

Санкт-Петербургский Государственный Университет

**Адаптация метода ПЦР в реальном времени для оценки длительности персистенции
лептоспир у экспериментально зараженных животных**

Пряников Олег Игоревич

Выпускная квалификационная работа магистра

(магистерская диссертация)

Работа выполнена на кафедре

микробиологии

Научный руководитель:

ст. преподаватель Е.В. Коженкова

Санкт-Петербург

2016

Содержание

Введение.....	3
1. Характеристика рода <i>Leptospira</i>	5
1.1 Таксономия и серологическое типирование лептоспир.....	5
1.2 Морфологические и физиолого-биохимические особенности.....	6
1.3 Организация генома патогенных лептоспир.....	9
2. Эпидемиология и клинические аспекты.....	12
2.1 Историческая справка.....	12
2.2.1 Лептоспироз животных.....	13
2.2.2 Лептоспироз человека.....	14
2.3 Методы лечения и профилактики лептоспироза.....	16
3. Факторы вирулентности патогенных лептоспир.....	18
3.1 Подвижность как фактор вирулентности.....	20
3.2 Роль хемотаксиса в вирулентности лептоспир.....	22
3.3 Взаимодействие патогенных лептоспир с компонентами внеклеточного матрикса.....	23
3.3.1 Моновалентные адгезины.....	24
3.3.2 Поливалентные адгезины.....	27
3.3.3 Факторы вирулентности с неизвестной функцией.....	30
4. Патогенез, индуцируемый лептоспирами.....	36
4.1 Индукторы патогенеза.....	37
4.1.1 Белки.....	38
4.1.2 Липополисахариды.....	40
4.2. Персистенция лептоспир в органах и тканях.....	41
4.2.1 Колонизация почек патогенными лептоспирами.....	44
5. Моделирование лептоспироза in vivo.....	47
6. Диагностика.....	49
6.1 Серологические методы.....	49
6.1.1 Реакция микроагглютинации.....	49
6.1.2 Другие серологические методы диагностики.....	50
6.2 Молекулярно-генетические методы.....	51
6.2.1 Использование ПЦР для диагностики лептоспироза.....	51
6.2.2 Использование ПЦР в реальном времени для оценки длительности персистенции лептоспир в органах и тканях.....	52
Выводы.....	56
Библиографический список.....	57

Введение

Лептоспироз - острое инфекционное заболевание, вызываемое патогенными представителями рода *Leptospira* и представляющее важную медико-социальную проблему в связи с широким распространением возбудителя в различных географических зонах мира, профессиональным характером заражения лиц, высокой смертностью и трудностями диагностики и лечения, а также значительными экономическими потерями, обусловленными инфицированием сельскохозяйственных животных.

Лептоспироз считается одним из самых распространенных зоонозов на планете, в то же время, по степени изученности молекулярных механизмов патогенеза это заболевание существенно уступает другим бактериальным инфекциям. Сравнительный анализ секвенированных геномов патогенных и сапрофитных лептоспир выявил сотни генов, кодирующих потенциальные факторы вирулентности, вместе с тем, функции большинства этих генов неизвестны. Это делает крайне затруднительным идентификацию и изучение факторов вирулентности, а также оценку их значимости для патогенности возбудителя.

Диагностика лептоспироза на ранних стадиях заболевания осложнена неспецифичностью симптомов. На поздних стадиях лептоспироз может принимать стремительное и очень тяжелое течение, сложно поддающееся лечению, что нередко приводит к летальному исходу. Поэтому крайне важной является ранняя и эффективная диагностика лептоспироза.

Однако, даже наиболее современные и эффективные методы диагностики, чаще всего, не позволяют получить своевременный результат. Одной из наиболее актуальных проблем в диагностике лептоспироза является недостаточная изученность феномена персистенции лептоспир в органах и тканях больных животных и человека. Знание факторов вирулентности и паттернов распространения лептоспир внутри организма хозяев во время инфекционного процесса и длительность персистенции возбудителя в отдельных органах и тканях может иметь неопределимое значение в оказании эффективной медицинской помощи, особенно, при несвоевременной постановке диагноза.

Классические серологические методы, являющиеся основным подходом в диагностике лептоспир, непригодны для изучения явления персистенции лептоспир в органах и тканях. Перспективными для решения этой задачи являются молекулярно-

биологические методы диагностики лептоспироза. Наиболее многообещающим подходом в изучении персистенции является использование метода ПЦР в реальном времени, так как, кроме идентификации возбудителя, этот метод позволит определить также и число бактериальных клеток в конкретных органах и тканях хозяина.

Для изучения персистенции возбудителя и разработки эффективных методов диагностики необходимо знание генетических особенностей патогенных лептоспир и ключевых факторов индуцируемого ими патогенеза. В задачу данной реферативной работы входит обзор и обсуждение современной литературы, посвященной патогенным представителям рода *Leptospira*. Особое внимание уделяется:

- (1) характеристике факторов вирулентности патогенных представителей рода *Leptospira*
- (2) использованию метода ПЦР в реальном времени для диагностики лептоспироза.

1. Характеристика рода *Leptospira*

1.1 Таксономия и серологическое типирование лептоспир

Бактерии рода *Leptospira* относятся к филе *Spirochaetae*. Название рода "*Leptospira*" было предложено Ногучи (Nogushi) в 1918г. для того, чтобы отделить спирохет вызывающих заболевание Вейла (англ., Weil's disease) от других спирохет, уже описанных на тот момент.

Изолированные штаммы *Leptospira* spp. дифференцировались исследователями на основании антигенных характеристик и подразделялись на серовары. Под сероваром в данном случае понимается группа патогенных лептоспир, клеточная стенка которых содержит липополисахариды, обладающие сходной структурой, и, соответственно, сходными антигенными свойствами. Серовары идентифицируются серологическими методами. При открытии новых сероваров лептоспир, им присваивался статус вида (*Leptospira pomona*, *Leptospira canicola*, *Leptospira hardjoi* т.д.). Виды с родственными антигенами объединяли в серогруппы. Когда к 1982г. количество видов *Leptospira* превысило 200, субкомитет по таксономии лептоспир принял решение об отнесении всех патогенных сероваров в вид *Leptospira interrogans* и сапрофитных — в *Leptospira biflexa* (Faine, Stallman, 1982).

В 1987г., на основании результатов ДНК-ДНК гибридизации, вид *Leptospira interrogans* было решено разделить на 7 видов (Yasuda et al., 1987). В течение следующих лет в род *Leptospira* были добавлены новые виды, как патогенные, так и сапрофитные (Adler, de la Peña Moctezuma, 2010). На данный момент насчитывается 9 патогенных видов, 5 условно-патогенных и 7 сапрофитных видов, образующих три филогенетические подгруппы (рис. 1).

В то время как серологическая классификация патогенных лептоспир не имеет таксономического значения, она важна для понимания эпидемиологии лептоспир. На данный момент род *Leptospira* содержит более 250 патогенных сероваров и более 70 непатогенных, объединяемых в 24 серогруппы, и с каждым годом число сероваров неуклонно растет.

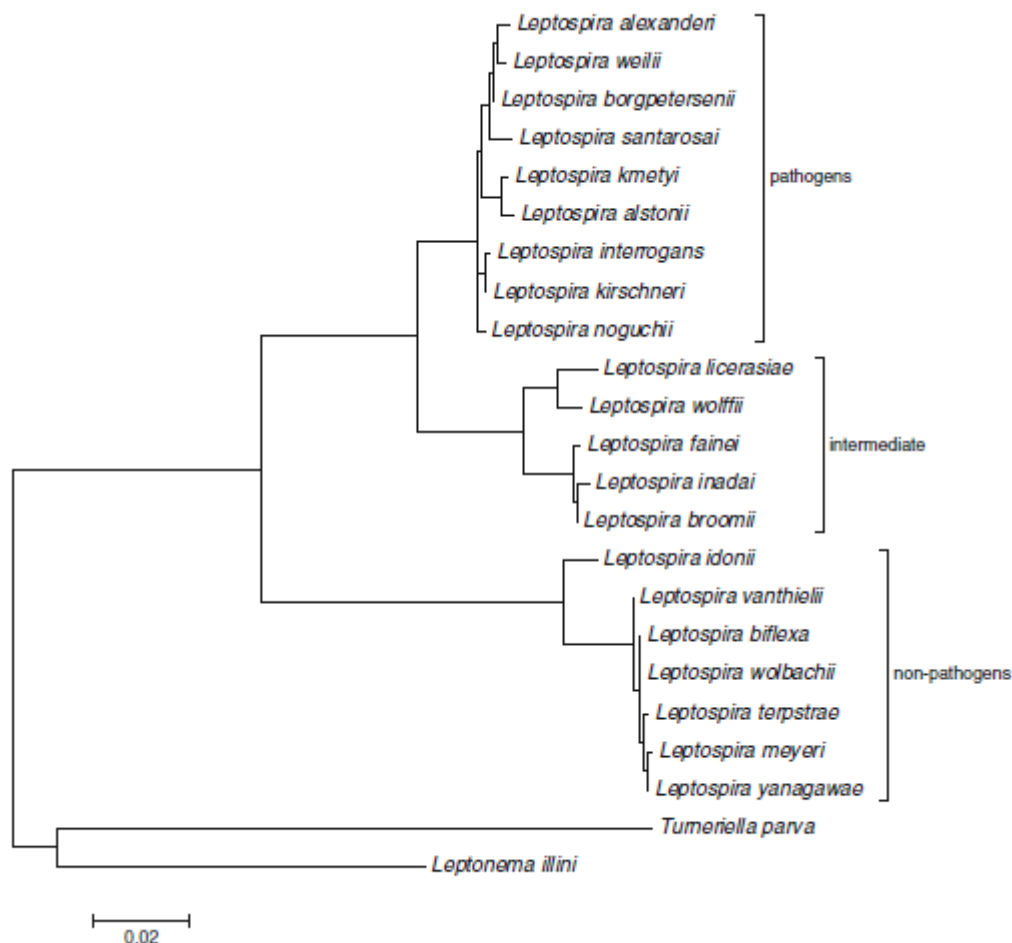


Рис. 1. Филогенетическое древо семейства *Leptospiraceae*

1.2 Морфологические и физиолого-биохимические особенности

Представители рода *Leptospira* — длинные, тонкие, подвижные, спирально закрученные бактерии, способные вести как сапрофитный, так и паразитический образ жизни. Патогенные лептоспиры способны поражать широкий спектр живых организмов, а также выживать в морской воде. Несмотря на различные стратегии выживания, лептоспиры постоянны в своем строении, размере, подвижности и ультраструктуре. Лептоспиры имеют закрученную форму со средним диаметром 0.1 микрон, длиной варьирующейся в пределах 6-20 микрометров, шагом спиралей 0.1-0.15 микрон и длиной волн 0.5 микрон (Carleton et al., 1979; Faine et al., 1999; Goldstein, Charon 1988, 1990) (рис. 2). Патогенные штаммы лептоспир, изолированные из хозяев, как правило, короче и имеют меньший шаг спирали, чем сапрофитные формы и многократно пересеянные лабораторные штаммы. Лептоспиры, выращиваемые в лабораторных условиях в средах с

недостатком питательных веществ, удлиняются и поддержание культур в таких средах приводит к появлению неподвижных сферически форм (Ellis et al., 1983).

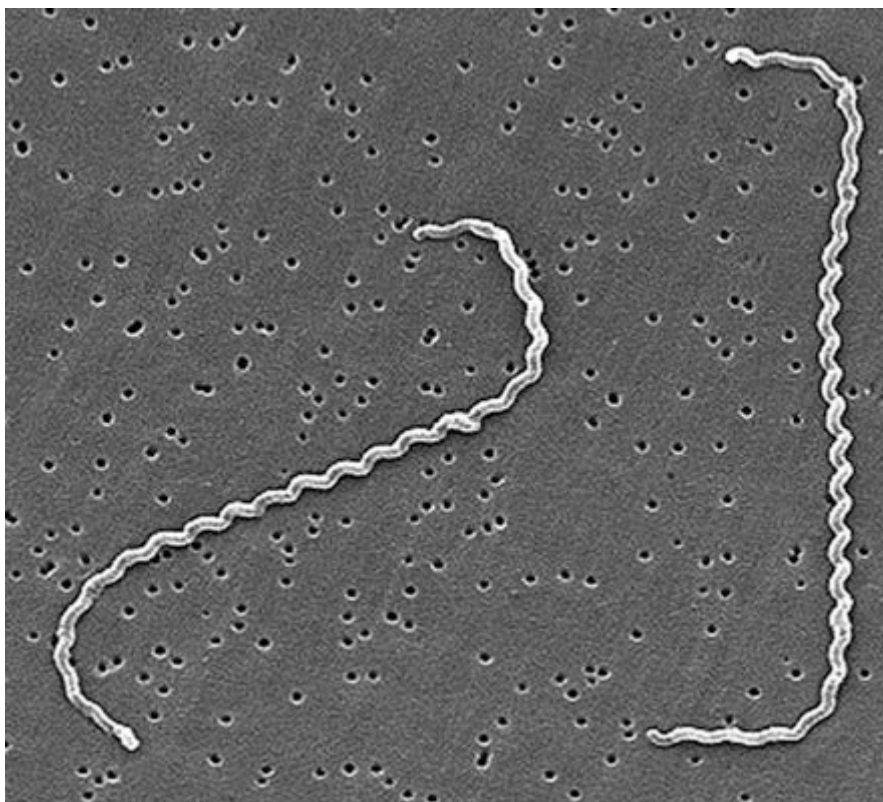


Рис. 2. Электронная микрофотография клеток *Leptospira interrogans*, изолированных в 1915 из крови больного солдата в Бельгии (цит. по Adler, 2015)

Общая ультраструктура *Leptospira* схожа с другими представителями грамотрицательных бактерий (Holt, 1978), обладающих наружной мембраной, содержащей слой липополисахаридов и цитоплазматической мембраной, разделенных периплазматическим пространством (рис. 3). Однако, лептоспиры обладают уникальным среди спирохет строением клеточной стенки. В отличие от других крупных групп спирохет, таких как *Treponema* и *Borrelia*, у лептоспир липополисахариды находятся на поверхности клетки, что является основой характерного для этих спирохет широкого разнообразия сероваров (Evangelista, Coburn, 2010). Липополисахариды имеют важное значение в вирулентности представителей рода *Leptospira* (Murray et al., 2010; Nahori et al., 2005; Werts et al., 2001).

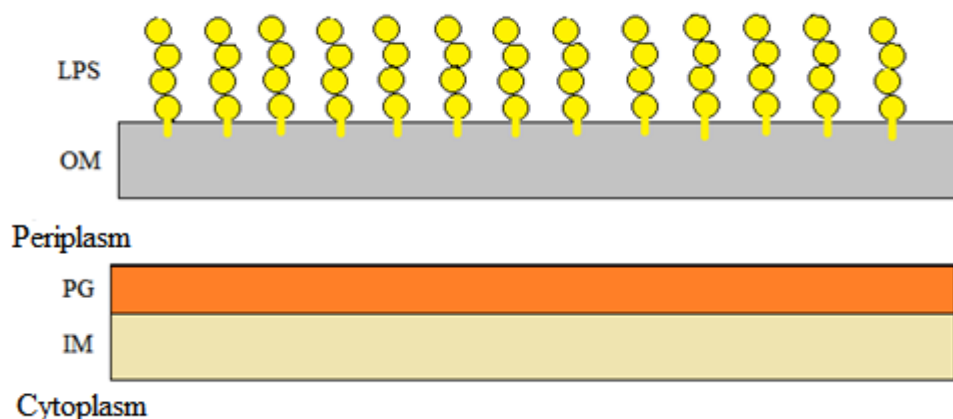


Рис. 3. Схематичное изображение клеточной оболочки *Leptospira*.

LPS –липополисахариды; OM – наружная мембрана; Periplasm – периплазматическое пространство; PG –пептидогликан; IM – цитоплазматическая мембрана; Cytoplasm – цитоплазматическое пространство.

В геноме патогенных лептоспир полностью присутствуют пути для биосинтеза аминокислот и нуклеиновых кислот (Faineetal., 1999; Renetal., 2003), кроме того, отличительной особенностью возбудителей лептоспироза является способность расти в средах содержащих, 8-азагуанин— аналог пурина (Johnson, Rogers, 1964). Его внесение в питательную среду служит надежным способом дифференцировки сапрофитных и патогенных форм при культивировании лептоспир.

Лептоспиры необычны тем, что в качестве основного источника энергии углерода они используют бета-окисление длинных жирных кислот(содержащих более 15-ти атомов углерода) (Henneberry and Cox, 1970).Представители рода *Leptospira* не способны синтезировать жирные кислоты из пирувата и ацетата и поэтому должны получать их из окружающей среды (Nascimento et al., 2004a). Внесение жирных кислот в питательные среды является обязательным требованием для культивирования лептоспир. Бактерии не способны использовать глюкозу в качестве питательного субстрата из-за редукции систем транспорта (Nascimento et al., 2004a; Picardeau et al., 2008; Zhang et al., 2011).

