

НАРУЖНАЯ МЕМБРАНА ПАТОГЕННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА LEPTOSPIRA

А.Н. Ваганова

ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург

Резюме. Патогенные лептоспиры способны поражать широкий спектр хозяев, и длительно сохраняются в окружающей среде. Наружная мембрана — компонент клетки, участвующий во взаимодействии микроорганизма со средой обитания. В настоящее время описан ряд белков, представленных в наружной мембране лептоспир и отвечающих за колонизацию организма хозяина, защиту от воздействия иммунной системы, поступление веществ в клетку и ряд других процессов. Наружная мембрана содержит белки и молекулы липополисахарида, обладающие цитотоксическим эффектом. Показано, что регуляция белкового состава мембран зависит от ряда факторов окружающей среды, таких как температура, осмолярность, наличие в среде тех или иных веществ. Как липополисахарид, так и белковые молекулы наружной мембраны обладают антигенными свойствами. Препараты таких соединений могут использоваться в практических целях, как компоненты лептоспирозных вакцин и диагностикумов. Настоящий обзор посвящен вопросам структурной организации наружной мембраны лептоспир, разнообразия входящих в ее состав молекул и регуляции их синтеза, а также перспективам практического применения компонентов наружной мембраны в сфере диагностики и профилактики лептоспирозной инфекции.

Ключевые слова: *Leptospira*, антигены, наружная мембрана, липополисахарид.

THE OUTER MEMBRANE OF PATHOGENIC REPRESENTATIVES OF THE LEPTOSPIRA GENUS

Vaganova A.N.

Abstract. Pathogenic leptospires can infect wide spectrum of hosts and they can survive in the environment long time. The outer membrane is the cellular component participated in interaction of microorganisms and environment. In present time several proteins located in the outer membrane of leptospires which are responsible for colonization of host organism, protection from influence of immune system of host, transport of substances in to the cell and other processes have been described. The outer membrane contains proteins and lipopolysaccharide molecules which have cytotoxic effect. It was shown that regulation of protein composition of membranes depends on several factors of environment such as temperature, osmolarity, presence of certain substances in environment. Lipopolysaccharide and protein molecules of outer membranes have antigenic properties. These molecules can be used in practice as the components of vaccine against leptospiroses and diagnostic tools. Current review summarize information concerning structural organization of the outer membrane of leptospires, diversities of incoming parts of molecules and regulation of their synthesis. Moreover, perspectives of practical using of the outer membrane components in diagnostics and prevention of leptospiroses are presented. (*Infekciã i immunitet*, 2011, vol. 1, N 1, p. 29–42)

Key words: *Leptospira*, antigens, outer membrane, lipopolysaccharide.

Введение

Род *Leptospira* принадлежащий к самостоятельному семейству *Leptospiraceae* в порядке *Spirochaetales* филы *BXVII Spirochaetes* объединяет ряд видов, среди которых присутствуют как патогенные (*L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*,

L. broomii, *L. fainei*, *L. inadai*), так и сапрофитные (*L. biflexa*, *L. wolbachii* и *L. meyeri*) микроорганизмы [49]. Семейство образует обособленную ветвь, рано отделившуюся от общего эволюционного ствола *Spirochaetes* [64]. Сапрофитные лептоспиры широко распространены в олиготрофных пресноводных сообществах; многие патогенные лептоспиры сохраняют жизнеспособность вне

поступила в редакцию 08.11.2010
отправлена на доработку 15.11.2010
принята к печати 19.11.2010

© Ваганова А.Н., 2011

Адрес для переписки:

Ваганова Анастасия Николаевна,
научный сотрудник лаборатории
зооантропонозных инфекций
ФГУН НИИЭМ имени Пастера
Роспотребнадзора

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФГУН НИИЭМ имени Пастера
Роспотребнадзора.
Тел.: (812) 232-21-36 (служебн.).
E-mail: yersinia@land.ru

организма хозяина, в водоемах — в течение 30 дней, а во влажной почве — до 279 дней [2]. Среди патогенных лептоспир можно выделить группы, представители которых различаются по относительной роли паразитической и сапрофитной фаз существования, устойчивости в окружающей среде, гостальной и органной специфичности [1].

Патогенные лептоспиры способны поражать млекопитающих, относящихся к различным отрядам. Характер течения лептоспироза у различных хозяев значительно варьирует. Инфекционный процесс у большинства диких мелких млекопитающих протекает в хронической форме с длительным и интенсивным выделением лептоспир с мочой. Острое течение лептоспироза у сельскохозяйственных животных характеризуется лихорадкой, выделением мочи с примесью крови, желтухой, абортами и рождением нежизнеспособного потомства [26]. Заболевание у собак сопровождается рвотой, обезвоживанием, некрозом слизистых, примесью крови в кале, однако, с другой стороны, в ряде случаев лептоспироз у собак протекает бессимптомно [80].

В становлении генома различных видов патогенных лептоспир происходят как процессы редукции генома, так и процессы его увеличения за счет формирования новых генов, в том числе ассоциированных с патогенностью. Геномы *L. biflexa* и *L. borgpetersenii* имеют сходный размер, при этом количество генов у сапрофитов значительно больше, а у патогенов вида *L. borgpetersenii* многие гены были утрачены в ходе транспозонного мутагенеза. *L. interrogans* имеет более объемный геном, включающий как гены, задействованные в адаптации к обитанию во внешней среде, так и гены, участвующие во взаимодействии с организмом хозяина, отсутствующие у сапрофитных представителей рода. Однако, общее число генов в этом случае также меньше, чем у сапрофитных представителей рода. *L. borgpetersenii*, напротив, мало устойчивы вне организма хозяина и быстро погибают при попадании во внешнюю среду [67]. Между видами лептоспир существуют различия в наборе генов, ассоциированных с патогенностью, в том числе адгезинов, гемолизинов, генов, определяющих способность к защите от иммунной системы хозяина. Степень тяжести заболевания также ассоциирована с систематической принадлежностью возбудителя [13].

