентрацией $5 \cdot 10^6$ клеток в одном мл культуры. Минимальная концентрация ДНК *L. interrogans* в образце, при которой был зарегистрирован положительный результат (Ct менее 35), составляет 50 микробных клеток, т.е. $5 \cdot 10^2$ копий ДНК в одном мл исследуемого материала.

При определении специфичности прототипа тест-системы для индикации патогенных лептоспир проводили ПЦР-РВ с использованием образцов ДНК *L. interrogans* серовара *Canicola* и бактерий *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG. Результаты реакции показали, что амплификация прошла только с ДНК *L. interrogans* (Ct=20,14), что подтверждает специфич-

ность разработанной ПЦР-РВ тест-системы для индикации патогенных лептоспир.

Изучение стабильности ПЦР-РВ тест-систем необходимо для получения надёжных, точных и воспроизводимых результатов ПЦР-анализа. Нами проведена оценка стабильности прототипа тест-системы при длительном хранении (в течение срока годности – 1 год). Для изучения стабильности прототипа набора использовали метод ускоренного старения ее компонентов в течение семи суток при температуре плюс 37 °С, что соответствует результатам, получаемым при хранении тест-системы при температуре минус 18-20 °С в течение одного года. По истечении семи суток проводили ПЦР-РВ ПКО в трех повторях с использованием компонентов, хранившихся в условиях ускоренного старения. Также параллельно исследовали контрольные аликвоты аналогичных компонентов, которые хранились при температуре минус 18 °С. Для каждой реакции на основании полученных значений минимальных пороговых циклов Ct проводили расчет коэффициента вариации показателей Ct. Минимальный пороговый цикл Ct при амплификации ПКО прототипов тест-систем, хранившихся при температуре минус 18 °С и в условиях ускоренного старения, составил $21,8 \pm 0,35$ и $22,01 \pm 0,52$; коэффициент вариации V показателей Ct равнялся 1,8 % и 1,79 % соответственно.

Таким образом, при определении стабильности прототипа тест-системы при

длительном хранении установили, что коэффициенты вариации составили 1,8 % и 1,79 %, которые не превышали 10 %, что подтверждает устойчивость компонентов прототипа тест-системы к длительному хранению.

На основании проведенных исследований были разработаны проекты нормативно-технической документации прототипа тест-системы (технические условия, инструкция по применению).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В данной работе изучен генетический полиморфизм гена *LipL32 L. interrogans*, также разработан прототип ПЦР-РВ тест-системы для индикации патогенных лептоспир. Установили, что ген *LipL32*, кодирующий липопротеин L32 внешней мембраны *L. interrogans* является высококонсервативным локусом. Разработанные прямой (*lip32FPin2*), обратный (*lip32RPin2*) праймеры и флуоресцентно-меченный зонд (*lip32Z2*), фланкируют фрагмент гена *LipL32*, а также имеют высокую консервативность. По результатам множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *LipL32* патогенных лептоспир выявили нуклеотидные замены, которые были обнаружены только в последовательности KC800994 (серовар Sejroe) – для прямого праймера (*lip32FPin2*) в позициях 131 вместо G → A и 132 - A → G; для обратного праймера (*lip32RPin2*) в позиции 556 A → G, 559 T → A и 561 G → A; зонда *lip32Z2* в позиции 145 G → A. Остальные использованные при множественном выравнивании нуклеотидные последовательности *L. interrogans* в местах «отжига» олигонуклеотидов и зонда были идентичными. Также осуществлено секвенирование продуктов ПЦР пяти изолятов от сероваров *L. interrogans* - Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Bataviae и Tarsosovi. BLAST-анализ нуклеотидных последовательностей данных изолятов с сиквенсами гена *LipL32 L. interrogans* из базы данных NCBI показал, что идентичность их варьировала от 95,74 до 98,95 %. Следовательно, ген *LipL32* внутри вида *L. interrogans* является высококонсерватив-

ным локусом и его можно использовать как генетический мишень для ПЦР-индикации *L. interrogans*.