Лептоспиры являются аэробными микроорганизмами и растут в микроаэрофильных условиях, поэтому у них в полном размере присутствует набор генов, кодирующих цикл трикарбоновых кислот, и компоненты дыхательной транспортной цепи. Соответственно, бактерии синтезируют АТФ через окислительное фосфорилирование, используя F₀F₁-АТФтазу (Nascimento et al., 2004a; Ren et al., 2003). Клетки *L.interrogans* используют O₂ в качестве конечного акцептора электронов. Для роста *Leptospira*

необходим азот (Faine et al., 1999). Источником азота является аммиак, хотя многие виды *Leptospira* продуцируют уреазу, что позволяет им в качестве источника азота вместо аммиака использовать мочевины (Kadis, Pugh, 1974).

Секвенирование геномов штаммов патогенных лептоспир показало, что, в отличие от большинства представителей филы *Spirochaetae*, у них присутствуют гены, необходимые для синтеза протогема и витамина B₁₂ (Nascimento et al., 2004b; Ricaldi et al., 2012).

1.3 Организация генома патогенных лептоспир

Все представители рода *Leptospira*, геном которых секвенирован, содержат две кольцевые хромосомы (Xue et al., 2009). Размер большего репликона варьирует от 3,6 до 4,3 Mb; он содержит гены, кодирующие белки репликации (*dnaA*, *dnaN*, *gugA*, *gugB*) и большую часть генов домашнего хозяйства (англ., *housekeeping genes*). Вторая хромосома меньше (277-350 Kb) и содержит, напоминающую плазмидную точку начала репликации, а также ряд существенных генов, участвующих в синтезе аминокислот. Относительное содержание GC-пар в ДНК представителей рода *Leptospira* составляет 35-42%. Плазмиды у патогенных лептоспир не обнаружены. Псевдогены и транспозазы составляют соответственно 2% и 1% от генома патогенных лептоспир.

Многие гены лептоспир были клонированы и проанализированы: гены синтеза некоторых аминокислот и рРНК, гены рибосомных белков и полимеразы, гены репарации ДНК и белков теплового шока, гены сфингомиелиназ и гемолитических ферментов, гены белков клеточной стенки и липополисахаридов, гены аппарата движения. В геноме патогенных лептоспир также закодировано необычно большое количество белков, содержащих последовательности богатые лейцином (англ., *leucine-rich-repeats*, LRR). У других патогенных бактерий такие белки обычно вовлечены в адгезию к клеткам хозяина и инвазию, однако, функция белков патогенных лептоспир, содержащих LRR-домены, неизвестна (Adler et al., 2011).

Сравнительный анализ патогенных (*L. interrogans* и *L. borgpetersenii*) и сапрофитных (*L. biflexa*) лептоспир показал наличие у них сходства по 2050 генам корового генома (англ. *core leptospiral genome*). Большинство функциональных групп, составляющих этот геном, представлены генами домашнего хозяйства (гены, отвечающие

за метаболизм ДНК и РНК), процессинга белков, поддержки клеточной структуры и энергетического метаболизма (Adler et al., 2011).

Кроме того, исследование генома патогенного вида *L. borgpetersenii* (который, как предполагается, распространяется трансмиссивно, а не через окружающую среду, что более характерно для *L. interrogans*), показало, что у этого вида меньший размер генома по сравнению *L. interrogans* (Xue et al., 2009). Это связано с тем, что *L. borgpetersenii* имеет меньше генов, кодирующих транспортные системы метаболитов.

Треть генов *L. biflexa* отсутствуют в геноме патогенных форм; эти гены, главным образом, вовлечены в получение питательных веществ из окружающей среды. Всего, в геноме лептоспир закодировано от 3085 до 3600 белков, из них 40% — с неизвестной функцией (Xue et al., 2009). Из 655 белков, уникальных для *L. interrogans*, 78% этих белков имеют неизвестную функцию. Аналогичным образом, 58% из 308 уникальных белков *L. borgpetersenii* также обладают неизвестной функцией. Уникальные гены с известной функцией представлены генами синтеза липополисахаридов, кодирующие, в том числе, идентифицированные липопротеины клеточной стенки LipL32, LipL36, LipL41 и LipL45, а также Lig-белки и Len-белки (Adler et al., 2011). Отсутствие у *L. biflexa* генов, кодирующих сфингомиелиназы, может свидетельствовать о важности этих ферментов для вирулентности патогенных лептоспир. Однако, на данный момент нет прямых доказательств функционирования сфингомиелиназ в качестве детерминант вирулентности (Adler et al., 2011).

С некоторыми возможными исключениями, набор генов, уникальных для патогенных лептоспир, не содержит детерминант вирулентности, схожих с детерминантами вирулентности известных патогенных микроорганизмов. Это говорит о том, что геном возбудителей лептоспироза содержит уникальные детерминанты вирулентности, которые не могут быть идентифицированы методами биоинформационного анализа, включающего сравнение генома патогенных лептоспир с другими бактериальными геномами (Xue et al., 2009). Соответственно, сравнительный генетический анализ необходимо применять совместно с другими подходами (например, мутагенез и транскрипционный анализ) для идентификации детерминант вирулентности.

Для патогенных лептоспир характерна функциональная избыточность генома, что может быть следствием расширения генома за счет дубликации (Bulach et al., 2006). Изобилуют группы функционально одинаковых, паралогичных генов, таких как гены,

принадлежащие к семействам *lig* и *len*. Белки LigA и LigB связывают коллаген, ламинин, фибриноген, фибронектин и многочисленные растворимые регуляторы системы комплемента (Choy et al., 2007), все продукты генов *len* — белки LenABCDEF — связывают ламинин и фибронектин. Также имеет место функциональное совпадение между белками, не имеющими сходства в кодирующих их последовательностях. Например, белки LipL32, LigA, LenABCDEF, PlyC и другие 25 белков связываются с ламинином (Carvalho et al., 2009; Hoke et al., 2008; Stevenson et al., 1990).

Причину этого явления сложно объяснить. Белки с функциональной избыточностью могут действовать на разных стадиях заболевания, в разных тканях или действовать в синергии. Многочисленность рецепторов к субстратам хозяев может позволять лептоспирам поражать широкий диапазон млекопитающих, у которых молекулы-мишени могут варьироваться в структуре (Choy et al., 2007). Также, вполне возможно, что многочисленные рецепторы к растворимым белкам, таким как фибронектин и плазминоген, связываясь со своими лигандами, могут формировать агрегаты, покрывающие поверхность лептоспир белками хозяина. Это маскирует подлежащие антигены и позволяет паразитическим лептоспирам избегать иммунного ответа (Bulach et al., 2006).

Следствием функциональной избыточности является удивительное отсутствие аттенюации у мутантов по отдельным факторам вирулентности. Белки, такие как, LipL32, LipL4 1 и LigB, являются подробно описанными факторами вирулентности, однако мутанты по генам, кодирующими эти белки полностью сохраняют свою вирулентность как в острой, так и в хронической формах (Croda et al., 2008; King et al., 2013; Murray et al., 2009c).

2. Эпидемиология и клинические аспекты

2.1 Историческая справка

Современная история лептоспироза берет свое начало в 1886-ом году, когда Адольф Вейл (A.Weil) впервые описал тип желтухи, сопровождаемый спленомегалией, почечной недостаточностью, конъюнктивитами и кожными высыпаниями. Несмотря на то, что этиология заболевания была неизвестна, было очевидно, что лептоспироз был инфекционным заболеванием, чаще всего приобретаемым при активности на открытом воздухе и при контакте с водой из различных источников. Эпидемии чаще всего наблюдались среди работников канализационных служб, рисовых полей и угольных шахт.

Однако, очевидно, что лептоспироз существует уже на протяжении сотен лет, хотя достаточно сложно делать уверенные выводы из упоминаний и записей, предшествовавших рассвету современной литературы науки и медицины. Можно предполагать, что лептоспироз упоминается в очень древних текстах, особенно Китая и Японии под названием "акиями" (англ., akiyami - осенняя лихорадка), что связано с активным выращиванием риса в этих странах. Предполагается, что лептоспироз, изначально эндемичный для стран юго-восточной Азии, был занесен в страны Западной Европы и Америки при распространении по всему миру крыс *Rattus norvegicus* в XVII веке.

Этиология заболевания была впервые описана в 1915-ом году одновременно в Японии и Германии. В Японии, Инада (Inada) и Идо (Ido) обнаружили спирохет и специфические антитела в крови шахтеров с инфекционной желтухой (СС). Две группы немецких врачей, изучавших немецких солдат больных "Французской болезнью" также обнаружили в их крови спирохет. Уленхут (Ulenhuth) и Фромме (Fromme), а также Хюбенер (Hubener) и Рейтер (Reiter) обнаружили спирохет в крови морских свинок, привитых кровью больных солдат. Вскоре, после публикаций Инады в период Первой Мировой войны, на обеих сторонах Западного Фронта начали фиксироваться многочисленные случаи заболевания лептоспирозом.

Однако, из-за споров о номенклатуре микроорганизмов, описание лептоспиры, сделанное еще за 10 лет до описания заболевания, осталось незамеченным. В 1905-ом году Стимсон (Stimson) описал наличие спирохет в почечных канальцах пациента,

предположительно скончавшегося от желтой лихорадки. Стимсон описал наблюдаемые им спирохеты, назвав их *Spirochaeta interrogans*.

Важность профессии как фактора риска заболевания и роль крыс, как синантропных животных, в переносе лептоспироза были описаны в 1917 году. Несколько лет спустя лептоспир обнаружили у собак и домашнего скота.

Изучение лептоспироза в последующие десятилетия смогло предоставить науке и медицине очень важные данные, необходимы для понимания биологии лептоспир. Особенно важными является восприятие лептоспироза как заболевания мирового масштаба, поражающего почти все виды млекопитающих и особенно грызунов, а также важность домашних животных как переносчиков заболевания. Также, десятилетия изучения лептоспироза показали, что болезнь Вейла является лишь одним из многочисленных проявлений заболевания, которые очень широко варьируются от легкой лихорадки до тяжелых форм с поражением внутренних органов, и, нередко, летальным исходом.

2.2.1 Лептоспироз животных

Лептоспироз является глобально распространенным зоонозом, который может приносить значительный урон продуктивности животноводства, поражая репродуктивные функции домашнего скота. Различные виды животных в разной степени подвержены лептоспирозу (например, лошади подвержены инфицированию широким спектром сероваров, в то время, как лептоспироз кошек крайне редок) (Nathaway, 1981). Ключевым моментом в эпидемиологии лептоспироза являются носители заболевания в хронической форме, выделяющие лептоспир в окружающую среду или передающие заболевание при половых контактах.

В теории, любой вид патогенных лептоспир может вызвать заболевание у животных. К счастью, только очень небольшое количество сероваров эндемично для каждого отдельного региона, и, как правило, эти серовары циркулируют в отдельных популяциях видов, являющихся природными резервуарами лептоспироза в этом регионе. Как правило, заражение других животных, особенно сельскохозяйственных, а также человека (случайно) происходит при нарушении санитарного контроля, контроля за вредителями (особенно грызунами) и условий содержания животных (Ellis et al., 1986a, b).

2.2.2 Лептоспироз человека

Лептоспироз человека фундаментально отличается от лептоспироза животных в эпидемиологии, патогенезе, клинических проявлениях и требованиях для диагностики.

Так как лептоспироз является зоонозным заболеванием, то люди являются случайными жертвами заболевания, приобретая его при контакте поврежденных кожи или слизистых оболочек со средой, содержащей возбудителей заболевания. Также заражение может произойти при прямом контакте с зараженными животными или их мочой (или почвой и водой, загрязненных мочой зараженных животных). Чаще всего заболевание приобретается через контакт с почвой или водой, содержащей лептоспир.

Лептоспироз является эндемичным заболеванием тропических зон, однако, развитие туризма привело к распространению болезни по всему земному шару. Частота встречаемости заболевания (не связанная с туризмом) варьируется в зависимости от региона и составляет 0.5 на 100 тысяч населения в Европе, и 95 на 100 тысяч населения в Африке (Adler et al., 2011). Очень важными факторами заболевания являются профессиональная деятельность человека и активность на открытом воздухе. Чаще всего, заболевание диагностируется у людей, работа которых предполагает контакт с почвой, водой или животными (шахтеры, работники сельского хозяйства, рыбаки, ветеринары и т.д.). Нередко лептоспироз диагностируют у спортсменов – пловцов и тех, кто занимается конным спортом.

Проявления лептоспироза варьируются от легкой фебрильной лихорадки до молниеносно протекающей формы, являющейся серьезной угрозой для жизни. Как следствие, признаки и симптомы лептоспироза очень изменчивы, что приводит к трудности симптоматической диагностики заболевания.

Заболевание начинается с инкубационной фазы, началом для которой служит попадание возбудителей в кровь, а окончанием служит первое проявление симптомов. Фаза длится от 7 до 12 дней, однако были зафиксированы как случаи трехдневного инкубационного периода, так и тридцатидневного.

Острая фаза заболевания начинается с резкого появления лихорадки, озноба и сильных головных болей. Эти симптомы крайне неспецифичны и являются общими для множества острых фебрильных лихорадок. Более специфичными для лептоспироза

являются мышечные боли в икроножных мышцах и кровоизлияния в конъюнктиву глаза, или желтушность белков глаз. Кожные высыпания нетипичны для лептоспироза. В 20-57% случаев наблюдается непродуктивный кашель. Также, при лептоспирозе наблюдаются боли в области живота, сопровождаемые тошнотой, рвотой и диареей.

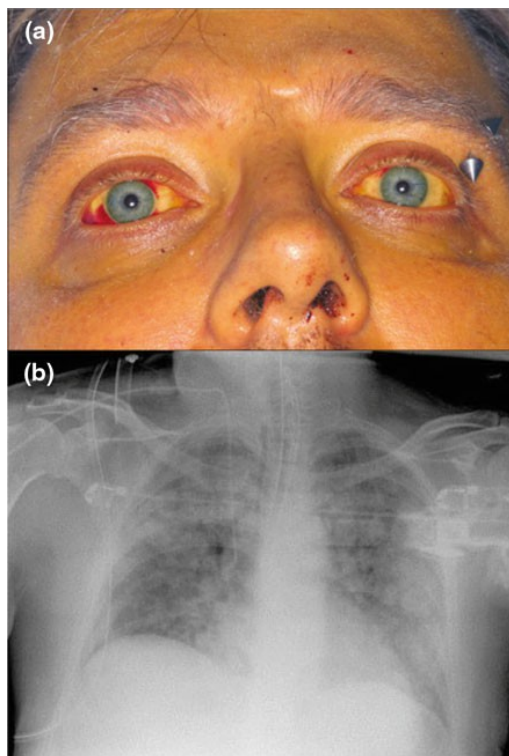


Рис. 3. Клинические проявления лептоспироза. **(a)** - Характерные кровоизлияния в конъюнктиву глаза и иктеричность белков глаз; **(b)** - Обильная легочная геморрагия (цит. по Adler, 2015)

Тяжелые (иктерические) формы лептоспироза наблюдаются на поздних стадиях заболевания и характеризуются дисфункцией внутренних органов: печени, почек, легких и мозга. Сочетание почечной недостаточности с желтухой является одним из первых описаний лептоспироза - болезнью Вейла. У большинства больных с тяжелой формой лептоспироза наблюдаются внутренние кровоизлияния в легких и кишечнике, сочетающиеся с нарушением коагуляционных процессов. Лептоспиры вызывают в почках уникальную для лептоспироза патологию, приводящую к острому нарушению обмена калия, что может привести к летальному исходу. При тяжелой форме лептоспироза у пациентов может возникнуть острый респираторный дистресс-синдром, характеризующийся очень высокой смертностью (более 50%). Также, при тяжелой форме лептоспироза может возникнуть менингоэнцефалит.

При успешном лечении пациент переходит в фазу восстановления, при которой функции организма полностью восстанавливаются, хотя во 21-30% случаях больные жалуются на сохранение симптомов лептоспироза в легкой форме до 24 месяцев. Переход заболевания в хроническую форму теоретически возможен, но такие случаи никогда не наблюдались.

2.3 Методы лечения и профилактики лептоспироза

Методы лечения лептоспироза варьируются в зависимости от тяжести и стадии заболевания на момент обращения за медицинской помощью. Пациентам со слабым проявлением симптомов или с симптомами, соответствующими простуде, следует оказать симптоматическое лечение и предупредить их о необходимости обращения за медицинской помощью при ухудшении состояния здоровья. Пациенты с более острыми проявлениями лептоспироза должны быть госпитализированы для дальнейшего оказания медицинской помощи.

Практика использования антибиотиков в лечении лептоспироза, а также лабораторные исследования показывают смешанные результаты. Пенициллин начали использовать в лечении лептоспироза практически сразу после его открытия, однако, без положительных результатов. Использование окситетрациклина так же не дало очевидных положительных результатов при лечении лептоспироза (Takafuji et al., 1984). Использование доксициклина показало снижение тяжести симптомов и длительности заболевания в среднем на два дня при неиктерической форме заболевания (Takafuji et al., 1984). Отметим, что пациенты с тяжелой формой заболевания не были включены в это исследование. Основной трудностью в эффективном использовании антибиотиков является локализация лептоспир в тканях и органах на поздних стадиях заболевания, что наблюдается у пациентов с тяжелой формой

Большинство исследователей заключают, что лечение антибиотиками должно быть начато как можно раньше и сопровождаться симптоматическим лечением.