Лептоспиры имеют типичную для грамотрицательных бактерий, в том числе спирохет, двумембранную оболочку, включающую наружную мембрану, внутреннюю (цитоплазматическую) мембрану и ассоциированный с ней слой пептидогликана [30]. На поверхности наружной мембраны находятся молекулы липополисахарида, последовательность боковых углеводных цепей которого характеризуется высокой вариабельностью. Как наружная, так и внутренняя мем-

браны содержат липопротеины [58]. В наружной мембране найден также ряд трансмембранных порообразующих белков [68].

Наружная мембрана лептоспир участвует во взаимодействии как с внутренней средой организма хозяина, так и с окружающей средой. Ее структуры непосредственно задействованы в процессах инвазии, колонизации, защиты от иммунной системы, получении ряда веществ из внешней среды и регуляции. Кроме того, ряд структур наружной мембраны являются иммуногенными, что позволяет использовать их в качестве антигенов для выявления антител к возбудителям лептоспироза, а также компонентов вакцин. В данном обзоре освещаются полученные к настоящему времени сведения о составе наружной мембраны патогенных представителей рода *Leptospira* как с позиции биологии патогена, так и с позиции возможного практического применения для диагностики и профилактики лептоспироза знаний, имеющихся в данной области.

Основные компоненты наружной мембраны лептоспир

При оценке содержания белковых молекул в наружной мембране лептоспир было установлено, что среднее количество белковых молекул на мкм^2 у вирулентных штаммов *L. interrogans* сероварианта *grippotyphosa* составляет в среднем 443 молекулы, в то время как у аттенуированных это количество повышается более чем в два раза и составляет в среднем 990 молекул. Содержание белковых молекул в наружной мембране лептоспир значительно ниже, чем у ряда других микроорганизмов, например количество белковых молекул в наружной мембране *E. coli* составляет 6000–10 000 молекул на мкм^2 [37]. В целом, белковый состав наружной мембраны лептоспир консервативен, однако возможны вариации, в частности, исследование изолятов, выделенных на острове Барбадос показало, что внутри серовариантов *bim* и *sorenhageni* существуют некоторые различия по набору белков, прежде всего в составе молекул с молекулярной массой порядка 40 kDa у сероварианта *bim* [16].

Анализ геномных последовательностей выявил 4727 открытых рамок считывания в составе генома *L. interrogans* штамма 56601. 1282 из кодируемых протеинов потенциально являются белками, входящими в состав наружной мембраны: 654 последовательности кодируют белки с сигнальными пептидами, характерными для белков наружной мембраны, 96 содержат участки трансмембранных β -цепей, формирующих баррел, 158 последовательностей включают липопротеиновые сигнальные пептиды [84].

Большая часть описанных в настоящее время белковых молекул наружной мембраны лептоспир, как и других патогенных спирохет,

является липопротеинами [34]. Липопротеины — широко распространенные среди бактерий компоненты мембран. Закрепление липопротеинов в билипидном слое осуществляется за счет остатка жирной кислоты, ковалентно связанного с аминотерминальной аминокислотой (цистеином) [11]. Белковые домены липопротеинов могут быть обращены как в периплазму, так и во внеклеточное пространство, однако внешняя поверхность наружной мембраны более богата липопротеиновыми молекулами по сравнению с внутренней. LipL48 и LipL36 локализованы во внутреннем листке наружной мембраны лептоспир [25]. Lp29, Lp49, LipL40, LipL41, LipL32, MPL36, LIC10494, LIC12730, LIC12922 и LIC12238 и ряд других молекул входят в состав наружной мембраны лептоспир и располагаются на поверхности клеток [34].

Среди обнаруженных в геноме патогенных лептоспир генов, продукты которых являются по структуре липопротеинами, присутствуют гены, кодирующие термолизины, гомологи сфингомиелиназы, фосфолипазы и металлопротеазы, которые могут участвовать в процессах взаимодействия патогена с организмом хозяина. Липопротеины наружной мембраны могут также принимать участие в метаболизме клетки лептоспир (глюкозодегидрогеназы, холестерин-оксидазы) и ее защите от воздействия стрессовых условий, например воздействия перекиси водорода (липопротеин, принадлежащий к семейству цитохром-с пероксидаз) [58].

Липопротеины лептоспир перемещаются через периплазматическое пространство с участием системы сортировки липопротеинов Lol. В процессе созревания липопротеины проходят цитоплазматическую мембрану, к ним присоединяется остаток жирной кислоты, после чего они принимают свою конформацию, распознаются системой T2SS и переносятся на поверхность наружной мембраны через поры, образованные GspD [34]. При созревании происходит удаление сигнальных последовательностей, поэтому липопротеины, как правило, имеют сайты распознавания пептидазы II, а их фактическая молекулярная масса отличается от предсказанной. В состав липопротеинов, в частности, LipL41 входят две сигнальные последовательности — в N-терминальном и C-терминальном участках. Сигнальные последовательности липопротеинов лептоспир отличаются по составу от сигнальных последовательностей, характерных для липопротеинов *E. coli*. Эти отличия ограничивают возможность их экспрессии в клетке *E. coli* как для экспериментальных, так и для практических целей [72].

Установлено, что некоторые липопротеины могут существовать в различных изоформах. Липопротеин LipL36, содержащийся во внутреннем слое наружной мембраны лептоспир обнаружен в виде изоформы с большей молеку-

лярной массой, pL50. LipL32 — липопротеин, являющийся основным белковым компонентом наружной мембраны лептоспир, представлен широким спектром изоформ, как входящих в состав мембраны, так и секретлируемых во внеклеточное пространство. На поверхности наружной мембраны лептоспир выявлено только две изоформы LipL32. Одна из них — полноразмерная изоформа, а вторая — изоформа с молекулярной массой 16 kDa, LipL32.16 [21].