С использованием разработанных праймеров и флуоресцентного зонда сконструирован прототип тест-системы для индикации патогенных лептоспир методом ПЦР-РВ. Установлено, что специфичность тест-набора составила 100 %, а чувствительность может достигать $5 \cdot 10^2$ копий ДНК в одном мл исследуемого материала. Результаты оценки стабильности тест-системы показали, что значения коэффициентов вариации при хранении составили 1,8 % и 1,79 %, которые не превышали 10 %. Таким образом, прототип тест-системы стабилен при хранении.

ANALYSIS OF THE POLYMORPHISM OF THE LIPL32 GENE OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA FOR THE DEVELOPMENT OF A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION TEST SYSTEM

Shangaraev R.I.* – Candidate of Veterinary Sciences, Researcher (ORCID 0000-0003-3689-1442); **Usoltsev K.V.** – Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5279-9836); **K.S. Khaertynov** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-4764-560X); **Pankova E.V.** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-4446-4619); **Gorbunova M.E.** – Candidate of Biological Sciences, Researcher (ORCID0000-0002-0707-2117); **Khammadov N.I.** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5669-1486); **Osyaniin K.A.** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-2763-8605)

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological safety»

*rafkat.shangaraev@mail.ru

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the polymorphism of the *LipL32* gene of various pathogenic leptospira serovars, as well as to

develop a prototype test system for the indication of this gene using the real-time polymerase chain reaction method with an assessment of its stability. The objects of the study were 245 nucleotide sequences of the *LipL32* gene of *Leptospira interrogans*, DNA samples of leptospira serovars Pomona, Grippityphosa, Canicola, Bataviae and Tarassovi. Based on the results of bioinformatic analysis of 245 nucleotide sequences of the *LipL32* gene, it was established that this gene is a highly conserved region of the genome of the causative agent of leptospirosis. To indicate the pathogen under study for this gene by RT-PCR, a marker locus (lipoprotein L32 region) with a size of 173 nucleotide pairs was determined. Within this site, oligonucleotide primers and a probe were developed, which, according to multiple alignment of the amplified locus, turned out to be identical for most of the analyzed nucleotide sequences of the *LipL32* *L. interrogans* gene. BLAST analysis of the sequenced nucleotide sequences of the pathogenic leptospira serovars Pomona, Grippityphosa, Canicola, Bataviae and Tarassovi showed that the identity of the lipoprotein L32 gene region amplified by engineered oligonucleotides of the above isolates with DNA sequences of the causative agent of leptospirosis stored in the NCBI database ranged from 95.74 to 98.95%. Using the developed oligonucleotides and a fluorescent probe, a prototype test system for the detection of pathogenic leptospire by PCR-RV was constructed. It was found that the specificity of the test kit presented in this work was 100%, and the sensitivity could reach 5·10² copies of DNA per ml of the test material. The stability assessment of the test system showed that the variation coefficients of the minimum threshold values did not exceed 10%, indicating that the kit components were stable during long-term storage.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ананьина, Ю. В. Паразитические и свободноживущие лептоспиреы (Leptospiraceae): эколого-генетические особенности. Зоологический журнал. 2010; Т. 89 (1): 48-52.
2. Ulsenheimer B.C., Tonin A.A, von Laer A.E., Fernandes Dos Santos H., Antônio Sangioni L., Figuera R., Yuri Dos Santos M., Isabel Brayer Pereira D., Pötter L., De Avila Botton S. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* in cats from Central region of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2025; 116. 102286. [https://doi: 10.1016/j.cimid.2024.102286](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102286).
3. Орынгаев, К.Б. Ермагамбетова С. Е., Меңтай А. Специфическая профилактика лептоспироза крупного рогатого скота. Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. 2017; 4(45): 260-261.
4. Шангараев Р.И., Усольцев К.В., Хаертынов К.С., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Сафина Р.Ф., Осянин К.А. Обзор эпизоотической ситуации по лептоспирозу в Российской Федерации за период 2013-2023 гг. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2024; 10(240): 65-72. [https://doi 10.53083/1996-4277-2024-240-10-65-72](https://doi.org/10.53083/1996-4277-2024-240-10-65-72).
5. Самсонова, А.П., Петров Е.М. Сравнение показателей эффективности методов диагностики лептоспирозов в разные сроки с момента заболевания. Бактериология. 2023; 8(3): 99.
6. Нурлыгаянова, Г. А., Белоусов В. И., Шарыпов А. С. Результаты лабораторной диагностики лептоспироза животных различными методами в Российской Федерации за 2021 г. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2023. 9: 75-86. [https://doi 10.36871/vet.zoo.bio.202309009](https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202309009).
7. Хаммадов Н.И., Горбунова М.Е., Сальманова Г.Р., Фахрутдинов Н.А., Гулюкин А.М., Галеева А.Г., Громова Е.А. Конструирование специфических праймеров для ПЦР-диагностики классической чумы свиней. Ветеринарный врач. 2024; 3: 41-46. [https://doi 10.33632/1998-698X_2024_3_41](https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_41).
8. Громова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Осянин К.А. Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза. Ветери-