Прием доксициклина является эффективной краткосрочной мерой для снижения риска заболевания при работе в эндемичных для заболевания областях и средах с высоким профессиональным риском инфекции (Takafuji et al., 1984). Также имеются данные об аналогичном использовании пенициллина (Sehgal et al., 2000).

Иммунизация от лептоспироза малоэффективна, так как вакцины являются относительно сероваро-специфичными и работают только против конкретных сероваров, а также могут обеспечить иммунитет от их гомологов или сероваров, обладающих аналогичной антигенной структурой. Таким образом, вакцины должны содержать в себе серовары, обнаруживаемые в данный момент в местности проживания или пребывания иммунизируемого. Из-за постоянно меняющегося распространения сероваров и изменения их встречаемости, вакцинация обладает ограниченным успехом. Большинство вакцин требуют дополнительного ежегодного введения для поддержания их эффективности против лептоспироза.

3. Факторы вирулентности патогенных лептоспир

Как было сказано выше, сравнительный анализ геномов патогенных и сапрофитных лептоспир выявил сотни генов, кодирующих потенциальные факторы вирулентности, вместе с тем, функции большинства этих генов не известны. Кроме того, среди факторов вирулентности лептоспир нет гомологов белков с известной функцией (Adler et al., 2011). Это может означать, что патогенные лептоспиры обладают уникальными механизмами вирулентности. Последние работы, связанные с получением мутантов *Leptospira* с помощью индуцированного мутагенеза (Bourhy et al., 2005), в сочетании с увеличением числа доступных генетических последовательностей помогли продвинуться в изучении и описании факторов вирулентности (Croda et al., 2008).

Использование направленного мутагенеза позволило получить мутантные штаммы лептоспир с инактивированными генами, кодирующими предполагаемые факторы вирулентности. Однако, эксперименты на животных моделях не обнаружили снижение вирулентных свойств у некоторых из этих штаммов (таблица 1.), что может быть связано с избыточностью механизмов вирулентности патогенных лептоспир. Очевидно, что многие механизмы, стоящие за процессами течения заболевания пока еще остаются неизвестными и требуют дальнейшего изучения.

Таблица 1. Факторы вирулентности патогенных лептоспир, их роль в патогенезе и степень аттенуации мутантных штаммов

Фактор вирулентности	Предполагаемое значение для вирулентности	Степень аттенуации мутанта	Ссылка на источник
Подвижность	Проникновение сквозь слизистую мембрану хозяина или для проникновения в ткани хозяина через повреждения кожи	Полная потеря способности к индуцированию инфекционного процесса	(Picardeau et al., 2001)
Коллагеназа	Обеспечение транцитоза	Неизвестна; снижение способности к транцитозу в культурах клеток.	(Kassegne et al., 2014).
Хемотаксис	Неизвестно	Аттенуация отсутствовала	(Murray et al., 2009a)

Адгезины , взаимодействующие с компонентами внеклеточного матрикса	Проникновение лептоспир в ткани хозяина, повреждение тканей хозяина, ингибирование регенерации тканей, неизвестные функции	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют
Белки-адгезины LigA, LigB, LipL32	Проникновение лептоспир в ткани хозяина, повреждение тканей хозяина, ингибирование регенерации тканей неизвестные функции	Аттенюация отсутствовала	(Murray et al., 2009c)
Белок Loa22	Неизвестно	Умеренная степень аттенюации	(Ristow et al., 2007)
Белок LguA	Неизвестно	Умеренная степень аттенюации	(Zhang et al., 2013)
Липополисахариды	Неизвестно	Высокая степень аттенюации	(Marcsisin et al., 2013), (Murray et al., 2010)
Бактериальный шаперон HtpG	Неизвестно	Высокая степень аттенюации	(King et al., 2013), (Marcsisin et al., 2013)
Продукты генов <i>lb194</i> , <i>la2786</i> и <i>la0589</i>	Неизвестно	Потеря способности к колонизации почек мышей	(Marcsisin et al., 2013)
Белки LenB и LigB	Резистентность лептоспир к компонентам сыворотки	Умеренная степень аттенюации	(Croda et al., 2008)
Мсе-белки	Адгезия к макрофагоподобным клеткам и попадание внутри этих клеток	Высокая степень аттенюации	(Zhang et al., 2012b)
Каталаза (KatE)	Нейтрализация перекиси водорода	Полная потеря способности к индуцированию инфекционного процесса	(Eshghi et al., 2012a)
Шаперон ClpB	Неизвестно	Полная потеря способности к индуцированию инфекционного процесса	(Lourdault et al., 2011)

Факторы вирулентности могут быть открыты как экспериментально (с помощью транскриптомного анализа, например), так и методами биоинформатики– методами

предполагающими поиск генетических последовательностей, обладающих сходством с известными факторами вирулентности других видов (Adler et al., 2011). Однако, немногие факторы вирулентности, значение которых было впоследствии подтверждено экспериментально, были идентифицированы методами биоинформатики; среди них — каталазы, коллагеназы, гем-оксидазы и белок Mse (mammalian cell entry protein). Также, в геноме лептоспир были найдены гены сфингомиелиназ и фосфолипаз, а также протеаз и TlyABC-подобных гемолизин, которые являются кандидатами на роль факторов вирулентности, но их роль в инфекционном процессе еще не определена.

Примечательно, что у лептоспир не найдены системы, такие как системы секреции III, IV, VI типов, ответственные за транспорт эффекторов в клетки хозяина, хотя у большинства патогенных микроорганизмов присутствуют подобные системы, как одни из ключевых механизмов в вирулентности (Nascimento et al., 2004).

3.1 Подвижность как фактор вирулентности

Исследования связывают высокую подвижность патогенных штаммов *Leptospira* с вирулентностью и инвазивностью, так как эти свойства нехарактерны для сапрофитных форм *Leptospira*. Мутанты патогенных форм с отсутствием подвижности оказались неспособны вызвать заболевание у экспериментальных животных.

Подвижность, как предполагается, необходима для проникновения сквозь слизистую мембрану хозяина или для проникновения в ткани хозяина через повреждения кожи. Подробно оба этих механизма не изучены. Мутации аппарата подвижности (потеря крючкообразных концов, или полная потеря подвижности) приводят к серьезному снижению вирулентности, однако, точные причины снижения вирулентности остаются неизвестными.

Проникновение в ткани хозяина. Для заражения хозяина, лептоспиры должны проникнуть через множество барьеров, включая внеклеточный матрикс, базальные мембраны и слои клеток (Adler, de la Peña Moctezuma, 2010). Бактерии, судя по всему, используют разные механизмы проникновения. Один из ключевых механизмов проникновения лептоспир в ткани хозяина связан с подвижностью клеток (Picardeau et al., 2001).

Протеазы могут также играть определенную роль в проникновении через слои клеток. Трансцитоз через монослой эндотелиальных клеток вены пуповины человека (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) усиливается, когда лептоспиры покрыты плазмином или плазминогеном (Vieira et al., 2013). Это свидетельствует о использовании лептоспирами протеолитических механизмов для покрытия своих клеток белками хозяина. Мутанты по коллагеназе проявляли пониженную способность проникать через культуры клеток HUVEC и клеток почечных канальцев человека. В условиях *in vivo*, тот же мутант обладал пониженной способностью распространения в тканях хомяков, что свидетельствует в пользу того, что коллагеназа может участвовать в заражении хозяина (Kassegne et al., 2014).

В период распространения через кровь, патогенные лептоспиры, наиболее вероятно, связываются с эндотелием кровеносных сосудов под действием силы кровотока, а затем проникают через слой клеток в подлежащие ткани. Механизм, лежащий в основе этого явления, остается неизвестен.

Предполагается, что представители филы *Spirochaetae*, такие как *Treponema pallidum* (Thomas et al., 1988), пересекают слои клеток через клеточные контакты, а такие как *Borrelia burgdorferi*, сквозь клетки (Comstock, Thomas, 1989) или через клеточные контакты (Moriarty et al., 2008; Szczepanski et al., 1990). При использовании мышей как модельных объектов наблюдалось прохождение лептоспир через просвет между клетками почек (Marshall, 1976). Однако исследование трансцитоза лептоспир в культуре поляризованных клеток почек собак Мадин-Дарби доказали транзитное прохождение лептоспир сквозь клетки (Barocchi et al., 2002; Thomas, Higbie, 1990).

Лептоспиры стремительно проходят через клетки не вызывая никаких заметных нарушений клеточной целостности (Barocchi et al., 2002). Бактерии были обнаружены внутри клеток как свободно находящиеся в цитоплазме, так и окруженные мембранами хозяина. Многие патогенные микроорганизмы, такие как *Salmonella* spp. и *Yersinia* spp. попадают в клетки хозяев через взаимодействие с актином и миозином хозяина, приводящее к нарушениям клеточной архитектуры, в то время как лептоспиры оставляют клетки неповрежденными и не используют цитоскелет клеток.

Эти данные предполагают использование лептоспирами принципиально нового механизма клеточной инвазии, как способа преодоления слоев клеток. Необычно, что сапрофитные формы *L. biflexa* так же способны проходить через слои клеток, однако, не

так эффективно как патогенные формы. Возможно, способность к трансцитозу является следствием тонкой извитой формы бактериальной клетки и активной подвижности, а не результатом функционирования специфичного молекулярного механизма (Barocchi et al., 2002). Эксперименты с мутантами по подвижности могут помочь найти подтверждение этой теории.

3.2 Роль хемотаксиса в вирулентности лептоспир

У лептоспир в геноме присутствует большинство обнаруживаемых в других бактериях ключевых генов хемотаксиса, кодирующих 12 метил-акцепторных белков (Nascimento et al., 2004; Ren et al., 2003). Это означает, что лептоспиры реагируют на широкий спектр химических стимулов, хотя лиганды для каждого рецептора остаются неизвестными. Одним из предполагаемых аттрактантов является гемоглобин (Yugi et al. 1993), однако гемоглобин слишком большой, чтобы проникать через внешнюю мембрану и связываться с метил-акцепторными белками (Lambert et al., 2012b). Возможно, в этих экспериментах, бактерии реагировали на продукты разложения гемоглобина, которые значительно меньше размером и способны диффундировать через мембраны. Так, или иначе, эксперимент показал, что лептоспиры обладают положительным хемотаксисом по отношению к крови, что предполагает привлечение лептоспир к ранениям, где барьеры между тканями легче преодолеваются и проникновение в ткани и кровотока хозяина упрощено.

Другими хемоаттрактантами для лептоспир являются глюкоза, сахароза, пируват и Твин 80 (Lambert et al., 2012b). Твин 80 является синтетическим веществом, и привлечение лептоспир к нему *per se* не имеет значения. Хемотаксис по отношению к Твин 80 может означать, что бактерии могут двигаться по направлению к присутствующим в среде молекулам жирных кислот как к источнику питания, даже не смотря на то, что уровень триглицеридов в крови достаточно низкий (приблизительно 1 мМ). Также, не совсем ясно значение хемотаксиса лептоспир к глюкозе, так как лептоспиры не утилизируют этот углевод как источник энергии; кроме того, концентрация глюкозы в крови значительно ниже, чем та, что была использована в тесте на хемотаксис (5 мМ против 100 мМ).

Значение хемотаксиса в патогенезе лептоспироза плохо изучено. Мутанты по генам *cheB* и *cheX* не проявляли снижение вирулентности при интраперитонеальном инфицировании хомяков (Murphy et al., 2009a). Также, возможно, что хемотаксис перестает быть необходимым для возбудителей лептоспироза после проникновения в хозяина (Dong

et al., 2010). Для получения достоверных данных, мутантов необходима имитация естественных путей заражения опытных животных мутантными штаммами.

Можно предположить, что хемотаксис важен для тканевого тропизма и распространения по организму хозяина, однако, такие утверждения не имеют под собой материальной основы и требуют дальнейшего тщательного изучения, так как специфика распространения лептоспир в организме хозяина может быть следствием действия иммунной систем или других факторов.

3.3 Взаимодействие патогенных лептоспир с компонентами внеклеточного матрикса

Процесс адгезии к поверхностям хозяина является очень важным этапом патогенеза (Kline et al., 2009). В животных моделях, связь с микроворсинками проксимальных почечных канальцев была обнаружена у хомяков и овец, но, как правило, присутствие бактерий не приводило к выраженной клеточной патологии (Faine et al., 1999; Marshall, 1974). В моделях *in vitro*, наблюдалась адгезия к различным клеткам, включая клетки почек собак Мадин-Дарби и другие линии почечных клеток собак (Thomas, Higbie, 1990; Tsuchimoto et al., 1984), фибробласты мышей (Vinh et al., 1984), клетки эпителия почечных канальцев мышей (Ballard et al., 1998), HUVEC и эпителиальные клетки почек свиней (Thomas, Higbie, 1990). Эффективность адгезии коррелирует с вирулентностью штамма. Степень клеточной адгезии лептоспир снижалась после обработки монослоев клеток протеазами, что предполагает белковую природу рецепторов (Breiner et al., 2009; Thomas, Higbie, 1990). Клеточный фибронектин и глюкозаминогликаны являются потенциальными рецепторами хозяина, участвующими в связывании.

Внеклеточный матрикс является сложной смесью из фиброзных протеинов и других компонентов, таких как глюкозаминогликаны, которые поддерживают архитектуру тканей, вносят свой вклад в работоспособность клеток, их развитие, дифференцировку и подвижность. Компоненты внеклеточного матрикса включают в себя 28 типов коллагена, ламинин, фибронектин и гликопротеины (Batzios et al., 2013). Исследования лептоспир определили, что патогенные лептоспиры могут связываться с компонентами внеклеточного матрикса, включая фибронектин, коллаген, ламинин и гиалуроновую кислоту (Ito, Yanagawa, 1987). Адгезия клеток к внеклеточному матриксу усиливалась после инкубации лептоспир в условиях физиологической осмолярности, что

имитировало процесс проникновения возбудителя из внешней среды в ткани хозяина (Matsunaga et al., 2007).

В большинстве исследований, описывающих взаимодействие белков лептоспир с компонентами внеклеточного матрикса, использовались рекомбинантные белки в системах *in vitro*. Поэтому, экстраполяция результатов этих исследований на процессы, происходящие при естественном ходе заболевания, является непростой задачей (Lima et al., 2013). Многие белки лептоспир подвергаются различным пост-трансляционным модификациям, таким как гликозилирование, фосфорилирование, метилирование и протеолиз (Oliveira et al., 2011; Pinne et al., 2012). Рекомбинантные белки, получаемые от *E.coli*, таких модификаций, очевидно, не имеют или имеют иные модификации (Murray et al., 2013).

Часть белков-адгезинов патогенных лептоспир способна связываться только с единичными компонентами внеклеточного матрикса. Однако, отдельные белки и группы белков лептоспир обладают способностью связываться с множеством различных лигандов. Это позволяет разделить белки-адгезины на две категории — моновалентные и поливалентные адгезины в зависимости от их способности к связыванию с лигандами.

3.3.1 Моновалентные адгезины

Глюкозаминогликан-связывающие белки. Глюкозаминогликаны - неразветвленные, длинные полимеры, состоящие из дисахаридных мономеров, образованных аминасахарами и гексуроновыми кислотами. Глюкозаминогликаны формируют часть внеклеточного матрикса и связываясь с белками становятся частью протеогликанов, которые располагаются на поверхности клеток. Лептоспиры связывается с глюкозаминогликанами, с сульфатом хондроитина В и С, через специфические неизвестные рецепторы (Breiner et al., 2009). В отсутствие глюкозаминогликанов также наблюдается значительное связывание с клетками хозяина, что предполагает существование дополнительных мишеней адгезии (Ching et al., 2012).

Фибронектин-связывающие белки. Фибронектин присутствует во внеклеточном матриксе как один из основных компонентов, так и в растворимой форме в плазме. Большое количество лептоспир проявили фибронектин-связывающие свойства в опытах *in vitro* (Moriarty et al., 2012).

Определение фибронектин-связывающих белков показало, что различные методы анализа могут не всегда между собой соответствовать. Merien et al., (2000) обнаружил в лептоспирах фибронектин-связывающий белок; в последующих исследованиях были обнаружены более 30-ти подобных белков (Pinne et al., 2012). При анализе белковой матрицы, состоящей из 401 белка внешней мембраны лептоспир, на наличие в ней фибронектин-связывающих белков, из 15 наиболее часто встречающихся фибронектин-связывающих белков, только один (Lsa66) был охарактеризован ранее (Pinne et al., 2012). Известные белки, такие как LigB и LipL32, были, соответственно, на 34-ом и 169-ом месте по степени сродства к с фибронектином. Однако, связывание с фибронектином было подтверждено лигандным блоттингом только для шести из 15 наиболее встречаемых белков (Pinne et al., 2012).