При исследовании вариабельности генов, кодирующих липопротеины наружной мембраны лептоспир, было установлено, что среди них есть как высококонсервативные по своей структуре последовательности, так и, в той или иной мере, вариабельные. Большинство замен, обнаруженных у разных видов лептоспир в генах *lipL32* и *lipL41* синонимичны [36]. Ген *ligB* отличается большей вариабельностью, чем гены *lipL41* (9%) и *lipL32* (3%). Различия в его последовательности между штаммами лептоспир превышают 15% [15]. Таким образом, эволюционное давление стабилизирует структуру некоторых белков наружной мембраны, в то время как другие могут быть в той или иной мере вариабельны, и их вариабельность может быть связана с адаптацией к различным хозяевам и условиям обитания. Возможен также обмен генетической информацией в природных условиях между видами лептоспир, затрагивающий гены липопротеинов, однако механизм этого процесса не установлен. Обнаружен межвидовой горизонтальный перенос гена *lipL41* между видами *L. borgpetersenii* и *L. interrogans* [36].

В геноме *L. biflexa* отсутствуют последовательности, сходные с характерным для патогенных лептоспир геном *lipL32*, а также генами, кодирующими LipL41, LipL36 и LipL45. Однако, ген, кодирующий липопротеин LipL21, экспрессирующийся у патогенных лептоспир во время развития инфекции, имеет ортолог в геноме *L. biflexa* [67].

Кроме липопротеинов, закрепленных в мембране лептоспир за счет ковалентно связанных остатков жирных кислот, встраивающихся в билипидный слой, в состав наружной мембраны входят интегральные белки. Характерной особенностью интегральных белков наружной мембраны является то, что они встроены в нее за счет множества прошивающих ее амфипатических (не гидрофобных) доменов, являющихся по структуре β -цепями и формирующих структуру «баррела».

По сравнению с бактериями кишечной группы, содержание этих молекул в наружной мембране лептоспир снижено. Таким образом, наружная мембрана становится дополнительным барьером, ограничивающим поступление в клетку лептоспир различных веществ, как необходимых для роста, так и потенциально опас-

ных для микроорганизма. Сниженная проницаемость наружной мембраны для питательных веществ рассматривается как один из возможных факторов, ограничивающих скорость роста лептоспир, характеризующихся длительным временем удвоения (до 18 часов в культуре). Однако, несмотря на этот барьер, лептоспиры способны выживать в среде с низким содержанием питательных веществ [31].

Анализ генома *L. interrogans* выявил 83 гена трансмембранных белков, содержащих участки β-цепей, формирующих баррел, однако из них в настоящее время выделена и описана лишь незначительная часть. Среди генов гипотетических трансмембранных белков, выявлены гены бактериальных липаз, шаперонина, неспецифических поринов, гидролазы, сигнальных пептидаз, полисахарид-деацетилаз, транспортеров жирных кислот, аминокислот, а так же гены белков, обеспечивающих секрецию [84].

Первым описанным трансмембранным белком в составе наружной мембраны лептоспир был OmpL1. Молекула OmpL1 содержит 5 участков, расположенных на поверхности клеток лептоспир и 7 трансмембранных доменов [24]. OmpL1 является порином и присутствует в наружной мембране лептоспир в виде тримера. OmpL1 включает типичную для грамотрицательных бактерий лидерную последовательность, содержащую сайт распознавания пептидазы 1, расщепление по которому сопровождается прохождением молекулой цитоплазматической мембраны. С-терминальный сегмент имеет высокий уровень сходства с С-терминальным сегментом поринов грамотрицательных бактерий [34]. Низкий уровень экспрессии OmpL1 и его прочная связь с липополисахаридом могут быть ограничением при его очистке [71].

Уровень варибельности гена *ompL1* высок и достигает 15%. Большая часть однонуклеотидных замен в составе гена *ompL1* приводит к аминокислотным заменам в составе белка [36]. 86% варибельных аминокислот в составе *ompL1* локализованы в участках, находящихся на наружной поверхности мембраны [34]. На основании анализа гена *ompL1* у лептоспир различных видов выделено 3 типа его структуры. Показано, что перекрестный протективный эффект при иммунизации морских свинок молекулами OmpL1 каждого типа и последующем заражении лептоспирами с геном *ompL1*, относящимся к другому типу несколько ниже, чем при заражении лептоспирами с тем же типом *ompL1* [24]. В структуре гена *ompL1* были обнаружены мозаичные паттерны, образование которых обусловлено горизонтальным переносом участков данного гена. Ген *ompL1* мозаичной структуры был найден у *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* и *L. borgpetersenii* [36].

В последствие были найдены другие трансмембранные белки: OmpL36, OmpL37, OmpL47

и OmpL54. В составе OmpL36, OmpL47 и OmpL54 содержится восемь трансмембранных доменов, в то время как в составе OmpL37 — шесть [68].

В составе наружной мембраны лептоспир найдены интегральные TonB-зависимые белки, осуществляющие энергозависимый транспорт различных молекул. В геноме лептоспир присутствуют гены, кодирующие транспортеры, участвующие в выведении из клетки гемолизонов и прошедших через мембрану молекул антимикробных препаратов (ортолог гена *tolC*), а также катионов металлов (ортологи гена *cusC* и генов семейства *czc*), осуществляющие перенос ионов через мембрану за счет антипорта с протонами [58].

Трансмембранные белки наружной мембраны могут участвовать в развитии лептоспирозной инфекции как адгезины, антигенные детерминанты, рецепторы к различным молекулам организма хозяина. Также трансмембранные белки могут выполнять функцию поринов [68].

Липополисахарид лептоспир: особенности структуры и взаимодействие с иммунной системой хозяина

На поверхности наружной мембраны лептоспир, в отличие от других патогенных спирохет, таких как *Treponema pallidum*, *Treponema denticola* и *Borrelia burgdorferi* располагается слой липополисахарида (ЛПС). Липополисахарид лептоспир в целом схож по структуре с липополисахаридом других грамотрицательных бактерий [82].