- нарный врач. 2024; 3: 34-40. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_34.
9. Khaki P., Rahimi-Zarchi F., Moradi Bidhendi S., Gharakhani M. Application of a Multiplex PCR Assay for Molecular Identification of Pathogenic and Non-Pathogenic Leptospire based on LipL32 and 16S rRNA Genes. Arch. Razi. Inst. 2023; 78(1): 413-418. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359211.2388>.
10. Podgoršek D., Ružić-Sabljić E., Logar M., Pavlović A., Remec T., Baklan Z., Pal E., Cerar T. Evaluation of real-time PCR targeting the LipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. BMC Microbiol. 2020; 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>.
11. Latifah I., Abdul Halim A., Rahmat M.S., Nadia M.F., Ubil Z.E., Asmah H., Shafariatul Akmar I., Picardeau M., Siti Haslina O., Nasir M.A. Isolation by culture and PCR identification of LipL32 gene of pathogenic Leptospira spp. in wild rats of Kuala Lumpur. Malaysian J. Pathol. 2017; 39 (2): 161-166.
12. Vedhagiri K., Natarajaseenivasan K., Chellapandi P., Prabhakaran S.G., Selvin J., Sharma S., Vijayachari P. Evolutionary implication of outer membrane lipoprotein-encoding genes ompL1, UpL32 and lipL41 of pathogenic leptospira species. Genomics Proteomics Bioinf. 2009; 7: 96-106. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60038-8](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60038-8).
13. Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C., Zuerner R.L., Zidane N., Wilson P.J., Creno S., Kuczek E.S., Bommezzadri S., Davis J.C., McGrath A., Johnson M.J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R.L., Rood J.I., Lajus A., Davies J.K., Médigue C., Adler B. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis PLoS. ONE. 2008; 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>.
14. Nally J.E., Whitelegge J.P., Bassilian S., Blanco D. R., Lovett M. A. Characterization of the outer membrane proteome of Leptospira interrogans expressed during acute lethal infection Infect. Immun. 2007; 75:766-75773. <https://doi.org/10.1128/IAI.00741-06>.
15. Kumaran S.K., Faizal Abu Bakar M., Mohd-Radil H., Mat-Sharani S., Sakinah S., Poorani K., Alsaedy H., Peli A., Seoh Wei T., Pooi Ling M., Awang Hamat R., Kumari Neela V., Higuchi A., Alarfaj A.A., Rajan M., Benelli G., Arulselvan P., Suresh Kumar S. 3D modelling of the pathogenic Leptospira protein LipL32: A bioinformatics approach. Acta Tropica. 2013; 76: 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.011>.
16. Ваганова А.Н., Фрейлихман О.А., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Межвидовой полиморфизм рестриционных профилей гена lipL32 патогенных лептоспир. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010; 149(5): 543-545.

REFERENCES

1. Ananyina, Yu.V. Parasitic and free-living Leptospira (Leptospiraceae): ecological and genetic features / Yu. V. Ananyina // Zoological Journal, 2010; 89(1): 48-52. (In Russ.).
2. Ulsenheimer B.C., Tonin A.A, von Laer A.E., Fernandes Dos Santos H., Antônio Sangioni L., Figuera R., Yuri Dos Santos M., Isabel Brayer Pereira D., Pötter L., De Avila Botton S. Molecular detection and phylogenetic analysis of Leptospira interrogans and Leptospira borgpetersenii in cats from Central region of Rio Grande do Sul state, Brazil. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2025; 116. 102286. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102286>.
3. Oryntaev, K.B., Ermagambetova S.E., Mentai A. Specific prevention of bovine leptospirosis. Bulletin of the Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Scriabin. 2017; 4(45): 260-261. (In Russ.).
4. Shangaraev R. I., Usoltsev K.S. Khaertynov K.S, Gorbunova M.E., Khammatov N.I., Safina R.F., Osyanin K.A. 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. <https://doi.org/10.53083/1996-4277-2024-240-10-65-72>. (In Russ.).
5. Samsonova, A.P., Petrov, E.M. Comparison of the effectiveness of diagnostic meth-