Ламинин-связывающие белки. Ламинин является важным компонентом базальных мембран эпителиальных и эндотелиальных поверхностей. Способность к связыванию с ламинином может усиливать способность лептоспир к проникновению сквозь слои клеток. Многие адгезины лептоспир проявили способность к связыванию с ламинином при опытах *in vitro* (Stevenson et al., 2007). Одной из таких групп адгезинов является группа белков-паралогов семейства Len — все Len-белки в разной степени обладают сродством к ламинину.

Эластин-связывающие белки. Идентифицированными белками, обладающими способностью к связыванию с эластином, являются белки LigB, OmpL37 и OmpL47 (Lin et al., 2009; Pinne et al., 2010). Нити эластина, состоящие из растворимого белка тропоэластина, придают эластичность тканям, и могут быть обнаружены в разнообразных органах и тканях, включая легкие, кожу, артерии, уретру и плаценту. Лептоспиры взаимодействуют со многими из вышеперечисленных тканей, следовательно, эластин-связывающие свойства белков LigB, OmpL37 и OmpL47 могут проявляться как на начальных этапах заболевания (во время проникновения лептоспир в ткани хозяина), так и в поздних, вызывая повреждения тканей легких и эндотелия сосудов и внутренние кровотечения. Белок LigB также связывается с тропоэластином, предположительно ингибируя восстановление тканей, предотвращая образование нитей эластина (Lin et al., 2009).

Примечательно, что белок OmpL37 обладает высоким сродством к эластину кожи хозяина, а антитела к этому белку, не только не блокируют связывание OmpL37 с

эластином, а напротив, усиливают его (Pinne et al., 2010). На связывание адгезина OmpL37 с другими белками внеклеточного матрикса, антитела влияния не оказывают.

Фибриноген-связывающие белки. Охарактеризованы многочисленные фибриноген-связывающие белки, такие как LigB, Lsa33, LIC12238, LIC11975 и OmpL1, которые показали способность к ингибированию тромбин-катализируемого формирования фибрина *in vitro* (Choy et al., 2011; Lin et al., 2011; Oliveira et al., 2013). Для лептоспироза характерны тромбоцитопения, геморрагия и повреждение кровеносных сосудов. Некоторые из этих патологий могут быть объяснены способностью лептоспир к связыванию с фибриногеном (Choy et al., 2007) с последующим ингибированием формирования нитей фибрина (Oliveira et al., 2013). Однако, роль этих белков в течении болезни не подтверждена, и мутанты по этим белкам сохраняют свою вирулентность.

Примечательно, что фибриноген-связывающие белки других бактерий, такие как SdrG (фибриноген-связывающий белок *Streptococcus epidermidis*), полностью ингибируют формирование фибрина, в отличие от белков лептоспир (Davis et al., 2001). Это может означать, что фибриноген-связывающие белки лептоспир более важны как белки-адгезины, или функционируют совместно, дополняя друг друга. Белок LigB связывается с коллагеном III, фибронектином фибробластов и тропоэластином — белками задействованными в регенерации тканей. Это может позволять лептоспирам прикрепляться к свежим ранениям для изначальной колонизации организма (Choy et al., 2011; Lin et al., 2009).

Необходимо отметить, что в одном исследовании клетки сапрофитной *L. biflexa* (серовар Patoc) также проявляли способность к связыванию с фибриногеном. Эффективность связывания составляла 75% от эффективности, наблюдаемой у патогенных штаммов лептоспир (Oliveira et al., 2013). Фибриноген-связывающий белок сапрофитной *L. biflexa* способен ингибировать тромбин-зависимое формирование нитей фибрина в той же степени, что и патогенные штаммы. Это открытие ставит под вопрос связь между связыванием фибриногена *in vitro* и процессами патогенеза.

Плазминоген-связывающие белки. Лептоспиры способны связываться с плазминогеном *in vitro*; связанный плазминоген может быть превращен в плазмин в присутствии урокиназного плазминового активатора. В моделях *in vitro* плазмин, связанный с лептоспирами, разрушает компоненты внеклеточного матрикса, такие как фибронектин и фибриноген человека, и может активировать матричные металлопротеазы

хозяина (Lähteenmäki et al., 2001), которые, в свою очередь, могут вызывать разрушение тканей. Покрытые плазмином лептоспиры также более эффективно пересекают монослой эндотелиальных клеток вены пуповины человека, чем не связанные с плазмином лептоспиры, однако точные механизмы этого явления не изучались подробно.

Все эти данные говорят о том, что плазмин, связанный с поверхностью лептоспир, упрощает прохождение возбудителей через внеклеточный матрикс, тканевые барьеры, а также разрушение фибрина, приводя в итоге к распространению микроорганизмов внутри хозяина.

У лептоспир охарактеризовано большое количество рецепторов плазминогена. Белок-адгезин LenA связывает плазминоген и превращает его в плазмин. В лептоспирах обнаружена энолаза — плазминоген-связывающий белок, также характерный для других патогенных микроорганизмов. Для энолазы лептоспир характерна как секреция этого белка в окружающую среду, так и ассоциация белка с клеточной поверхностью микроорганизма.

Более десятка дополнительных рецепторов, включая LipL32, связываются с плазминогеном и делают возможным его превращение в активный плазмин в присутствии урокиназного плазминового активатора (Verma et al., 2010a; Vieira et al., 2009). Однако, имеет место недостаток доказательств поверхностного расположения этих рецепторов, а также значения и эффективности плазминоген-связывающих белков в моделях *in vivo*.

3.3.2 Поливалентные адгезины

Некоторые белки лептоспир способны связываться со значительным числом различных белков хозяина, что потенциально может иметь значение в разнообразии аспектов патогенеза. Подобные белки не уникальны для лептоспир и часто встречаются среди спирохет. Например, белок OppA бактерии *Treponema denticola* связывается как с плазминогеном, так и с фибронектином (Fenno et al., 2000). Еще один белок этого микроорганизма — Msp, связывается с фибронектином, кератином, ламинином, коллагеном первого типа, фибриногеном, гиалуроновой кислотой и гепарином (Edwards et al., 2005).

Подобные белки встречаются не только среди спирохет, например, для *Staphylococcus aureus* характерно наличие белка Emp, взаимодействующего с фибронектином, фибриногеном, коллагеном и витронектином (Hussain et al., 2001).

Lig-белки. Lig-белки лептоспир – группа из трех белков – LigA, LigB и LigC, входящих в семейство бактериальных белков, несущих иммуноглобулин-подобные домены (англ., bacterial immunoglobulin (Ig)-like domains, Big), содержащих 12-13 иммуноглобулин-подобных повторов (Matsunaga et al., 2003; Palaniappan et al., 2002). Bigs-белки, такие как интимин *E.coli* и инвазин *Yersinia pseudotuberculosis*, являются посредниками в процессах адгезии и инвазии клеток хозяина (Hamburger et al., 1999; Luo et al., 2000). Ген *ligA* обнаружен в *L. interrogans*, *L. kirschneri* и *L. santarosai*, но до сих пор неизвестно, встречается ли этот ген во всех сероварах и штаммах. Белок LigA - один из немногих многообещающих кандидатов в мишени для вакцин. Для тестовых вакцин, использующих в качестве мишени адгезин LigA, статистически была показана эффективность в защите от острого лептоспироза.

Судя по всему, ген *ligA* появился в процессе эволюции в результате частичной дубликации гена *ligB* (McBride et al., 2009). Ген *ligB* широко распространен среди патогенных лептоспир, и у многих штаммов присутствует только ген *ligB*, что позволяет предположить, что, возможно, только его достаточно для реализации патогенных свойств лептоспир. Ген *ligC* более распространен, чем *ligA*, однако он является псевдогеном для многочисленных штаммов, которые сохраняют вирулентность в случае его мутации, что свидетельствует о том, что ген *ligC* не является необходимым атрибутом патогенности у этих штаммов (Cerqueira et al., 2009; McBride et al., 2009). Ген *ligC* малоизучен и функционально не охарактеризован.

Многие факты свидетельствуют о том, что Lig-белки являются факторами вирулентности. Экспрессия *lig*-генов увеличивается при повышении осмолярности среды культивирования до физиологически нормальной (то есть, при условиях, имитирующее попадание возбудителя из внешней среды в организм хозяина) (Choy et al., 2007). Продолжительное выращивание культуры лептоспир *in vitro* приводит к полному снижению экспрессии *lig*-генов, коррелируя с потерей вирулентности (Matsunaga et al., 2003).

Белки LigA и LigB, обладая сродством к разным белкам хозяина, могут иметь важное значение в процессе патогенеза, связываясь с белками внеклеточного матрикса на

разных стадиях заболевания (Choy et al., 2011). Lig-белки также связываются с регуляторными белками системы комплемента и могут участвовать в повреждении тканей хозяина, блокируя факторы регенерации ранений — фибриноген и компоненты матрикса. При экспрессии *ligA* или *ligB* в сапрофитных штаммах *L. biflexa*, полученные штаммы проявляли повышенную, по сравнению с дикими типами, способность к связыванию с некоторыми компонентами внеклеточного матрикса (фибронектин и ламинин) без изменения способности связывания с другими компонентами (Figueira et al., 2011; Lin et al., 2010; Toma et al., 2014).

Однако, прямых доказательств неотъемлемой роли Lig-белков в процессах патогенеза, как и доказательств обратного, на данный момент не получено, так как исследование мутантов по всем трем Lig-белкам *in vivo* не проводилось. У серовара Lai отсутствует ген *ligA*, но имеются гены *ligB* и *ligC*, и сохраняется вирулентность (Ristow et al., 2007). Мутант *L. interrogans* серовара Copenhageni по гену *ligB* также сохраняет свою вирулентность, однако этот штамм имеет ген *ligA* (для этого штамма ген *ligC* является псевдогеном) (Croda et al., 2008). Аналогично, *ligC*-мутант *L. interrogans* серовара Manila сохраняет способность вызывать заболевание, но, при этом, в геноме мутанта присутствовали гены *ligA* и *ligB* (Murray et al., 2009a). Учитывая обширное количество субстратов хозяина, с которыми взаимодействуют Lig-белки, наиболее вероятно, что, как минимум, один Lig-белок необходим лептоспирам для индуцирования заболевания.

Len-белки. В патогенных лептоспирах была обнаружена группа из шести белков схожих с эндостатинами человека. Все Len-белки связываются с фибронектином и ламинином. Белок LenA (другое название – LfhA/Lsa24) также связывается с плазминогеном, H-фактором и с H-фактор связанным белком (Verma et al., 2006, 2010a). Мутанты по генам *lenB* и *lenE* сохраняют свою вирулентность, но это вполне объяснимо, учитывая функциональную избыточность этих белков (Murray et al., 2009a).

LipL32-белок. Белок LipL32, (другое название – Nap1), является преобладающим компонентом внешней мембраны лептоспир (Naake et al., 2000), и наиболее многочисленным белком лептоспир: в одной клетке число его молекул может достигать 38000 копий (Malmstrom et al., 2009). Такие факторы, как избыток белка LipL32, высокая степень консервативности этого белка у патогенных и условно-патогенных лептоспир вместе с его отсутствием в сапрофитных формах и доказательствами его экспрессии *in vivo*, делают белок LipL32 одним из наиболее вероятных факторов вирулентности (Murray,

2013). Ранее упомянутая связь белка LipL32 с гемолизом не нашла подтверждения (Lee et al., 2000), однако исследования с использованием рекомбинантного белка LipL32 показали его способность к связыванию с различными субстратами, включая ламинин, коллаген (I, IV и V типов), а также фибронектин (Hoke et al., 2008). Примечательно, что результаты исследования способности белка LipL32 к связыванию с ламинином и коллагеном I неоднозначны: способность к связыванию LipL32 с белками хозяина достаточно слабая, однако, это может компенсироваться значительным количеством молекул белка на поверхности клетки (Vivian et al., 2009). Также, была доказана способность белка LipL32 связываться с плазминогеном (Vieira et al., 2010a).

Несмотря на все свидетельства значимости белка LipL32 для вирулентности лептоспир, мутанты по этому белку сохранили свою вирулентность, как в острой форме заболевания, так и в хронической (Murray et al., 2009c). Отсутствие аттенуации может быть вызвано функциональной избыточностью других белков, которые проявляют те же способности к связыванию с определенными субстратами, что и белок LipL32.

Примечательно, при том, что белок LipL32 характерен только для патогенных и условно-патогенных форм, в непатогенных микроорганизмах, не входящих в род *Leptospira*, обнаружены ортологи белка LipL32, например у *Pseudoalteromonas tunicata* (Hoke et al., 2008). Возможно, это является свидетельством неизвестной функции LipL32, необходимой для выживания лептоспир в естественной среде и попадании из нее в хозяина - два аспекта, не рассматриваемые в существующих на данный момент модельных системах. Более того, последние исследования с использованием методов иммунофлуоресценции поверхностного протеолиза предполагают, что LipL32 может и не иметь доменов на поверхности клеток (Pinne, Naake, 2013). Это может объяснить отсутствие эффекта при иммунизации белком LipL32 (Murray, 2013).

3.3.3 Факторы вирулентности с неизвестной функцией

Разработка метода транспозонного мутагенеза для патогенных лептоспир позволила получить мутанты с охарактеризованными точками инсерции транспозона (Murray et al., 2009a). Тестирование полученных мутантов *in vivo* выявило было обнаружено значительное количество факторов вирулентности, однако их функция и значение остаются неизвестными.

Loa22. Белок Loa22 является предполагаемым липопротеином с OmpA-доменом, характерным для OmpA семейства белков наружной мембраны многих грамотрицательных бактерий, и с пептидогликан-связывающим доменом (Ristow et al., 2007). Наличие двух доменов позволяет предположить, что Loa22 может взаимодействовать с пептидогликановым слоем и иметь активные домены на поверхности клетки микроорганизма. Белок Loa22 также является одним из первых факторов вирулентности, идентифицированных с помощью мутагенеза и последующим тестированием мутанта в моделях *in vivo* (Ristow et al., 2007).

Мутант по гену *loa22* проявлял пониженную вирулентность в морских свинках и в хомяках, однако вирулентность частично восстановилась при комплементации. У морских свинок, инфицированных мутантом по гену *loa22*, не обнаруживались вовсе или обнаруживались незначительные патологии тканей, но при этом на третий день проявлялась бактериемия. На 21-ый день, по окончании эксперимента, у морских свинок была обнаружена колонизация почек лептоспирами. Уровень аттенуации мутанта по гену *loa22* достаточно умеренный, учитывая, что при инфицировании дозой 10^8 клеток/мл не все животные в контрольной группе погибли (Ristow et al., 2007). Умеренная аттенуация может быть причиной использования штамма *L. interrogans* 56601 серовара Lai, изначально имевшего пониженную вирулентность.

Функция белка Loa22 остается неизвестной. Учитывая, что белок Loa22 - второй по встречаемости белок в клеточной стенке лептоспир после липопротеина LipL32, он может играть структурную роль, напрямую не связанную с вирулентностью.

Поверхностное расположение OmpA-доменов белка Loa22 предполагает возможность его прямого взаимодействия с белками или структурами хозяина – у многих патогенных микроорганизмов, OmpA-домены выполняют функцию адгезинов к поверхностным и внеклеточным белкам хозяина. Белок Loa22 обладает умеренной способностью к связыванию с фибронектином плазмы и коллагеном типов I и IV (Confer, Ayalew, 2013).

Рекомбинантный белок Loa22 проявлял цитотоксические свойства при испытании его на культуре клеток почечных канальцев крыс и вызывал в них воспалительную реакцию через TLR2-рецепторы, даже при отсутствии липидации белков (Zhang et al., 2010).

Белки сOmpA-доменами обладают широким разнообразием вирулентных свойств, включая усиление инвазивных свойств, избегание иммунной защиты хозяина, как системы комплемента (через связывание с регуляторными белками системы комплемента), так и антимикробных пептидов (Confer, Ayalew, 2013).

LruA. Белок LruA – липопроtein, консервативный для различных классов лептоспир и содержащий в себе LysM-домен, предполагающий способность к связыванию с пептидогликанами. При том, что липопроtein LruA частично находится на поверхности клетки (Zhang et al., 2013), большая его часть остается в связанной форме после экстрагирования TritonX 114 (Verma et al., 2005), что предполагает или необычную мембранную топологию, или многочисленные цитоплазматические домены. Несмотря на необычность явления, липопротеины с многочисленными цитоплазматическими доменами описываются в литературе (Michel et al., 2013). Белок LruA является возможным индуктором аутоиммунного ответа, вызывающего острые увеиты: антитела к белку LruA перекрестно реагируют с белками линз глаза – α -кристаллином и виментином (Verma et al., 2010b).

Мутанты по гену *lruA* проявляют умеренную аттенуацию – инфицирование хомяков дозой в 100 раз превышающей предполагаемую для родительского штамма серовара *Manilae* LD₅₀, привело к смерти 10% экспериментальных животных (Zhang et al., 2013). Примечательно, что мутант с незначительным повреждением гена (усечение Δ 525-556) сохранил свою вирулентность, что позволяет предположить отсутствие функциональных доменов в карбоксильном конце белка.