Липид А, ответственный, в том числе, за токсический эффект ЛПС, является гидрофобной структурой, обеспечивающей закрепление молекул ЛПС в мембране, представляющей из себя дисахарид с присоединенными к нему остатками жирных кислот, количество которых может быть различным. В составе липида А лептоспир присутствует четыре остатка жирных кислот, в том числе двух ненасыщенных углеродных цепей, более длинных, чем в у энтеробактерий. Также отличительной особенностью является потеря фосфорных остатков, как правило, присоединенных у бактерий к дисахариду. Однако эти черты строения липида А не являются уникальными для лептоспир. Более редкая особенность, присущая липиду А лептоспир — метилирование однофосфатных остатков в его составе; в настоящее время сходной структуры у других микроорганизмов не обнаружено [54].

Крайне высокая варибельность структуры ЛПС обуславливает существование большого количества серогрупп и серовариантов патогена [12]. При исследовании ЛПС лептоспир различной серогрупповой принадлежности с использованием гелеэлекторофореза было установлено,

что ЛПС каждого сероварианта образует несколько индивидуальных для него полос в геле, наименьшая из которых у патогенных лептоспир располагается на уровне, соответствующем, в среднем, 20 kDa. Полоса такой величины у сапрофитных лептоспир отсутствует [19].

При сборке молекулы ЛПС формирование О-антигена идет на липидном носителе [12]. Для синтеза ЛПС и вывода его на поверхность наружной мембраны необходимы специальные системы. Гены, кодирующие ферменты, отвечающие за этот процесс, формируют кластер *rfb*, состав которого может варьировать. Сравнение этого локуса лептоспир вида *L. borgpetersenii*, сероварианта *hardjo* и вида *L. interrogans* сероварианта *hardjoprajitno* (данные сероварианты принадлежат к серогруппе *Hardjo*), показало, что у лептоспир вида *L. interrogans* этот локус больше на один ген и включает 32 открытых рамки считывания, в то время как аналогичный локус *L. borgpetersenii* — 31. Сопоставление локуса *rfb* *L. interrogans* сероварианта *hardjoprajitno* и *L. interrogans* сероварианта *sorenhageni* показывает высокий уровень сходства. Наиболее вероятно, что изначально локусы сероварианта *hardjoprajitno* и сероварианта *sorenhageni* произошли от общего предшественника, а участки локуса, характерные для серогруппы *Hardjo* были получены им от лептоспир вида *L. borgpetersenii* сероварианта *hardjobovis* путем горизонтального переноса [66].

Однако вариабельность ЛПС обусловлена не только изменчивостью локуса *rfb*. Исследование его последовательности у лептоспир серовариантов *sorenhageni* и *lai* серогруппы *Icterohaemorrhagiae* вида *L. interrogans*, показало, что он включает в обоих случаях 40 kbp, и все немногочисленные замены в нем не влияют на структуру кодируемых ферментов. Предположительно, в этом случае различия в структуре ЛПС связаны с различиями в составе генов семейства *degT*, участие которых в биосинтезе ЛПС также было показано [58].

ЛПС лептоспир обладает менее выраженным воспалительным и цитотоксическим эффектом, по сравнению с ЛПС представителей кишечной группы. Он не вызывает значительного изменения температуры тела при введении кроликам и не приводит к вакуолизации и нарушению структуры мембран при обработке фибробластов в клеточной культуре. Однако при воздействии раствора, содержащего ЛПС на эритроциты, происходила их агглютинация и изменение формы (клетки сморщивались с образованием зубчатого края) [81]. С другой стороны, введение ЛПС мышцам приводило к изменениям в репертуаре поверхностных маркеров в лимфоцитах селезенки и повышению экспрессии TNF α [40]. Также он вызывал кровоизлияния и некрозы, однако, не столь выраженные, как ЛПС кишечной палочки в эквивалентных дозах. Патоло-

гические изменения тканей были обнаружены у мышей через 24 часа после введения в различных органах, в том числе кишечнике, селезенке и легких, причем некроз был более выражен у животных, получивших дозы ЛПС, превышающие 2 мг. Также наблюдался некроз печени (на 7 день), чего не происходило при воздействии ЛПС *E. coli*. Летальная доза LD₅₀ ЛПС для мышей составляла 3,4 мг на организм, что в 12 раз меньше аналогичного показателя для ЛПС кишечной палочки [41].

ЛПС лептоспир, как и всех грамотрицательных бактерий, активизирует системы резистентности макроорганизма. Однако существуют отличия в механизме этого процесса между лептоспирами и типичными грамотрицательными микроорганизмами, например представителями кишечной группы. ЛПС стимулирует активность макрофагов через рецепторы CD14 и Toll-подобный рецептор 2 (TLR2), играя основную роль в процессе их активации. Однако центральный компонент системы распознавания ЛПС грамотрицательных бактерий, TLR4, не участвует в клеточном ответе на инфекцию *L. interrogans* у человека [81]. ЛПС лептоспир активизирует клетки человека через гетеродимеры TLR2 и hTLR1 (но не TLR2/TLR4). Среди других патогенных бактерий также известны случаи, когда распознавание ЛПС происходит через рецепторы TLR2, в частности *Legionella pneumophila* и *Helicobacter pylori*. В обоих случаях строение липида А является нетипичным [54].

In vitro было показано различие во взаимодействии с очищенным липидом А патогенных лептоспир между моноцитами человека THP1-CD14 и макрофагами мыши RAW264.7. В клетках человека, в отличие от клеток мыши, не происходило продукции TNF, IL-8 и IL-10 в ответ на внесение в среду очищенного липида А лептоспир (выделение этих факторов воспаления было, однако, отмечено в присутствии липида А *E. coli*) [54].