- ods for leptospirosis at different times from the moment of the disease Bacteriology. 2023; 8(3): 99. (In Russ.).
6. Nurlygayanova, G.A. Belousov V.I., Sharypov A.S. Results of laboratory diagnostics of animal leptospirosis by various methods in the Russian Federation for 2021. Veterinary, Zootechnics and Biotechnology. 2023; 9: 75-86. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202309009>. (In Russ.).
7. Hammadov N. I., Gorbunova M. E., Salmanova G. R., Farhruddinov N.I., Gulukin A.M., Galeeva A.G., Gromova E.A. Design of specific primers for PCR diagnostics of classical swine fever / [et al.] // The Veterinarian. 2024; 3: 41-46. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_41. (In Russ.).
8. Gromova E.A., Mirgazov D.A, Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Osyanin K.A. Development of a multiplex RT-PCR test system for detecting the causative agent of brucellosis. The Veterinarian. 2024; 3: 34-40. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_34. (In Russ.).
9. Khaki P., Rahimi-Zarchi F., Moradi Bidhendi S., Gharakhani M. Application of a Multiplex PCR Assay for Molecular Identification of Pathogenic and Non-Pathogenic Leptospire based on LipL32 and 16S rRNA Genes. Arch. Inst. 2023; 78(1): 413-418. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359211.2388>.
10. Podgoršek D., Ružić-Sabljić E., Logar M., Pavlović A., Remec T., Baklan Z., Pal E., Cerar T. Evaluation of real-time PCR targeting the LipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. BMC Microbiol. 2020; 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>.
11. Latifah I., Abdul Halim A., Rahmat M.S., Nadia M.F., Ubil Z.E., Asmah H., Shafariatul Akmar I., Picardeau M., Siti Haslina O., Nasir M.A. Isolation by culture and PCR identification of LipL32 gene of pathogenic Leptospira spp. in wild rats of Kuala Lumpur. Malaysian J. Pathol. 2017; 39 (2): 161-166.
12. Vedhagiri K., Natarajaseenivasan K., Chellapandi P., Prabhakaran S.G., Selvin J., Sharma S., Vijayachari P. Evolutionary implication of outer membrane lipoprotein-encoding genes ompL1, UpL32 and lipL41 of pathogenic leptospira species. Genomics Proteomics Bioinf. 2009; 7: 96-106. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60038-8](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60038-8).
13. Picardeau M., Bulach D.M, Bouchier C., Zuerner R.L., Zidane N., Wilson P.J., Creno S., Kuczek E.S., Bommezzadri S., Davis J.C., McGrath A., Johnson M.J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R.L., Rood J.I., Lajus A., Davies J.K., Médigue C., Adler B. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis PLoS. ONE. 2008; 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>.
14. Nally J.E., Whitelegge J.P., Bassilian S., Blanco D. R., Lovett M. A. Characterization of the outer membrane proteome of Leptospira interrogans expressed during acute lethal infection Infect. Immun. 2007; 75: 766-75773. <https://doi.org/10.1128/IAI.00741-06>.
15. Kumaran S.K., Faizal Abu Bakar M., Mohd-Radil H., Mat-Sharani S., Sakinah S., Poorani K., Alsaedy H., Peli A., Seah Wei T., Pooi Ling M., Awang Hamat R., Kumari Neela V., Higuchi A., Alarfaj A.A., Rajan M., Benelli G., Arulselvan P., Suresh Kumar S. 3D modelling of the pathogenic Leptospira protein LipL32: A bioinformatics approach. Acta Tropica. 2013; 76: 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.011>.
16. Vaganova A.N., Freilikhman O.A., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Genetics: interspecific interspecific polymorphism of gene lipL32 restriction profiles of pathogenic leptospire. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2010; 149(5): 543-545. (In Russ.).