Механизм аттенуации мутантов по гену *lruA* неизвестен, но может быть связан с взаимодействием продукта этого гена с белком сыворотки крови хозяина – аполипопротеином А-I. Аполипопротеин А-I участвует в транспорте липидов, но также может участвовать в процессах воспаления во время сепсиса (Guo et al., 2013). Мутанты по гену *lruA* значительно интенсивнее связываются с аполипопротеином А-I, чем лептоспиры дикого типа, однако, значение этого феномена еще до конца не выяснено, так как эта мутация никак не повлияла на уязвимость возбудителей к комплементу сыворотки крови (Zhang et al., 2013).

Учитывая, что LruA является липопроteinом, и поэтому может находиться в клеточной стенке, а также связывается с пептидогликанами, он может иметь структурную функцию, напрямую несвязанную с вирулентностью.

Липополисахариды (ЛПС). Лептоспиры имеют необычно большой локус синтеза липополисахаридов, состоящий приблизительно из 100 генов, расположенных на одной нити ДНК (Bulach et al., 2006; Nascimento et al., 2004; Ren et al., 2003). Структура ЛПС неизвестна, так же как и роль индивидуальных белков в их синтезе. При исследовании *L. interrogans* методом мутагенеза, было получено относительно небольшое число мутантов с повреждениями локуса, кодирующего синтез ЛПС, что говорит о важности их значения в биологии лептоспир (Murray et al., 2009a).

Для многих патогенных микроорганизмов липополисахариды имеют ключевое значение для вирулентности. Два мутантных штамма лептоспир с модифицированными ЛПС при моделировании острой формы заболевания на животных имели высокую степень аттенуации даже при очень высоких дозах заражения (10^7 клеток/мл, что в 10^6 больше, чем предполагаемая LD_{50} для родительского штамма) (Murray et al., 2010; Srikrum et al., 2011). Никаких патологических процессов и симптомов заболевания у экспериментальных животных не было диагностировано. Первый мутант (M895) нес мутацию в гене с неизвестной функцией, вызывавшую синтез укороченной молекулы ЛПС. Липополисахариды второго мутанта не имели очевидных изменений в молекулярной массе, но имели иную реакцию антител хозяина с липополисахаридами. Последующий биоинформационный анализ показал, что ген, по которому произошла мутация, кодирует не ЛПС, а метилтрансферазу LIC12133-семейства. Это объясняет отсутствие изменения молекулярной массы липополисахаридов второго мутанта. Оба мутантных штамма также не были способны вызвать хроническую форму заболевания у мышей (Marcsisin et al., 2013). Точный механизм аттенуации остается неизвестным, но ослабление вирулентности определенно не было вызвано повышением уязвимости к комплементу сыворотки крови (Murray et al., 2010).

Бактериальный шаперон HtpG. Бактериальный шаперон HtpG является гомологом эукариотического шаперона Hsp90 и обладает важной функцией – обеспечение формирования правильной третичной структуры белков в условиях теплового шока, оксидативного стресса и при нахождении внутри макрофагов (Dang et al., 2011; Weiss et al., 2007). Мутант лептоспиры по гену *htpG* (другие названия – *lb058/lic20044*) имел высокую степень аттенуации при инфицировании им хомяков: животные выживали при введении им дозы, в 10^6 раз превышающую LD_{50} для родительского штамма (King et al., 2014). Экспериментальные животные имели пониженную концентрацию возбудителя в тканях, хотя, мутант по гену *htpG* по-прежнему был способен вызывать хроническую стадию

инфекции, вдобавок, у инфицированных хомяков были диагностированы микроскопические и макроскопические патологии. Вирулентность мутанта по гену *htpG* полностью восстанавливалась после комплементации.

Механизм аттенуации мутанта лептоспиры по гену *htpG* неизвестен, так как бактерии не проявили повышения уязвимости к физическим и химическим стрессовым факторам (тепловой шок, осмолярный и оксидативный стрессы). Другой шаперон — ClpB — участвует в формировании резистентности лептоспир к тепловому шоку и оксидативному стрессу (Lourdault et al., 2011). Паралог шаперона *htpG* (другое название — LA1231/LIC12469), закодированный в геноме лептоспир, тоже может вносить свой вклад в формирование резистентности к вышеуказанным стрессовым факторам окружающей среды, однако, мутант по этому гену полностью сохранил свою вирулентность (King et al., 2014). Очень сложно предположить значение бактериального шаперона HtpG для вирулентности лептоспир, так субстраты для этого шаперона плохо изучены (Buchner, 2010). Нарушение работы гена *htpG* может привести к модуляциям в экспрессии факторов вирулентности, и дальнейшее изучение этого мутанта может позволить идентифицировать как новые механизмы вирулентности, так и полностью охарактеризовать уже известные.

Другие факторы вирулентности. Мутанты по генам *lb194*, *la2786* и *la0589* (функция продуктов этих генов неизвестна) были не способны к колонизации почек мышей (Marcsisin et al., 2013). Ген *lb194* расположен в одном локусе с HbrA (гемин-связывающий TonB-зависимый рецептор) как в патогенных, так и в сапрофитных лептоспирах. Продукт гена *lb194* может быть вовлечен в утилизацию железа, так как регуляция этого гена происходит при низкой концентрации железа в окружающей среде. Регуляция гена *LA2786* также происходит при низкими концентрациями железа в окружающей среде (Lo et al., 2010).

Белок LA0589 - один из двенадцати паралогичных белков, кодируемых в геноме лептоспир и имеющих очень сильное сходство между собой. Эти гены активно регулируются в моделях *in vivo* и точечные мутации в паралогах *la3490* и *la3388* были идентифицированы в штаммах лептоспир с вирулентностью, ослабленной вследствие длительного культивирования в лабораторных условиях (Lehmann et al., 2013). Примечательно, что подобные группы паралогичных белков были обнаружены у *Bartonella* spp. Дальнейшие исследования требуются для установления точной роли этих белков в процессах заражения и патогенеза.

4. Патогенез, индуцируемый лептоспирами

Молекулярные основы патогенеза *Leptospira*, несмотря на многочисленные исследования последних лет, по-прежнему остаются мало охарактеризованными. У *Leptospira* отсутствуют характерные для других известных патогенных микроорганизмов факторы патогенности, вследствие значительного филогенетического расстояния между лептоспирами и другими изученными бактериальными патогенами. У патогенных лептоспир обнаружены сотни генов с неизвестной функцией, которые предположительно кодируют факторы вирулентности. Среди факторов вирулентности лептоспир нет гомологов белков с известной функцией (Adler et al., 2011). Это может означать, что патогенные лептоспиры обладают уникальными молекулярными механизмами, лежащими в основе патогенеза.

Заражение человека происходит при контакте с контаминированной внешней средой (вода и почва) или животными (моча, животные ткани). Бактерии проникают через слизистые мембраны или проникают через мокрую или поврежденную кожу. Однако, молекулярные механизмы, используемые при этом, остаются неизвестными.

Лептоспирам требуется достаточно простой, по сравнению с другими патогенными микроорганизмами, набор питательных веществ, включающий в себя железо, аммиак, витамины группы В и длинноцепочечные жирные кислоты как источник энергии. У лептоспир предполагается наличие около двенадцати TonB-зависимых рецепторов, которые могут быть ответственны за активный транспорт питательных веществ внутрь микроорганизма. Однако, очень мало известно о самих субстратах для этих рецепторов.

Длинноцепочечные жирные кислоты для β -окислительного пути могут получены лептоспирами путем деградации мембран клеток хозяина фосфолипазами и сфингомиелиназами. Сфингомиелиназы катализируют гидролиз сфингомиелина до церамида и фосфорилхолина, которые могут вызывать гемолиз и повреждение тканей хозяина. У *L. interrogans* предполагают наличие пяти сфингомиелиназ (Sph1, Sph2, Sph3, Sph4, SphH), а у *L. borgpetersenii* – трёх (SphA, SphB, Sph4), при этом только у SphA и Sph2 есть полные каталитические сайты. На культурах клеток была показана сфингомиелиназная активность ферментов SphA и Sph2, при этом Sph2 обладал цитотоксическим эффектом. Активность других сфингомиелиназ изучена в меньшей степени.

Лептоспирам требуется железо для роста и развития. В организме хозяина железо в свободной форме встречается исключительно редко, вследствие очень быстрого окисления под давлением физиологических условий, а также вследствие секвестрирования свободной формы железа железосвязывающими белками, особенно для защиты от патогенных микроорганизмов в течении болезни.

Большая часть железа (74%) находится в связанной форме в геме гемоглобина. Гемоглобин, как единственный источник железа, вполне достаточно, чтобы покрыть требования лептоспир в этом микроэлементе. In vivo, лептоспиры могут получать доступ к гемоглобину лизируя эритроциты сфингомиелиназами. В геноме лептоспир присутствуют ортологи генов *tlyA*, *tlyB* и *tlyC* кодирующих гемолизины бактерии *Brachyspira hyodysenteriae*, но у белков TlyB и TlyC гемолитическая активность не обнаружена.

Эффективное использование гемоглобина требует наличие оксидазы гема для извлечения железа из тетрапиролового кольца и последующего использования микроэлемента лептоспирами. Мутанты по оксидазе гема умеренно аттенуировались при острой форме заболевания, что подтверждает важность гема как источника железа in vivo. У *L. interrogans* описан один механизм импорта гема внутрь клетки. Белок HbrA является TopB-зависимым рецептором, который связывается с гемом и отвечает за его транспорт внутрь клетки. Мутант по HbrA был не способен вызвать лептоспироз мышей, хотя сохранил свою вирулентность по отношению к хомякам. Была обнаружена способность белка LipL41 связываться с гемом, но данные касательно это потенциальной функции противоречивы.

4.1. Индукторы патогенеза

Для лептоспироза характерно проявление разнообразных симптомов, включая васкулит, острую почечную недостаточность, желтуху, тромбоцитопению, легочную геморрагию, миокардиты, увеиты и конъюнктивальные кровоподтеки (рис. 4).



Рис. 4. Стадии инфекционного процесса, предполагаемые детерминанты вирулентности и механизмы индукции патогенеза (цит. по Adler, 2015).

Механизмы, приводящие к появлению этих повреждений окончательно не известны. Повреждения небольших кровеносных сосудов могут приводить к ишемии и дисфункции многих органов, в том время, как циркулирующие в кровотоке токсические клеточные компоненты или иные неизвестные токсины бактериальных клеток могут приводить к повреждению тканей.

4.1.1 Белки

Повреждение целостности тканей может быть вызвано активностью сфингомиелиназ и фосфолипаз лептоспир. В геноме лептоспир также кодируются многочисленные протеазы, способные вызывать повреждения тканей хозяина

(коллагеназы, металлопротеазы и другие протеазы). Важность для вирулентности большинства этих ферментов остается неизвестной и требует дальнейшего изучения.

Проведенные исследования показали, что мутант по коллагеназе имел умеренно сниженную вирулентность при инфицировании хомяков (двадцатипятикратное увеличение LD_{50} для родительского штамма). Необходимо отметить, что испытуемый штамм изначально имел высокую LD_{50} – приблизительно 10^6 возбудителей на 1 мл. Для этих мутантов также было характерно снижение распространения бактерий в тканях хозяина, а также уменьшение степени их повреждения, хотя неизвестно, является ли пониженная степень повреждения тканей результатом потери коллагеназной активности.

Активирование протеаз хозяина, таких как плазмин и металлопротеазы, может также способствовать повреждению тканей и распространению лептоспир внутри организма хозяина. Геморрагии могут быть результатом комбинации повреждения тканей, нарушения механизмов гемостаза и регенерации повреждений.

Lip-и Loa-белки. Патологические процессы в почках связаны с интерстициальным нефритом и клеточными инфильтратами содержащими нейтрофилы и моноциты, что предполагает воспалительные процессы в основе патологий почек. Экстракты белков мембран лептоспир вызвали воспалительные процессы в культуре клеток почечных канальцев мышей через активацию тол-подобных рецепторов TLR2 (англ., Toll-like receptor, TLR) - такая активность может иметь значение в развитии интерстициального нефрита (Murrey et al., 2009c). Было обнаружено, что белок LipL32 имеет большое значение для пирогенеза, активируя TLR2-рецепторы. Однако, эти эксперименты были поставлены с использованием экстрагированных белков из клеток, полученных в условиях *in vitro*. В условиях *in vivo* роль белка LipL32 в активации TLR2-рецепторов менее очевидна, так как в полноценных, не измененных продолжительным культивированием *in vitro*, организмах липопротеин LipL32 может не иметь доменов на поверхности клеток. Хомяки, зараженные LipL32-мутантами, имели те же патологии почек, что и хомяки, зараженные лептоспирами дикого типа, что свидетельствует о значении других процессов в развитии патологии почек. Предполагается, что белок внешней мембраны Loa22 был вовлечен в индуцирование процессов некроза в культуре крысиных клеток почечных канальцев и воспалительной реакции (Murrey et al., 2009c).

Недавно описанный альтернативный механизм индуцирования воспалительного процесса предполагает ингибирование Na/K-аденозинтрифосфатазы неизвестным

гликолипопротеином лептоспир, что вызывает активацию NLRP3 инфламмосомы — мультимерного белкового комплекса, участвующего в развитии воспалительных реакций. Ингибирование Na/K-аденозинтрифосфатазы также может способствовать возникновению нарушений в легких и дисфункции почек, приводя, в итоге, к гипокалемии.

LguA-белки. Увеиты являются еще одним осложнением лептоспирозной инфекции, которое может возникать через недели или даже годы после начала заболевания. Увеиты могут возникать в результате нарушения иммунных механизмов в сочетании с воспалением и аутоиммунными процессами. В глазах пациентов больных увеитом были обнаружены перекрестные антитела, включающие в себя антитела к белку лептоспир LguA, которые также реагируют с белками линз α -кристаллином и виментином, и антитела к белку лептоспир LguB, реагирующие с белком сетчатки глаза β -кристаллином B2.

4.1.2 Липополисахариды

Лихорадка является одним из ключевых симптомов лептоспироза, и многие патологии, ассоциируемые с заболеванием, могут быть результатом воспаления. Воспаление может вызываться непосредственно бактериальными факторами, а также может быть результатом повреждения тканей, так как сами по себе липополисахариды лептоспир имеют значительно сниженные, по сравнению с ЛПС других патогенных бактерий, пирогенные свойства.

Экстракты липополисахаридов, введенные кроликам, не проявляли пирогенных свойств в дозах до 5 мкг/кг и имели сниженную активность в пробе Лимулюса. При введении мышам, экстракты липополисахаридов имели в 500 раз меньшую LD₅₀, по сравнению с липополисахаридами *Salmonella typhimurium*. Однако, экстракты гликолипопротеинов (включающие полисахариды, липиды и белки) обладают цитотоксическими свойствами. Низкая токсичность липополисахаридов возможно определяет способность лептоспир достигать такой высокой численности *in vivo* и является следствием необычной структуры липида А. Необходимо отметить, что биологические свойства липополисахаридов лептоспир исследовались с использованием штаммов, выращиваемых в условиях *in vitro* – вполне возможно, что липополисахариды модифицируются *in vivo*, приобретая иные пирогенные свойства. Также, липополисахариды лептоспир детектируются через TLR2-рецепторы в человеческих макрофагах (а не через TLR4-рецепторы, что достаточно необычно), и через TLR2 и TLR4

— в культивируемых линиях клеток мышей, что может объяснять различия течения и исхода лептоспироза у разных видов хозяев.

4.2. Персистенция лептоспир в органах и тканях

На начальных стадиях лептоспироза основное значение имеет фагоцитарный иммунитет, в то время как на более поздних стадиях заболевания начинает эффективно действовать приобретаемый гуморальный иммунитет. Несмотря на то, что врожденный иммунитет против лептоспироза почти не встречается у различных видов животных, он может быть передан посредством сыворотки крови. Однако, защитная система гуморального иммунитета направлена против липополисахаридов и, таким образом, является серовароспецифичной. Исследования показали многочисленные необычные взаимодействия между лептоспирами и иммунной системой хозяев, которые могут иметь большое значение в процессах патогенеза и способности лептоспир вызывать заболевание.

На ранних стадиях заболевания, лептоспиры обнаруживаются в крови на протяжении двух недель, что показывает их высокую резистентность к комплементу сыворотки крови. Резистентность к комплементу является одним из признаков, отличающих сапрофитные формы от патогенных. Отличие между патогенными и сапрофитными формами проявляется в разнице выделения центрального компонента каскада — C3, что коррелирует со способностью патогенных форм связываться с фактором H регуляторных белков системы комплемента и с C4-связывающим белком (Faine et al., 1999).

Последствиями ингибирования комплементарного каскада является не только снижение лизиса бактериальных клеток, но также потенциальное снижение задействования и активирования фагоцитов (через снижение выделения анафилотоксинов C3a и C5a) и снижение опсонофагоцитозам (через C3b рецепторы фагоцитов) (Faine et al., 1999).