В экспериментах на мышах, мутантных по гену, кодирующим TLR2 и TLR4, было установлено, что у мышей распознавание липида А лептоспир осуществляется только через рецепторы TLR4, в то время как распознавание полной молекулы ЛПС не нарушается у мышей, мутантных по этому гену.

Липид А лептоспир, в отличие от полной молекулы ЛПС, не способен активировать клетки человека. Неспособность комплекса рецепторов TLR2/TLR4 на поверхности моноцитов/макрофагов человека распознавать ЛПС лептоспир является одной из возможных предпосылок более высокой восприимчивости человека к лептоспирозной инфекции и более тяжелого ее течения [17, 80].

Показана изменчивость ЛПС у одного и того же штамма в зависимости от того, в какой форме протекает инфекция (хроническая или острая).

Разные лабораторные животные в различной степени восприимчивы к лептоспирозной инфекции. Если для морских свинок характерно острое течение инфекции, часто ведущее к гибели животного, то у крыс лептоспироз, как правило, протекает в хронической форме. Это сделало возможным сравнение структуры ЛПС лептоспир одного штамма при различных формах инфекции после введения его морским свинкам и крысам. В первом случае лептоспиры были выделены из печени, а во втором случае происходило размножение лептоспир в почках, при этом не было обнаружено никаких патологических изменений. Количество ЛПС при острой инфекции снижалось, кроме того, часть полос, образованных окрашенным ЛПС в гельэлектрофорезе при анализе ЛПС культивируемых *in vitro* лептоспир и лептоспир, выделенных при хронической инфекции, отсутствует при аналогичном эксперименте с ЛПС лептоспир, выделенных из тканей эвтаназированных животных при острой инфекции [55].

Между аттенуированными в культуре и вирулентными штаммами наблюдаются различия структуры ЛПС. В составе клеток патогенных форм преобладают липополисахаридоподобные молекулы массой 30 kDa, в то время как у аттенуированных — 20 kDa [37].

Серовароспецифические антитела к ЛПС лептоспир выявляются в реакции микроагглютинации (РМА) с живыми культурами лептоспир. Несмотря на то, что в настоящее время разработано большое количество методов выявления антител к лептоспирам, РМА остается основным методом диагностики лептоспироза. Так как РМА является серовароспецифичной, для диагностики обычно применяются культуры референс-штаммов лептоспир серогрупп, характерных для данной территории [44].

Изменение репертуара белков наружной мембраны в зависимости от условий роста

Изучение влияния условий окружающей среды на белковый состав наружной мембраны лептоспир позволяет более полно понять процессы развития инфекции, адаптации лептоспир к обитанию в организме хозяев различных отрядов и окружающей среде. В настоящее время проведены исследования влияния на экспрессию генов, кодирующих белки наружной мембраны лептоспир ряда факторов, в том числе температуры, осмолярности среды, содержания в среде сыворотки и различных солей. Также оценены изменения репертуара белков наружной мембраны в ходе инфекционного процесса и при аттенуации штамма в культуре.

При повышении температуры с 28 до 37°C и исследовании различий в экспрессии генов с использованием микрочипов было обнаружено

106 генов, уровень экспрессии которых зависит от температуры. Из них только 6 генов кодируют белки наружной мембраны, экспрессия 2 из которых активируется при повышении температуры, а 4 — подавляется [69]. Один из активируемых генов кодирует белок, по функции являющийся рецептором. Установлено, что, в целом, при температуре 30°C белковый состав наружной мембраны более разнообразен [47]. Интересно, что при температуре 37°C снижается экспрессия по крайней мере двух белков, вызывающих иммунный ответ при экспериментальной инфекции с молекулярной массой 36 и 44 kDa. Одним из этих белков является липопропротеин LipL36 (несмотря на то, что было установлено, что его синтез подавляется во время инфекции, по крайней мере, при колонизации почек). В данном случае, культивирование при повышенной температуре продолжалось несколько суток, чтобы исключить из анализа белки, ассоциированные с тепловым шоком [56].

Еще один возможный сигнал, воспринимаемый лептоспирами и говорящий о том, что патоген проник в организм хозяина, является изменение химического состава среды. В качестве модельного эксперимента для оценки влияния этого фактора проводилось культивирование лептоспир на среде с повышенным содержанием сыворотки, а так же на среде с пониженным содержанием железа. Экспрессия рL24 значительно снижается как при 37°C, так и в присутствии фетальной сыворотки [21]. Синтез фактора вирулентности Loa22 и гликозил-гидролазы, участвующей в процессах деградации внеклеточного матрикса и проникновении патогенна в клетки хозяина активируется при культивировании лептоспир на среде с пониженным содержанием железа в присутствии фетальной сыворотки [25]. Присутствие в среде фетальной сыворотки активирует синтез LigB (как и повышение осмолярности среды и температуры культивирования). Однако, из 168 генов, уровень экспрессии которых меняется при внесении в среду сыворотки, только лишь незначительное количество кодирует белки наружной мембраны [65].

Внесение в среду солей (в том числе NaCl), и, как следствие, повышение ее осмолярности активирует транскрипцию генов LigA и LigB, при этом увеличивается количество как мембранных, так и растворимых молекул LigA, причем активация синтеза растворимой формы более выражена. Такого эффекта не наблюдается при внесении в среду KCl или Na₂SO₄ [50].

Анализ белкового состава мембран лептоспир, вирулентность которых поддерживалась в пассажах на хомяках показал, что OmpL1, LipL31, LipL32/Hap-1, LipL41, LipL45, LipL21, LruA/LipL71 и Loa22 экспрессируются в ходе инфекции, кроме того был идентифицирован белок LipL46, и несколько других, ранее не описанных

белков, содержащих сигнальные последовательности, характерные для белков наружной мембраны [78, 53]. При острой инфекции у морских свинок установлена экспрессия OmpL1, LipL41 и LipL21. Loa22 экспрессируется как в культуре, так и при острой инфекции, однако у лептоспир, размножающихся в организме хозяина уровень экспрессии данного протеина значительно возрастает. Экспрессия OmpL1, LipL41 и LipL32 в почечных канальцах инфицированных лабораторных животных установлена методом иммуногистохимии [32].

В ходе роста культуры также отмечены качественные различия в составе белков наружной мембраны. Содержание LigA в составе наружной мембраны значительно снижается при достижении культурой стационарной фазы роста, в то время как LigB выявляется на протяжении всех фаз роста культуры. Уменьшение количества молекул LigA в наружной мембране лептоспир происходит за счет более интенсивного синтеза растворимой формы LigA и ее секреции в среду [50].

При анализе наружной мембраны лептоспир было установлено, что при культивировании на питательной среде синтезируются LigA, OmpL1, LipL41, LipL21, LipL36, LipL32, LipL31 и LipL45, а так же, по крайней мере еще один порин, четыре ранее не описанных липопротеина, две мембранные помпы, предшественники пенициллин G ацилазы и С-терминальной протеазы, участвующей в созревании белков. В культуре наиболее высокий уровень экспрессии LipL36 наблюдается в ранней логарифмической фазе [33].

Регуляция синтеза тех или иных молекул происходит не только на уровне транскрипции, но и на уровне посттрансляционных модификаций. Установлено, что набор изоформ LipL32 у лептоспир в культуре и в организме хозяина различается [57]. Процессинг LipL32 строго ассоциирован с условиями окружающей среды. При температуре 30–37°C наблюдались все описанные изоформы этого липопротеина (LipL32.26, LipL32.24, LipL32.23a,b,c, LipL32.22, LipL32.16 и LipL32.14a,b) в равном содержании. При понижении температуры до 20°C, содержание изоформы LipL32.26 значительно снижается, однако аналогичный эффект наблюдается и при внесении в среду фетальной сыворотки. В присутствии сыворотки также падает содержание изоформ LipL32.24, LipL32.23a,b,c и LipL32.22. При снижении содержания железа в среде, только две изоформы LipL32.23a и LipL32.22 были обнаружены при анализе белкового состава наружной мембраны. Образование изоформ связано с сокращением размера С-концевого домена [21]. Липопротеин LipL45 обнаружен в двух изоформах: у лептоспир при культивировании в первых пассажах экспрессируются обе изоформы — полноразмерная изоформа (45 kDa), локализованная на внутренней мембране и изоформа

с молекулярным весом 31 kDa. Вторая изоформа представляет собой белок, локализованный на поверхности клетки и непрочно связанный с ней. В более поздних пассажах экспрессируется только вторая изоформа, содержание которой возрастает при достижении культурой стационарной фазы [51].

Белки лептоспир, ассоциированные с патогенностью

На основании секвенирования полных геномов 3-х штаммов серовариантов *icterohaemorrhagiae*, *coropenhageni* и *hardjo* было выявлено более 200 генов, продукты которых ассоциированы с патогенностью, в том числе различные белки, входящие в состав наружной мембраны. Однако сравнительно небольшая часть белков, ассоциированных с патогенностью, выделена и описана с точки зрения их функционального значения [58]. Для ряда таких белков показано, что они синтезируются только в организме хозяина, и их экспрессии при культивировании не происходит [5].

Из описанных белков наружной мембраны, ассоциированных с патогенностью лептоспир, большинство является адгезинами участвующими в связывании молекул сыворотки крови или внеклеточного матрикса тканей организма хозяина, однако также найдены цитотоксины и гемолизины [43].

Адгезины необходимы для колонизации организма хозяина. У лептоспир описано большое количество таких молекул, специфичных к различным компонентам внеклеточного матрикса хозяина. Гены некоторых адгезинов являются паралогичными и образуют семейства генов, продуктами которых являются адгезины с различной специфичностью. С точки зрения исследования распределения между видами и штаммами генов, ассоциированных с теми или иными особенностями течения заболевания, гены, кодирующие белки, задействованные в специфической адгезии, вызывают наибольший интерес, поскольку их набор может быть связан со способностью к колонизации тех или иных органов лептоспирами.

Для белков лептоспир, обеспечивающих адгезию, характерно взаимодействие с различными типами молекул внеклеточного матрикса, например LigB связывает фибронектин, а также, за счет иммуноглобулиноподобных доменов, эластин и тропоэластин, связывание разных молекул происходит за счет различных участков адгезина [34].

В геноме лептоспир было обнаружено несколько генов сходной структуры, кодирующих липопротеины, в состав которых входит иммуноглобулиноподобный домен [42]. Эти гены были объединены в семейство *lig* (*Leptospiral immunoglobulin-like*). Первым из обнаруженных

генов данного семейства был *ligA*, кодирующий адгезин LigA, отличительной чертой которого является наличие 12 и более повторов (количество может варьировать), содержащих 90 аминокислотных остатков каждый [62]. Также были описаны гены *ligB* и *ligC*, причем последний был сначала обнаружен в виде псевдогена (у лептоспир видов *L. kirschneri* и *L. interrogans*), образовавшегося из полноценного гена путем сдвига рамки считывания и возникновения стоп кодона в кодирующей части. В настоящее время показано, что гены семейства *lig* являются паралогами, возникшими при дупликации гена *ligB*, который обнаружен у всех патогенных лептоспир, в отличие от генов *ligA* и *ligC* [57]. Основная функция адгезинов Lig заключается в адгезии к фибронектину, однако они не являются единственными фибронектин-связывающими белками, и, кроме того, способны к взаимодействию с другими компонентами внеклеточного матрикса [18]. В частности, LigB взаимодействует с эластином, а также его предшественником, тропоэластином [45].