Многочисленные белки лептоспир обладают способностью связываться с растворимыми регуляторами фактора H сывороточной резистентности (и связанными с их функцией белками) и C4-связывающим белком. Большая часть данных о способностях к связыванию была получена с использованием рекомбинантных белков (Faine et al., 1999), поэтому, для более ясного представления о роли этих белков в резистентности к

сыворотке, необходимо провести дополнительные исследования. Например, может ли связывание с соответствующим белком быть ингибировано (антителами или лигандными пептидами), таким образом, усиливая чувствительность к комплементу, или же мутанты по этому фактору будут иметь повышенную чувствительность к сыворотке?

На данный период времени была показана только частичная резистентность лептоспир к компонентам сыворотки при экспрессии *ligB* в *L. biflexa* (Faine et al., 1999).. В случае с белками, связывающимися с компонентами внеклеточного матрикса, точное взаимодействие белков с компонентами системы комплемента требует дальнейшего изучения. Мутанты по генам, кодирующим белок LenB (который связывается с фактором H) и LigB (который связывается с фактором H и C4-связывающим белком) сохранили свою вирулентность, свидетельствуя о том, что эти белки не являются принципиально важными для течения заболевания.

При альтернативных стратегиях резистентности лептоспир к сыворотке, лептоспиры могут инактивировать компоненты системы комплемента с помощью протеаз. Исследования показали снижение выделения C3b вызванное плазмином и следующую из этого повышенную выживаемость бактерий в сыворотке, в то время как выделяемые лептоспирами протеазы вызывали разрушение компонентов системы комплемента. Также, есть доказательства (Chou, 2012) того, что лептоспиры могут синтезировать сиаловую кислоту и родственные ей сахарокислоты, которые могут быть добавлены к поверхностным белкам лептоспир для усиления резистентности к сыворотке, однако это явление требует дальнейшего изучения.

Лептоспиры не являются классическими внутриклеточными патогенными организмами, однако, последние исследования показывают, что внутриклеточная фаза может иметь значение для процессов патогенеза. Исследования *in vitro* показали способность лептоспир к транзитному прохождению сквозь клетки при проникновении сквозь ткани и к персистенции в макрофагах (Murrey et al., 2009a).

В линии клеток J774A.1 мышинных макрофагов/моноцитов поглощение клеток лептоспир происходило посредством опосредованного рецепторами эндоцитоза, а не фагоцитоза. Возможный механизм, лежащий в основе этого явления — использование Mse-белка (англ., mammalian cell entry protein) (Murrey et al., 2009a).

Мсе-белки — группа белков, выделенных из *Mycobacterium tuberculosis* и являющихся посредниками в прикреплении возбудителя к клеткам хозяина и его проникновения внутрь. Патогенные лептоспиры обладают *mse*-подобным геном — при нарушении его экспрессии, адгезия к макрофагоподобным клеткам и попадание в них бактерий были значительно снижены. Мутанты по *mse*-подобному гену проявляли заметную аттенуацию при инфицировании хомяков (пятидесятикратное увеличение LD₅₀) по сравнению с родительским штаммом, что позволяет предположить важность механизма проникновения в клетки хозяина для вирулентности лептоспир (Murrey et al., 2009a). Белки LMB216 и LigV также вносят свой вклад в проникновение лептоспир внутрь фагоцитарных клеток, что было показано анализом мутантов *L. interrogans* и гетерологической экспрессией белков в сапрофитных *L. biflexa*.

Фагоцитоз является важным механизмом иммунного контроля при лептоспирозе, по этой причине нейтрализация агентов, выделяемых фагоцитами, может являться важным механизмом избегания иммунного ответа. Выделение реактивных форм кислорода является важным антимикробным механизмом, используемым фагоцитарными клетками для формирования иммунного ответа. Каталаза (KatE), обнаруживаемая в патогенных лептоспирах, необходима им для нейтрализации перекиси водорода. Несмотря на то, что роль KatE в выживании внутри макрофагов не исследовалась непосредственно, хомяки, инфицированные KatE мутантами *L. interrogans* сероваров Pomona и Manilae выжили при контрольном заражении без каких-либо признаков заболевания (Vieira et al., 2011), что свидетельствует в пользу того, что защита от окислительного стресса является принципиально важной для вирулентности лептоспир.

Еще одним посредником резистентности к окислительному стрессу является молекулярный шаперон ClpB. Этот белок также необходим для роста в условиях дефицита питательных веществ и теплового шока. Мутант по гену *clpB* также проявлял высокую степень аттенуации: песчанки, получившие достаточно высокую дозу возбудителей, пережили заражение без каких-либо клинических признаков лептоспироза и макроскопических поражений, характерных для заболевания (Lourdault et al., 2011). Точная причина аттенуации мутанта по гену *clpB* остается неизвестной, но может быть вызвана изменением экспрессии факторов вирулентности, неполноценностью роста *in vivo*, или усилением уязвимости к стрессорным факторам окружающей среды, включая окислительный стресс. Примечательно, что другой бактериальный шаперон — HtpG, также имеет принципиально важное значение для вирулентности лептоспир.

Индукция апоптоза фагоцитов после попадания в них посредством опосредованного рецепторами эндоцитоза является одним из потенциальных механизмов защиты лептоспир от ликвидации фагоцитами. Однако, массовая гибель фагоцитов может спровоцировать активацию защитных механизмов хозяина для того, чтобы препятствовать распространению возбудителей внутри организма. Исследования *in vitro* позволяют предложить, что существуют многочисленные механизмы индукции апоптоза, включая использование сфингомиелиназы 2 в линии клеток печени человека и нарушение работы кальциевых каналов, инициируемое фосфолипазой C лептоспир (другое название – LB361) в линиях макрофагов мышей и человека (Zhao et al., 2013). Однако, роль апоптоза макрофагов в течении инфекционного процесса остается неизвестной, так как другие исследования не показали каких-либо свидетельств апоптоза *in vitro*. Свидетельства апоптоза *in vivo* очень ограничены — имеются только данные об апоптозе гепатоцитов лабораторных морских свинок.

4.2.1 Колонизация почек патогенными лептоспирами.

В зависимости от вида хозяина и серовара микроорганизма, лептоспиры способны вызвать широкий спектр синдромов, варьирующихся от бессимптомной хронической формы до очень острого и тяжелого стремительного течения заболевания. Носителя заболевания, являющегося резервуаром болезни или хозяином с хронической формой, можно определить как источник лептоспироза, для которого инфекция является эндемичной, протекает очень мягко или бессимптомно, и передача заболевания происходит между представителями того же вида, что и хозяин (Blackmore, Hathaway, 1979). Хозяевами-носителями очень часто являются грызуны. Хозяева, у которых лептоспироз проходит в острой форме, такие как человек, являются случайными жертвами заболевания и не участвуют в дальнейшей его передаче.

В течении инфекционного процесса, микроорганизмы расселяются по всему организму хозяина-носителя и, в конечном итоге, удаляются иммунной системой из всех тканей, за исключением почек. В почечных канальцах бактерии продолжают размножаться, и выделяются с мочой в концентрациях до 10^7 клеток/мл (Faine, 1962; Monahan et al., 2008). В то время, как носители заболевания могут выделять лептоспир с мочой в течение всей своей жизни, хозяева, переболевшие острой формой заболевания, выделяют лептоспир в течение ограниченного периода времени. В случае людей – это срок от двух недель до одного месяца (Faine et al., 1999). Хозяева-носители, вероятно,

имели очень длительную эволюционную ассоциацию с лептоспирами, что привело к достижению равновесия между вирулентностью и реакционным ответом хозяина, до такой степени, что лептоспиры фактически трансформировались из патогена в комменсала.

Разница между хозяевами-носителями и хозяевами, подверженными острой форме заболевания, очень значительна – для хомяков LD_{50} для *L. interrogans* серовара *Manilae* составляет менее десяти клеток/мл, однако доза того же штамма в количестве 10^8 клеток/мл не вызывает никаких симптомов заболевания у крыс за исключением колонизации почек (Mungau et al., 2009c). Экспериментально инфицируемые крысы обычно не проявляют никаких клеточных патологий, за исключением интерстициального нефрита в редких случаях (Monahan et al., 2008; Tucunduva de Faria et al., 2007).

Можно предположить, что случайные хозяева лептоспироза со временем могут стать бактерионосителями заболевания, в связи со снижением вирулентности микроорганизмов по отношению к конкретному хозяину. Например, в областях с высокой частотой передачи заболеваний, такие как бассейн реки Амазонки в Перу, около 5% людей, переболевших лептоспирозом, стали долгосрочными распространителями заболевания, что позволяет предположить адаптацию хозяев, хотя возможность непосредственной передачи заболевания от человека к человеку еще необходимо доказать (Ganoza et al., 2010).

В то время как бактерионосители необходимы для трансмиссивного цикла лептоспир, и животные-носители являются источником инфекции для человека, исключительно малоизвестно о молекулярных основах развития хронической формы у носителей заболевания. Для проникновения в просвет почечных канальцев, прикрепления к почечным эпителиальным клеткам, избегания антител в фильтрате и получения питательных веществ лептоспирам могут потребоваться особые механизмы.

Некоторые исследования были направлены на изучение антигенных свойств лептоспир, колонизирующих почки. При сравнении с лептоспирами, изолированными из морских свинок с острой формой лептоспирозной инфекции, микроорганизмы, выделенные из крысиной мочи имели повышенное содержание липополисахаридов, хотя причина этого явления неизвестна (Nally et al., 2005).

Анализ лептоспир методом индуцированного мутагенеза может помочь в понимании молекулярных основ явления колонизации почек. Очень ограниченное

количество мутантов изучалось в модели заболевания, имитирующей бактерионосительство. Например, исследования показали, что белки LipL32 и LigB не являются обязательными для колонизации лептоспирами почек крыс (Croda et al., 2008; Murray et al., 2009c). В аналогичной модели на мышах изучали вирулентные свойства 28-ми мутантных штаммов. Два фактора вирулентности, необходимые для острой формы заболевания — липополисахариды и HtpG — оказались необходимы для колонизации почек мышей (Marcsisin et al., 2013).

Пять мутантов по другим различным факторам вирулентности были не способны к колонизации хозяев-носителей, но при этом сохранили способность вызывать острую форму заболевания в соответствующих хозяевах (Marcsisin et al., 2013). Эти неспособные к колонизации мутанты имели мутации в генах, кодирующих несколько белков с неизвестной функцией и два белка, с потенциальной функцией транспорта железа.

5. Моделирование лептоспироза *in vivo*

Широкое разнообразие видов животных используется в качестве хозяев при экспериментальном инфицировании лептоспирами.

Самые ранние исследования проводились на морских свинках (Noguchi, 1918). Однако непостоянство течения заболевания, дороговизна и сложности в содержании этих животных вынудили большинство исследователей отказаться от морских свинок в пользу других модельных объектов.

Позднее, к 50-ым годам прошлого века, стали использовать хомяков, как объектов для опытов (Morton, 1942). Учитывая их быстрый рост, низкую стоимость и простоту содержания, на данный момент хомяки являются основным объектами в модели острого лептоспироза.

Хомяки сохраняют способность к инфицированию лептоспирозом в независимости от их возраста, чего нельзя сказать о других используемых в опытах животных. Также, у хомяков можно вызвать острую форму заболевания и клиническое течение инфекции, имитирующее лептоспироз человека, поэтому хомяки крайне широко использовались, и используются по сей день, для тестирования вирулентности лептоспир, а также вакцин против лептоспироза. Модельный лептоспирозу хомяков настолько хорошо изучен, что многие государственные и международные организации используют хомяков для тестирования эффективности вакцин.

Обычные лабораторные мыши (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*) не подходят в качестве модельных объектов для имитации острого лептоспироза, так как эти два вида способны заболевать острой формой только в очень короткий период времени сразу после рождения (если только у них нет каких-либо генетических дефектов).

Инфицирование мышей и крыс, возраст которых превышает несколько недель, приводит к развитию хронической формы заболевания, ограниченной колонизацией почек лептоспирами. Однако, инфицирование мышей, которым сделана инъекция циклофосамида, мышей с дефектами TLR-рецепторов может привести к летальному исходу. Использование мышей с нокаутными генами в качестве модельных объектов в изучении лептоспироза получает все большее распространение.

Крыс также используют в качестве экспериментальных хозяев в изучении хронического лептоспироза.

Несмотря на дороговизну использования домашнего скота в качестве экспериментальных животных, крупный и мелкий рогатый скот, а также свиней используют в качестве объектов для изучения лептоспироза и тестирования вакцин. Основной причиной для использования сельскохозяйственных объектов является зоонозная передача лептоспироза от скота к человеку, а также ущерб, наносимый заболеванием продукции сельского хозяйства, и связанные с этим финансовые убытки. Последнее приводит к необходимости создания эффективных вакцин для животных.

Мелкие экспериментальные животные обычно инфицируются лептоспирами посредством интраперитонеальной инъекции возбудителей. Несмотря на неестественность этого метода, интраперитонеальные инъекции являются эффективным и репродуцируемым способом заражения животных (таких как хомяки), приводящим к быстрой диссеминации возбудителя по организму хозяина.

Существует два альтернативных метода инфицирования модельных объектов, имитирующих естественные пути заражения лептоспирозом. Эти методы включают в себя конъюнктивальное введение возбудителей и подкожные инъекции лептоспир.

6. Диагностика

Симптоматическая диагностика лептоспироза исключительно сложна и является практически невозможной, так как клиническая картина заболевания не специфична и симптомы, наблюдаемые у больных при поражении патогенными *Leptospira*, так же наблюдаются в широком спектре других заболеваний, независимо от того, о какой форме лептоспироза — острой или хронической — идет речь. Постановка диагноза на основе симптоматических признаков очень часто приводит к ошибочным заключениям, что, в свою очередь, приводит к проведению неправильного лечения.

6.1 Серологические методы

Подавляющее большинство случаев лептоспироза диагностируются серологическими методами, так как возможность постановки ПЦР не всегда предоставляется возможной. Антитела обнаруживаются в крови больных через 5-7 дней после манифестации симптомов. Использование агглютинационных тестов началось вскоре после того, как *Leptospira* была впервые изолирована, и на данный момент эти тесты являются основными в диагностике лептоспироза у животных и человека.

6.1.1 Реакция микроагглютинации

Основным методом серологической диагностики лептоспироза является метод микроагглютинации (МАТ). Для проведения реакции используют сыворотку крови пациентов и живые культуры лептоспир. После инкубации смеси сыворотка/антиген, ее микроскопически наблюдают на наличие агглютинации и определяют титр. МАТ является очень сложным методом для проведения и интерпретации (Turner, 1968). Для проведения этого теста необходимы живые культуры лептоспир всех сероваров, которые будут использованы в этой реакции (Faine, 1982; Turner, 1968). Набор тестируемых культур должен включать в себя серовары, характерные для всех серогрупп, так как заражение могло произойти сероваром, прежде не детектированным (Katz et al., 1991). Микроагглютинационная реакция является серогруппо-специфичным методом, и не может быть использована для обнаружения конкретного серовара.

Результат реакции исследуется посредством темнопольной микроскопии. Реакция считается положительной, когда наблюдается 50% агглютинация сыворотки. Так как степень агглютинации в сгустке определить визуально достаточно сложно; как правило,

под 50% агглютинацией понимают количество несвязанных лептоспир по сравнению с контролем (Faine, 1982). Подобная оценка сильно страдает от субъективизма.

Интерпретация МАТ затрудняется высокой степенью перекрестных реакций между различными серогруппами, особенно при анализе образцов, взятых у больных с острой формой лептоспироза. Также, могут наблюдаться "парадоксальные" реакции — когда наиболее высокие титры могут наблюдаться у серогрупп, не имеющих отношения к данному случаю заболевания (Alston Broom, 1958; Levett, 2001).

Для подтверждения реакции используют парную сыворотку, где четырех-кратное (или значительное) увеличение титра свидетельствует о положительной реакции, в независимости от интервала между образцами. Однако, период времени необходимый для установления повышения титра, может составлять от 3 до 14 и более дней, в зависимости от периода болезни, в который была взята пробы крови. Это может привести к тому, что пациенты погибнут прежде, чем будет поставлен точный диагноз (Brown et al., 1995; Cumberland et al., 1999; Ribeiro et al., 1994).

6.1.2 Другие серологические методы диагностики

Сложность и длительность МАТ потребовали создания простого и быстрого серологического теста, с помощью которого можно было бы своевременно поставить диагноз и незамедлительно начать лечение.

Обнаружение иммуноглобулинов в крови становится возможным в течение первой недели заболевания, что позволяет своевременно начать лечение, пока оно еще эффективно. Детекция иммуноглобулинов с использованием ELISA оказалась более чувствительным методом по сравнению с МАТ (Signorini et al., 2013). В этом методе чаще всего используются антигены, получаемые из *L. biflexa*, хотя антигены патогенных виды также используются. Кроме того, были использованы рекомбинантные антигены, хотя оценки эффективности их использования не проводилось (Vajani et al., 2003).