Общей чертой адгезивных молекул семейства Len (leptospiral endostatin-like proteins) является наличие структуры, сходной с эндостатином — белком, присутствующем в организме хозяев лептоспир, одним из свойств которого является способность к взаимодействию с белками внеклеточного матрикса, в том числе ламинином. Было зарегистрировано связывание LenA с ламинином, а также менее активное взаимодействие с коллагеном IV и клеточным фибронектином [8]. LenA был также описан как компонент мембраны лептоспир, связывающий фактор H и препятствующий активации белков каскада комплемента по альтернативному пути [77]. Анализ последовательности этого гена показал, что среди лептоспир вида *L. interrogans* у серовариантов *lai*, *sorenhageni*, *grippotyphosa* и *hardjo* LenA является липопротеином, ассоциированным с мембраной, а у серовариантов *romana*, *bratislava* и *canicola* мутация нарушает структуру липобокса, но последствия этого не ясны. Протеин найден у всех исследованных серогрупп патогенных лептоспир [75].

Впоследствии было обнаружено семейство генов, происходящих от одного предшественника с геном, кодирующим LenA. Продукты этих генов различаются по способности связывать те или иные компоненты внеклеточного матрикса и фактор H. LenC, LenE и LenF отличаются более выраженным сродством к ламинину, чем LenD, LenB и LenA. Помимо этого LenC, LenE и LenF более активно связывают фибронектин [75].

В геноме лептоспир были найдены гены, кодирующие белки семейства Tly A, B, C, сходные с гемолизинами других организмов, однако гемолитическая функция их не была доказана, тем не менее, белок Tly C локализован на поверхности клеток лептоспир и способен связывать

молекулы внеклеточного матрикса, в том числе ламинин, коллаген IV и фибронектин, и, вероятно, задействован в процессе адгезии лептоспир к межклеточному веществу [14].

Кроме семейств адгезивных белков, у лептоспир найден ряд адгезинов, гены которых не являются паралогами, в том числе Lsa21 (leptospiral surface adhesin of 21 kDa) — фактор адгезии, имеющий сродство к широкому спектру компонентов внеклеточного матрикса [7], и липопротеин наружной мембраны лептоспир, Lsa27, который специфично взаимодействует с ламинином [52].

Обнаружен ряд белков, в том числе LipL32, Lp29, Lp49, LipL40, MLP36, LIC10494, LIC12730 и LIC12238, которые способны к взаимодействию с плазминогеном. Белки лептоспир, взаимодействующие с плазминогеном не сходны по структуре, то есть их гены не являются паралогичными. Плазминоген, связанный на мембране клеток лептоспир конвертируется в энзиматически активный плазмин за счет дополнительных активаторов, в результате чего этот протеолитически активный фермент участвует в процессах деградации внеклеточного матрикса и инвазии патогена в ткани хозяина [79].

Была показана способность липопротеина LipL32 к взаимодействию с некоторыми компонентами внеклеточного матрикса, в том числе ламинином, коллагеном I и коллагеном V. Однако, последовательностей, схожих с ранее описанными сайтами, участвующими в адгезии к молекулам внеклеточного матрикса в его составе обнаружено не было [32]. Установлена также способность липопротеина LipL32 к связыванию коллагена IV, основного компонента базальных мембран, и сывороточного фибронектина. Активность этого взаимодействия значительно ниже, чем у других адгезинов, например белков семейства Lig. Взаимодействие с коллагеном IV и фибриногеном осуществляется за счет C-терминального домена [38].

Ряд проявлений лептоспироза, в том числе геморрагический синдром при нарушении целостности стенок сосудов, связан с наличием у лептоспир ферментов, обладающих цитотоксическим и гемолитическим эффектом. LipL32 (вернее одна из его изоформ) был описан как секретлируемый белок, ассоциированный с гемолизином (Hemolysin-associated protein, Har1), и была установлена его гемолитическая активность против эритроцитов человека и собаки [44].

Для развития лептоспирозной инфекции и поддержания жизнеспособности лептоспир в организме хозяина необходимо поступление ионов железа в клетку патогена. У лептоспир найдено 2 протеина, способных связывать гемин. HbpA (Hemin-binding protein) — белок наружной мембраны лептоспир, геминный рецептор, осуществляющий перенос через наружную мембрану железа в форме Fe³⁺, входящего в состав

гемина, однако механизм этого процесса пока не ясен. Этот поверхностный белок представлен не у всех патогенных лептоспир. Ген его был обнаружен только у вида *L. interrogans*, в то время как он отсутствует у *L. kirschneri* и *L. borgpetersenii*, а также у непатогенных видов [58]. Вторым протеином наружной мембраны, способным к связыванию гемина, является липопротеин LipL41, присутствующий не только у патогенных, но и у сапрофитных лептоспир [6].

Присутствие и распространение лептоспир в кровяном русле в начале инфекции обусловлено их способностью блокировать активацию комплемента по альтернативному пути, связывая на поверхности клетки сывороточный белок, известный как фактор Н. Этот белок взаимодействует с компонентом каскада комплемента С3b и является кофактором фактора I, инактивирующего этот компонент. Фактор Н может закрепляться на остатках сиаловой кислоты, входящих в состав поверхностных гликопротеинов клеток хозяина, защищая их от эффекта активации С3 [76]. Первым описанным белком лептоспир, связывающим фактор Н, был LfhA/LenA [77]. Кроме того, обнаружена способность другого белка того же семейства, LenB, к взаимодействию с этим фактором. Из всего семейства генов *len* только *lenA* и *lenB* кодируют белки, способные к взаимодействию с фактором Н [74].

Не отмечено влияние протеинов наружной мембраны лептоспир на жизнеспособность эмбриональных клеток проксимального почечного канальца мыши в культуре, однако внесение их в среду вызывает активацию экспрессии рецепторов TLR2, а так же белков MCP-1 и IL-8, причем этот процесс происходит за счет активации рецепторов TLR2, но без участия рецепторов TLR4 [39]. Одним из белков, присутствие которых ведет к активации клеток, является LipL32, синтез которого патогеном в ходе инфекции может быть одним из факторов, ведущих к развитию тубулоинтерстициального нефрита [83].