В последние годы для обнаружения иммуноглобулинов были разработаны наборы, позволяющие провести несколько быстрых тестов в лабораториях с дефицитом оборудования, или в потенциально полевых условиях (Smits et al., 2000a; Levett, Branch, 2002).

Однако, несмотря на достоинства этого метода, у него все же существуют недостатки, ограничивающие его эффективность при постановке раннего диагноза, а именно обязательное проведение повторного теста со вторым образцом. Также, для подтверждения диагноза рекомендуется проведение референс-теста (Goris et al., 2013b).

6.2 Молекулярно-генетические методы

Главной задачей, стоящей при использовании методов молекулярно-генетической диагностики, является ранняя и своевременная постановка диагноза, так как методы серологической диагностики не обладают достаточной чувствительностью к антителам на начальных стадиях заболевания и требуют слишком много времени для получения достоверных результатов. Многочисленные попытки адаптации различных молекулярно-генетических методов показали, что ключевым требованием для используемого метода при ранней диагностике лептоспироза является высокая чувствительность. Поэтому основную массу методов молекулярно-генетической диагностики лептоспироза составляют различные модификации полимеразной цепной реакции, позволяющие быстро выявлять в пробах специфичные для патогенных лептоспир последовательности ДНК.

6.2.1 Использование ПЦР для диагностики лептоспироза

Исключительно тяжелой задачей при постановке ПЦР для прижизненной диагностики лептоспироза является подбор генов-мишеней для последующего конструирования праймеров. Несмотря на многочисленные исследования и публикации касательно принципиальных факторов вирулентности лептоспир, до сих пор не выделены единичные гены, продукты которых имеют ключевое значение для вирулентности лептоспир. Также, задачу значительно усложняет избыточность генома, не позволяющая точно определить значимость гена-мишени для лептоспир на ранних стадиях заболевания.

Кроме использования конкретных специфичных генов в качестве мишеней, возможно конструирование праймеров для 16S и 23S рРНК генов на основе геномных библиотек. Однако, эффективность таких праймеров достаточно низкая.

Несмотря на описание многочисленных праймеров к различным группам генов-мишеней, была показана эффективность лишь для немногих из них, и из них лишь

единицы были допущены к широкому использованию для исследования клинического материала. Использование этих праймеров позволило обнаружить ДНК лептоспир в сыворотке крови, моче, водянистой влаге камер глаза, спинномозговой жидкости и ряде органов при пост-мортальном вскрытии (Maugim, 2012).

Применение ПЦР для прижизненной диагностики лептоспироза показало неоднозначные результаты, свидетельствующие об определенных ограничениях и сложностях использования этого метода. Использование праймеров для 16S и 23S рРНК генов может привести к получению ложноположительных результатов, так как эти гены присутствуют как и у патогенных, так и сапрофитных форм. Также, при испытании некоторых праймеров, было обнаружено отсутствие амплификации у отдельных сероваров, что говорит о необходимости использования более двух пар праймеров для детекции всех патогенных сероваров, или о необходимости более глубокого и детального подхода при выборе генов-мишеней (Loureiro et al., 2013).

Молекулярно-генетические методы, несмотря на осложнения, возникающие при адаптации этих методов, являются исключительно перспективными в диагностике лептоспироза и по своей эффективности намного превосходят серологические методы. В последние годы проводится все больше успешных исследований, направленных на повышение эффективности ПЦР и ее модификаций.

6.2.2 Использование ПЦР в реальном времени для оценки длительности персистенции лептоспир в органах и тканях

ПЦР в реальном времени является наиболее перспективным методом в изучении персистенции лептоспир в органах и тканях, так как помимо детекции возбудителей в конкретных очагах поражения, этот метод позволит определить также и число микроорганизмов в органах и тканях.

В молекулярной биологии, ПЦР в реальном времени (или количественная ПЦР, англ. Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR) используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК. Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце.

Метод использует общие принципы ПЦР. Основное отличие состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для количественного определения используют два метода — флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК, и модифицированные олигонуклеотиды (ДНК-зонды), которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК. Регистрация накопления продуктов амплификации на протяжении всего процесса, позволяет получать гораздо больше информации об особенностях реакции.

Описания использования ПЦР в реальном времени для изучения лептоспироза встречаются в литературе в весьма ограниченном количестве. Результаты применения ПЦР в реальном времени для диагностики лептоспироза неоднозначные, что вызвано различными факторами, в основном, связанными с несовершенством технологии взятия образцов для исследования. Так как ПЦР в реальном времени, как и обычная ПЦР, стала применяться для исследования лептоспироза относительно недавно, адаптация новых методик или праймеров может также иметь переменный успех.

Одно из описанных в литературе исследований было направлено на адаптацию ПЦР в реальном времени (Bourhy et al., 2011) и испытание флуоресцентных красителей и зондов (краситель SYBRgreen и TaqMan – меченый флуоресцентным красителем олигонуклеотидный зонд) с использованием различных наборов праймеров. В качестве генов-мишеней были выбраны: ген *lfb1* (кодирующий патоген-специфичный белок с неизвестной функцией), ген *lipL32* (кодирующий липопротеин клеточной стенки), ген *secY* (ген домашнего хозяйства). В качестве биологических образцов была использована кровь больных лептоспирозом. Полученные данные указывают на высокую специфичность данной реакции (но не 100%), но низкую чувствительность (10^3 клеток/мл). Наилучшие результаты были достигнуты с использованием комбинации *lfb1*-праймеров с SYBRgreen красителем и *lipL32*-праймеров с TaqMan зондом. Авторы работы отмечают, что сворачивание крови снижает эффективность реакции, так как лептоспиры, видимо, концентрируются в сгустках крови. Также, была отмечена высокая стоимость данной реакции, что делает ее малоподходящим вариантом для повсеместной диагностики лептоспироза.

Другое исследование (Gonzales et al., 2013) направленное на адаптацию ПЦР в реальном времени для диагностики лептоспироза также использовало в качестве мишени ген *lipL32*. Флуоресцентный краситель, использованный в этом опыте - SYBRgreen.

Поставленная реакция также имела невысокую чувствительность — 10^2 клеток/мл. Авторы работы объясняют это влиянием нескольких факторов: образцы были взяты у пациентов с достаточно мягким течением инфекционного процесса; образцы крови были взяты или после появления антител в крови, или после начала лечения антибиотиками, что в обоих случаях снижает присутствие бактерий в крови. Также отмечается, что сворачивание крови и последующее замораживание образцов могли оказать негативное влияние на обнаружение лептоспир. Авторы отмечают, что реакция эффективна только на ранних стадиях заболевания (первые 7-8 дней с проявления симптомов), и ее эффективность падает с течением инфекционного процесса.

В качестве генов-мишеней целесообразно выбирать те гены, высокий уровень экспрессии которых наблюдается на протяжении всего инфекционного процесса. Одним из наиболее потенциальных генов-мишеней является ген, кодирующий липопротеин LipL32. Белок LipL32 является наиболее преобладающим компонентом внешней мембраны лептоспир и наиболее многочисленным белком лептоспир: в одной клетке число его молекул может достигать 38000 копий. Следовательно, справедливо будет предположить, что этот белок активно экспрессируется на протяжении всего заболевания и таким образом удовлетворяет упомянутому выше требованию. Следует иметь в виду, что мутанты по гену *lipL32*, кодирующему этот белок, не проявили снижения вирулентности при испытании *in vivo*.

На данный момент, результаты адаптации ПРЦ в реальном времени для детекции лептоспир сложно назвать безусловно положительными. Несмотря на то, что успешное применение метода ПЦР возможно раньше, чем постановка МАТ-реакции, ПЦР менее чувствительна, чем МАТ-реакция. Также следует отметить определенную сложность постановки ПЦР в реальном времени, так как реакция требует опытных специалистов для постановки и очень чувствительна к малейшей контаминации среды. Немаловажное значение имеет методика взятия и хранения образцов - эти факторы могут оказать серьезное влияние на результаты реакции. Для повсеместного применения ПРЦ в реальном времени для диагностики лептоспироза существует необходимость в дальнейшей работе направленной на улучшение имеющихся методик.

Тем не менее, существующие на данный момент методики можно успешно применять для изучения персистенции лептоспир в органах и тканях. Данные, полученные с помощью ПЦР в реальном времени, могут стать бесценными для медицинской практики,

так как с их помощью можно будет установить не только число возбудителей в очагах поражения, но и установить корреляцию между количеством лептоспир и тяжестью вызываемой ими патологии, что позволит выявить наиболее уязвимые органы и ткани. Также, эти данные могут помочь в понимании динамики распространения лептоспир внутри организма хозяина в течение заболевания и выявить возможные паттерны поражения органов и тканей. Знание паттернов поражения органов и тканей, а также сроков персистенции возбудителей в очагах заболевания, крайне важно, учитывая распространенность случаев несвоевременной диагностики лептоспироза. Это позволит проводить эффективное лечение лептоспироза в независимости от срока постановки диагноза.

Выводы

1. Несмотря на более чем вековую историю изучения патогенных представителей рода *Leptospira*, молекулярные детерминанты патогенеза лептоспироза остаются малоизученными или вовсе неизвестными.

2. Своевременная симптоматическая диагностика лептоспироза исключительно сложна или невозможна из-за отсутствия характерных признаков заболевания. Серологические методы диагностики лептоспироза являются ретроспективными и не пригодны для ранней диагностики заболевания.

3. Метод ПЦР в реальном времени — основной молекулярный метод идентификации патогенных лептоспир в клиническом материале — обладает недостаточной эффективностью по сравнению с серологическими тестами и требует существенных материальных затрат и подготовленного персонала, что в настоящий момент не позволяет использовать его в качестве рутинного метода диагностики в повседневной медицинской практике.

4. Обладая рядом недостатков как диагностический метод, ПЦР в реальном времени может успешно применяться для изучения персистенции возбудителя в органах и тканях хозяина, что позволит заложить основу для эффективного лечения лептоспироза вне зависимости от срока постановки диагноза.

Автор

Пряников О.И.

Научный руководитель

Коженкова Е.В.

Библиографический список

1. Adler B., de la Peña Moctezuma A. (2010) *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140:287–296.
2. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL (2011) Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet. Microbiol.* 153:73–81.
3. Adler B. (2015), *Leptospira* and Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 387.
4. Alston J.M., Broom J.C. (1958) *Leptospirosis in man and animals.* E. & S. Livingstone, Edinburgh.
5. Bajani M.D., Ashford D.A., Bragg S.L., Woods C.W., Aye T., Spiegel R.A., Plikaytis B.D., Perkins B.A., Phelan M., Levett P.N., Weyant R.S. (2003) Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 41:803–809.
6. Ballard S.A., Go M, Segers R.P., Adler B. (1998) Molecular analysis of the *dnaK* locus of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Gene* 216:21–29.
7. Barocchi M.A., Ko A.I., Reis M.G., McDonald K.L., Riley L.W. (2002) Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect. Immun.* 70:6926–6932.
8. Batzios S.P., Zafeiriou D.I., Papakonstantinou E. (2013) Extracellular matrix components: an intricate network of possible biomarkers for lysosomal storage disorders? *FEBS Lett* 587:1258–1267.
9. Blackmore DK, Hathaway SC (1979) The nidality of zoonoses. In: *Proceedings of the 2nd international symposium on veterinary epidemiology and economics*, pp. 207–213.
10. Bourhy P., Louvel H., Saint Girons I., Picardeau M. (2005) Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. *J Bacteriol.* 187:3255–3258.
11. Breiner D.D., Fahey M., Salvador R., Novakova J., Coburn J. (2009) *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. *Infect. Immun.* 77:5528–5536.
12. Brown P.D., Gravekamp C., Carrington D.G., Van de Kemp H., Hartskeerl R.A., Edwards C.N., Everard COR, Terpstra W.J., Levett P.N. (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 43:110–114.

13. Buchner J. (2010) Bacterial Hsp90—desperately seeking clients. *Mol. Microbiol.* 76:540–544.
14. Bulach D.M., Zuerner R.L., Wilson P., Seemann T., McGrath A., Cullen P.A., Davis J., Johnson M., Kuczek E., Alt D.P., Peterson-Burch B., Coppel R.L., Rood J.I., Davies J.K., Adler B. (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:14560–14565.
15. Carleton O., Charon N.W., Allender P. et al., (1979). Helix handedness of *Leptospira interrogans* as determined by scanning electron microscopy. *J Bacteriol.* 137:1413–1416.
16. Carvalho E., Barbosa A.S., Gomez R.M., Cianciarullo A.M., Hauk P., Abreu P.A., Fiorini L.C., Oliveira M.L., Romero E.C., Goncales A.P., Morais Z.M., Vasconcellos S.A., Ho P.L., (2009). Leptospiral TlyCis an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Lett* 583:1381–1385.
17. Cerqueira G.M., McBride A.J., Picardeau M., Ribeiro S.G., Moreira A.N., Morel V., Reis M.G., Ko A.I., Dellagostin O.A., (2009). Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (*lig*) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of *ligB* to typing leptospiral isolates. *J. Med. Microbiol.* 58:1173–1181.
18. Ching A.T., Favaro R.D., Lima S.S., Chaves Ade A., de Lima M.A., Nader H.B., Abreu P.A., Ho P.L. (2012). *Leptospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 427:774–779.
19. Choy H.A., Kelley M.M., Chen T.L., Moller A.K., Matsunaga J., Haake D.A., (2007). Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect. Immun.* 75:2441–2450.
20. Choy H.A., Kelley M.M., Croda J., Matsunaga J., Babbitt J.T., Ko A.I., Picardeau M., Haake D.A. (2011). The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE* 6:e16879.
21. Comstock L.E., Thomas D.D., (1989). Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 57:1626–1628.
22. Confer A.W., Ayalew S., (2013). The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet. Microbiol.* 163:207–222.
23. Croda J., Figueira C.P., Wunder E.A. Jr, Santos C.S., Reis M.G., Ko A.I., Picardeau M., (2008) Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect. Immun.* 76:5826–5833.

24. Cullen P.A., Lo M., Murray G.L., Adler B., Rossjohn J., (2009). Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J. Mol. Biol.* 387:1229–1238.
25. Cumberland P.C., Everard C.O.R., Levett P.N., (1999). Assessment of the efficacy of the IgM enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:731–734.
26. Dang W., Hu Y.H., Sun L., (2011). HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Vet. Microbiol.* 152:394–400.
27. Davis S.L., Gurusiddappa S., McCrea K.W., Perkins S., Hook M. (2001). SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the B β chain. *J. Biol. Chem.* 276:27799–27805.
28. Dong K., Li Q., Liu C., Zhang Y., Zhao G, Guo X., (2010). Cloning and characterization of three *cheB* genes in *Leptospira interrogans*. *Acta. Biochim. Biophys. Sinica.* 42:216–223.
29. Edwards A.M., Jenkinson H.F., Woodward M.J., Dymock D. (2005). Binding properties and adhesion mediating regions of the major sheath protein of *Treponema denticola* ATCC 35405. *Infect. Immun.* 73:2891–2898
30. Ellis W.A., Hovind-Hougen K., Moller S. et al., (1983). Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Zentral. Bl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. A* 255:323–335.
31. Ellis W.A., McParland P.J., Bryson DG, Thiermann A.B., Montgomery J., (1986b). Isolation of leptospires from the genital tract and kidneys of aborted sows. *Vet. Rec.* 118:294–295.
32. Ellis W.A., Songer J.G., Montgomery J., Cassells J.A., (1986a). Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non pregnant cattle. *Vet. Rec.* 118:11–13.
33. Eshghi A., Lourdault K., Murray G.L., Bartpho T., Sermswan R.W., Picardeau M., Adler B., Snarr B., Zuerner R.L., Cameron C.E., (2012a). *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. *Infect. Imm.* 80(11):3892-3899.
34. Evangelista K.V., Coburn J., (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future. Microbiol.* 5:1413–1425.
35. Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P., (1999). *Leptospira* and leptospirosis. *MediSci.*, Melbourne.

36. Faine S., (1982). Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Geneva.
37. Faine S., (1962). The growth of *Leptospira australis* B in the kidneys of mice in the incipient experimental carrier state. J Hyg. (Lond) 60:435–442.
38. Fenno J.C., Tamura M., Hannam P.M., Wong G.W., Chan R.A., McBride B.C., (2000). Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. Infect. Immun. 68:1884–1892.
39. Figueira C.P., Croda J., Choy H.A., Haake D.A., Reis M.G., Ko A.I., Picardeau M., (2011). Heterologous expression of pathogen-specific genes *ligA* and *ligB* in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. BMC Microbiol. 11:129.
40. Ganoza C.A., Matthias M.A., Saito M., Cespedes M., Gotuzzo E., Vinetz J.M., (2010). Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. PLoS. Negl. Trop. Dis 4:e612.
42. Goldstein S.F., Charon N.W., (1988). Motility of the spirochete *Leptospira*. Cell Motil. Cytoskelet. 9:101–110.
43. Goldstein S.F., Charon N.W., (1990). Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete. PNAS. 1990. V.87. P. 4895-4899..
44. Goris M.G.A., Leeflang M.M.G., Loden M, Wagenaar J.F.P., Klatser P.R., Hartskeerl R.A., Boer K.R., (2013b). Prospective evaluation of three rapid diagnostic tests for diagnosis of human leptospirosis. PLoS. Negl. Trop. Dis. 7:e2290.
45. Guo L., Ai J., Zheng Z., Howatt D.A., Daugherty A., Huang B., Li X.A., (2013). High density lipoprotein protects against polymicrobe-induced sepsis in mice. J Biol. Chem. 288:17947–17953.
46. Haake D.A., Chao G., Zuerner R.L., Barnett J.K., Barnett D., Mazel M., Matsunaga J., Levett P.N., Bolin C.A., (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect. Immun. 68:2276–2285.
47. Hamburger Z.A., Brown MS, Isberg R.R., Bjorkman P.J., (1999). Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. Science 286:291–295.
48. Hathaway S.C., Blackmore D.K., (1981). Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospires of the Ballum serogroup in the black Rat (*Rattus rattus*) and the brown Rat (*Rattus norvegicus*) in New Zealand. J Hyg. (Lond) 87:427–436.

49. Henneberry R.C., Cox C.D., (1970). Beta-oxidation of fatty acids by *Leptospira*. *Can J. Microbiol.* 16:41–45.
50. Hoke D.E, Egan S., Cullen P.A., Adler B., (2008). LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect. Immun.* 76:2063–2069.
51. Holt S.C., (1978). Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* 42:114–160.
52. Hovind-Hougen et al., 1982 as *Turneriella parva* gen. nov. comb. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1497–1499.
53. Hussain M., Becker K., von Eiff C., Schrenzel J., Peters G., Herrmann M., (2001). Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J. Bacteriol.* 183:6778–6786.
54. Ito T., Yanagawa R., (1987). Leptospiral attachment to four structural components of extracellular matrix. *Nihon Juigaku. Zasshi.* 49:875–882.
55. Johnson R.C., Rogers P., (1964). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *J. Bacteriol.* 88:1618–1623.
56. Kadis S., Pugh W.L., (1974). Urea utilization by *Leptospira*. *Infect Immun* 10:793–801.
57. Kassegne K., Hu W., Ojcius D.M., Sun D., Ge Y., Zhao J., Yang X.F., Li L., Yan J., (2014). Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic *Leptospira* species. *J. Infect. Dis.* 209:1105–1115.
58. Katz A.R., Manea S.J., Sasaki D.M., (1991). Leptospirosis on Kauai: investigation of a common source waterborne outbreak. *Am. J. Public. Health.* 81:1310–1312.
59. King A.M., Bartpho T., Sermswan R.W., Bulach D.M., Eshghi A., Picardeau M., Adler B., Murray G.L., (2013). Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute leptospirosis, but requires a small chaperone, Lep, for stable expression. *Infect. Immun.* 8:2768–2776.
60. King A.M., Pretre G., Bartpho T., Sermswan R.W., Toma C., Suzuki T., Eshghi A., Picardeau M., Adler B., Murray G.L., (2014). High temperature protein G (HtpG) is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 82:1123–1131.
61. Kline K.A., Falker S., Dahlberg S., Normark S., Henriques-Normark B., (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe.* 5:580–592.

62. Lähteenmäki K., Kuusela P., Korhonen T.K., (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:531–552.
63. Lambert A., Takahashi N., Charon N.W., Picardeau M., (2012b). Chemotactic behavior of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:8467–8469.
64. Lee S.H., Kim K.A., Park Y.G., Seong I.W., Kim M.J., Lee Y.J., (2000). Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene* 254:19–28.
65. Lehmann J.S., Fouts D.E., Haft D.H., Cannella A.P., Ricaldi J.N., Brinkac L., Harkins D., Durkin S., Sanka R. Sutton G., Moreno A., Vinetz J.M., Matthias M.A., (2013). Pathogenomic inference of virulence-associated genes in *Leptospira interrogans*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7:e2468.
66. Levett P.N., Branch S.L., (2002) Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:745–748.
67. Levett P.N., (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:296–326.
68. Levett P.N., Morey R.E., Galloway R., Steigerwalt A.G., Ellis W.A., (2005). Reclassification of *Leptospira parva*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4895–4899.
69. Lima S.S., Ching A.T., Favaro R.D., Da Silva J.B., Oliveira M.L., Carvalho E., Abreu P.A., Ren S.X., Fu G., Jiang X.G. et al., (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422:888–893.
70. Lin Y.P., Lee D.W., McDonough S.P., Nicholson L.K., Sharma Y., Chang Y.F., (2009). Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J. Biol. Chem.* 284:19380–19391.
71. Lin Y.P., McDonough S.P., Sharma Y., Chang Y.F., (2010). The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. *PLoS. ONE.* 5:e11301.

72. Li Z., Ploplis VA., French E.L., Boyle M.D., (1999). Interaction between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in a mouse skin infection model. *J. Infect. Dis.* 179:907–914.
73. Lin Y.P., McDonough S.P., Sharma Y., Chang Y.F., (2011). *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen alpha C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Mol. Microbiol.* 79:1063–1076.
74. Lo M., Murray G.L., Khoo C.A., Haake D.A., Zuerner R.L., Adler B., (2010). Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a *PerR* homolog. *Infect. Immun.* 78:4850–4859.
75. Lourdault K., Cerqueira G.M., Wunder E.A. Jr, Picardeau M., (2011). Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect. Immun.* 79:3711–3717.
76. Luo Y., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Creagh A.L., Knoechel D.G., Haynes C.A., Finlay B.B., Strynadka N.C., (2000). Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature.* 405:1073–1077.
77. Malmstrom J., Beck M., Schmidt A., Lange V., Deutsch E.W., Aebersold R., (2009). Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature.* 460:762–765.
78. Marcsisin R.A., Bartpho T., Bulach D.M., Srikrum A., Sermswan R.W., Adler B., Murray G.L., (2013). Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonise the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *J. Med. Microbiol.* 62:1601–1608.
79. Marshall R.B., (1976). The route of entry of leptospires into the kidney tubule. *J. Med. Microbiol.* 9:149–152
80. Marshall R.B., (1974). Ultrastructural changes in renal tubules of sheep following experimental infection with *Leptospira interrogans* serotype Pomona. *J. Med. Microbiol.* 7:505–508.
81. Matsunaga J., Barocchi M.A., Croda J., Young T.A., Sanchez Y., Siqueira I., Bolin C.A., Reis M.G., Riley L.W., Haake D.A., Ko A.I., (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol. Microbiol.* 49:929–945.

82. Matsunaga J., Lo M., Bulach D.M., Zuerner R.L., Adler B., Haake D.A., (2007). Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect. Immun.* 75:2864–2874.
83. McBride A.J., Cerqueira G.M., Suchard M.A., Moreira A.N., Zuerner R.L., Reis M.G., Haake D.A., Ko A.I., Dellagostin O.A., (2009). Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect. Genet. Evol.* 9:196–205.
84. Merien F., Truccolo J., Baranton G., Perolat P., (2000). Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol. Lett.* 185:17–22.
85. Michel L.V., Snyder J., Schmidt R., Milillo J., Grimaldi K., Kalmeta B., Khan M.N., Sharma S, Wright L.K, Pichichero M.E., (2013). Dual orientation of the outer membrane lipoprotein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 195:3252–3259.
86. Monahan A.M., Callanan J.J., Nally J.E., (2008). Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infect. Immun.* 76:4952–4958.
87. Moriarty T.J., Norman M.U., Colarusso P., Bankhead T., Kubes P., Chaconas G., (2008). Real-time high resolution 3D imaging of the lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS. Pathog.* 4:e1000090.
88. Murray G.L., Morel V., Cerqueira G.M., Croda J., Srikram A., Henry R., Ko A.I., Dellagostin O.A., Bulach D.M., Sermswan R.W., Adler B., Picardeau M., (2009a). Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect. Immun.* 77:810–816.
89. Murray G.L., Srikram A., Henry R. et al., (2010). Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol. Microbiol.* 78:701–709.
90. Murray G.L., Srikram A., Henry R., Hartskeerl R.A., Sermswan R.W., Adler B., (2010). *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol. Microbiol.* 78:701–709.
91. Murray G.L., Srikram A., Hoke D.E., Wunder E.A.J., Henry R., Lo M., Zhang K., Sermswan R.W., Ko A.I., Adler B., (2009c) The major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 77:952–958.
92. Murray G.L., (2013) The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet. Microbiol.* 162:305–314.

93. Nally J.E., Chow E., Fishbein M.C., Blanco D.R., Lovett M.A., (2005). Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect. Immun.* 73:3251–3260.
94. Nahori M.A., Fournie-Amazouz E., Que-Gewirth N.S. et al., (2005). Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol* 175:6022–6031.
95. Nascimento A.L., Ko A.I., Martins E.A., Monteiro-Vitorello C.B., Ho P.L., Haake D.A., Verjovski-Almeida S., Hartskeerl R.A., Marques M.V., Oliveira M.C., Menck C.F., Leite L.C., Carrer H., Coutinho L.L., Degraeve W.M., Dellagostin O.A., El-Dorry H., Ferro E.S., Ferro M.I., Furlan L.R., Gamberini M., Giglioti E.A., Goes-Neto A., Goldman G.H., Goldman M.H., Harakava R., Jeronimo S.M., Junqueira-de-Azevedo I.L., Kimura E.T., Kuramae E.E., Lemos E.G., Lemos M.V., Marino C.L., Nunes L.R., de Oliveira R.C., Pereira G.G., Reis M.S., Schriefer A., Siqueira W.J., Sommer P., Tsai S.M., Simpson A.J., Ferro J.A., Camargo L.E., Kitajima J.P., Setubal J.C., Van Sluys M.A., (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.* 186:2164–2172.
96. Oliveira R., de Moraes Z.M., Goncalves A.P., Romero E.C., Vasconcellos S.A., Nascimento A.L., (2011). Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS. ONE.* 6:e21962.
97. Oliveira R., Domingos R.F., Siqueira G.H., Fernandes L.G., Souza N.M., Vieira M.L., de Moraes Z.M., Vasconcellos S.A., Nascimento A.L., (2013). Adhesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7:e2396.
98. Palaniappan R.U., Chang Y.F., Jusuf S.S., Artiushin S., Timoney J.F., McDonough S.P., Barr S.C., Divers T.J., Simpson K.W., McDonough P.L., Mohammed H.O., (2002). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 70:5924–5930.
99. Picardeau M., Brenot A., Saint Girons I., (2001). First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol. Microbiol.* 40:189–199.

100. Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C. et al., (2008) Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS. ONE. 3:e1607.
101. Pinne M., Choy H.A., Haake D.A., (2010). The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. PLoS Negl. Trop. Dis. 4:e815.
102. Pinne M., Haake D.A., (2013). LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. PLoS. ONE. 8:e51025.
103. Pinne M., Matsunaga J., Haake D.A., (2012). A novel approach to identification of host ligand-binding proteins: leptospiral outer-membrane protein microarray. J. Bacteriol. 194:6074–6087.
104. Ribeiro M.A., Assis C.S.N., Romero E.C., (1994). Serodiagnosis of human leptospirosis employing immunodominant antigen. Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. 6:140–144.
105. Ricaldi J.N., Fouts D.E., Selengut J.D., et al. (2012). Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. PLoS. Negl. Trop. Dis6:e1853.
106. Ristow P., Bourhy P., da Cruz McBride F.W., Figueira C.P., Huerre M., Ave P., Girons I.S., Ko A.I., Picardeau M., (2007). The OmpA-like protein Loa22 is essential for Leptospiral virulence. PLoS. Pathog. 3:97.
107. Sehgal S.C., Sugunan A.P., Murhekar M.V., Sharma S., Vijayachari P., (2000). Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. Int. J. Antimicrob. Agents. 13:249–255.
108. Signorini M.L., Lottersberger J., Tarabla H.D., Vanasco N.B., (2013) Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. Epidemiol. Infect. 141:22–32.
109. Srikram A., Zhang K., Bartpho T., Lo M., Hoke D.E., Sermswan R.W., Adler B., Murray G.L., (2011). Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharid emutant. J. Infect. Dis. 203:870–879.
110. Smits H.L., Hartskeerl R.A., Terpstra W.J., (2000a) International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. Trop. Med. Int. Health. 5:124–128.

111. Stevenson B., Choy H.A., Pinne M., Rotondi M.L., Miller M.C., Demoll E., Kraiczy P., Cooley A.E., Szczepanski A., Furie M.B., Benach J.L., Lane B.P., Fleit H.B., (1990) Interaction between *Borrelia burgdorferi* and endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* 85:1637–1647.
112. Takafuji E.T., Kirkpatrick J.W., Miller R.N., Karwacki J.J., Kelley P.W., Gray M.R., McNeill K.M., Thomas D.D., Higbie L.M., (1990) In vitro association of leptospire with host cells. *Infect. Immun.* 58:581–585.
113. Thomas D.D., Navab M., Haake D.A., Fogelman A.M., Miller J.N., Lovett M.A., (1988). *Treponema pallidum* invades intercellular junctions of endothelial cell monolayers. *Proc Natl Acad. SciUSA.* 85:3608–3612.
114. Timboe H.L., Kane R.E., Sanchez J.L., (1984). An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N. Engl. J. Med.* 310:497–500.
115. Toma C., Murray G.L., Nohara T., Mizuyama M., Koizumi N., Adler B., Suzuki T., (2014) Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. *Cell. Microbiol.* 16:1366–1377.
116. Tsuchimoto M., Niikura M., Ono E., Kida H., Yanagawa R., (1984). Leptospiral attachment to cultured cells. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* 258:268–274.
117. Tucunduva de Faria M., Athanazio D.A., Goncalves Ramos E.A., Silva E.F., Reis M.G., Ko A.I., (2007). Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J. Comp. Pathol.* 137:231–238.
118. Turner L.H., (1968). Leptospirosis II. Serology. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62:880–889.
119. Vasconcellos S.A, Chudzinski-Tavassi A.M., Nascimento A.L., (2013) Interaction of *Leptospira interrogans* with human proteolytic systems enhances.
120. Vasconcellos S.A, Ho P.L, (2013). Adhesin activity of *Leptospira interrogans* lipoprotein identified by in vivo and in vitro shotgun phage display. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 431:342347.
121. Verma A., Artiushin S., Matsunaga J., Haake D.A., Timoney J.F., (2005) LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infect. Immun.* 73:7259–7266.
122. Verma A., Brissette C.A., Bowman A.A., Shah S.T., Zipfel P.F., Stevenson B., (2010a) Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect. Immun.* 78:2053–2059.

123. Verma A., Hellwage J., Artiushin S., Zipfel P.F., Kraiczy P., Timoney J.F., Stevenson B., (2006). LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 74:2659–2666.
124. Verma A., Kumar P., Babb K., Timoney J.F., Stevenson B., (2010b) Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 4:e778.
125. Vieira M.L., Alvarez-Flores M.P., Kirchgatter K., Romero E.C., Alves I.J., de Moraes Z.M., Vieira M.L., Atzingen M.V., Oliveira T.R., Oliveira R., Andrade D.M., Vasconcellos S.A., Nascimento A.L., (2010a) In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS. ONE.* 5:e11259.
126. Vieira M.L., Vasconcellos S.A., Goncales A.P., de Moraes Z.M., Nascimento A.L., (2009) Plasminogen acquisition and activation at the surface of *Leptospira* species lead to fibronectin degradation. *Infect. Immun.* 77:4092–4101.
127. Vinh T., Faine S., Adler B., (1984). Adhesion of leptospires to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. *J. Med. Microbiol.* 18:73–85.
128. Vivian JP, Beddoe T, McAlister AD, Wilce MC, Zaker-Tabrizi L, Troy S, Byres E, Hoke DE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette CA, Verma A, Haake DA (2007) *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE* 2:e1188.
129. Weiss D.S., Brotcke A., Henry T., Margolis J.J., Chan K., Monack D.M., (2007) In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:6037–6042.
130. Werts C., Tapping R.I., Mathison J.C. et al., (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2:346–352.
131. Xue F., Yan J., Picardeau M., (2009). Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned.
132. Yasuda P.H., Steigerwalt A.G., Sulzer K.R., Kaufmann A.F., Rogers F., Brenner D.J., (1987). Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:407–415.
133. Yuri K., Takamoto Y., Okada M., Hiramune T., Kikuchi N., Yanagawa R., (1993). Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence. *Infect. Immun.* 61:2270–2272.

134. Zhang K., Murray G.L., Seemann T., Srikrum A., Bartpho T., Sermiswan R.W., Adler B., Hoke D.E., (2013) Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian Apolipoprotein A-I. *Infect. Immun.* 81:3872–3879.
135. Zhang L., Zhang C., Ojcius D.M., Sun D., Zhao J., Lin X., Li L., Li L., Yan J., (2012b) The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif dependent infection of cells and animals. *Mol. Microbiol.* 83:1006–1023.
136. Zhang Q., Zhang Y., Zhong Y. et al., (2011) *Leptospira interrogans* encodes an ROK family glucokinase involved in a cryptic glucose utilization pathway. *Acta. Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* 43:618–629.
137. Zhang Y., Bao L., Zhu H., Huang B., Zhang H., (2010) OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 42:70–79.