Антигенные белки наружной мембраны лептоспир

Расположенные на поверхности клетки лептоспир белки экранированы молекулами ЛПС. Тем не менее, в ходе инфекции к ним вырабатываются специфические антитела. Показано перекрестное распознавание белков иммунными сыворотками зараженных животных между лептоспирами различных серогрупп. Однако в репертуаре иммуногенных белков были обнаружены некоторые различия [10]. Примером белковой антигенной молекулы, характерной для узкой группы микроорганизмов рода *Leptospira* является Lsa27, обнаруженный только у лептоспир серогрупп *Copenhageni* и *Icterohaemorrhagiae* вида *L. interrogans* [48] В составе наружной мембраны

лептоспир вида *L. fainei*, сероварианта *hurstbridge* не найден липопротеин LipL41. Отличительной чертой сероварианта *lai* является наличие антигенного белка с массой более 94 kDa, не найденного у лептоспир других серовариантов [25]. Однако, большая часть антигенных белков присутствует у всех лептоспир, в частности белки с молекулярной массой 95, 60, 50, 42,7, 40, 38, 32 и 25 kDa [10]. При исследовании специфичности сывороток больных к белкам LipL21, LipL32 и OmpL1 было установлено, что антитела, присутствующие в сыворотке больных распознают данные белки *L. interrogans* сероварианта *lai* вне зависимости от вида лептоспир, которыми была вызвана инфекция у пациента [85]. Таким образом, все разнообразие белковых антигенов лептоспир можно разделить на четыре группы.

1. Антигенные белки, обнаруженные у всех изученных штаммов, в том числе непатогенных (p62, p76 — белки теплового шока, не являются белками наружной мембраны).
2. Антигенные белки, присутствующие у всех изученных штаммов патогенных лептоспир (p31, p32, p41/42, p45 и p82).
3. Антигенные белки, найденные у большинства патогенных представителей рода (p48 и p58).
4. Антигенные белки, найденные у единичных штаммов (p37 и p25) [29].

Ко второй из перечисленных групп относится большая часть описанных у лептоспир в настоящее время белков наружной мембраны.

При анализе взаимодействия белков, выделенных из культур лептоспир, с сыворотками экспериментальных животных, установлено, что наиболее интенсивным является взаимодействие с молекулами наружной мембраны, имеющими молекулярную массу 41, 32 и 25 kDa [4].

В ходе инфекции изменяется паттерн экспрессии белковых молекул, обладающих антигенными свойствами. Показаны различия в специфичности сывороток, полученных от хомяков, инфицированных лептоспирами из культуры и непосредственно биологическим материалом от зараженных лабораторных животных. Только сыворотки хомяков, которые были заражены лептоспирами, культивируемыми *in vitro*, распознают белок LipL36, однако его экспрессии в клетках лептоспир, колонизирующих почки, не обнаружено [9]. В экспериментальной модели лептоспироза на крысах показано, что при хроническом течении лептоспироза, характерном для этих животных, синтез антигенных белковых молекул подавляется [39].

При аттенуации штамма в ходе культивирования происходит изменение паттерна экспрессии антигенных молекул. Антигены, экспрессирующиеся как аттенуированными, так и вирулентными штаммами имеют молекулярную массу 41 и 44 кДа. Антиген с молекулярной массой 30 kDa

строго ассоциирован с вирулентными штаммами [37]. Уровень экспрессии LipL21 также не изменяется при аттенуации штамма [22]. Белки наружной мембраны с молекулярной массой 32, 45 и 61 kDa экспрессируются в течение инфекции и вызывают формирование специфических антител [57].

Белки наружной мембраны лептоспир могут быть использованы как компоненты диагностических систем для выявления антител к лептоспирам, а также как компоненты вакцин. Однако получение этих белков из клеток лептоспир затруднено из-за медленного роста этих организмов. Более предпочтительным является использование белков из рекомбинантных штаммов *E. coli*, бактерии с высокой скоростью удвоения, менее требовательной к условиям культивирования, чем лептоспира. В состав диагностических систем входят молекулы липопротеина LipL32 [23, 76], консервативные домены иммуноглобулиноподобных белков LigA и LigB [20, 61], молекулы липопротеинов LipL32, LipL45, LipL41 и порина OmpL1 [4], белков наружной мембраны MPL17 и MPL21 [60], а так же рекомбинантная белковой молекулы, включающей эпитопы порина OmpL1 и липопротеинов LipL21 и LipL32 [46]. Рекомбинантные протеины, такие как LipL32 и LipL41 полученные из трансформированных штаммов *E. coli*, при использовании в качестве антигенов для ИФА обеспечивают большую чувствительность при выявлении антител к лептоспирам по сравнению с РМА [74]. Недостатком диагностических систем, основанных на выявлении антител к LipL32 и LipL41, является возможность перекрестной реакции с сыворотками больных сифилисом и болезнью Лайма, а так же вирусным гепатитом [28].

Использование тест-систем на основе ИФА является предпочтительным, по сравнению с РМА, так как не требует наличия живых культур референс-штаммов. Применение фрагмента молекулы LigA и порина OmpL1 в качестве антигенов для ИФА делает диагностику более точной, поскольку антител к этим антигенам при вакцинации не вырабатывается. Титр антител выявляющихся в РМА после вакцинации может достигать уровня, сопоставимого с титром антител при острой инфекции [63, 59]. Антитела к LigB также ассоциированы с острым течением лептоспироза, их содержание в сыворотке в период реконвалесценции падает быстрее, чем содержание антител, выявляемых в РМА [20].

Для более эффективной и специфичной очистки рекомбинантного белка можно вводить в геном трансформируемой кишечной палочки фьюжн-конструкцию, содержащую помимо гена целевого продукта участок какого-либо гена другого организма обеспечивающий связывание молекулы со специфическими лигандами, например ген глутатион-S-трансферазы (GST).

Использование такой фьюжн-конструкции позволяет быстро и высокоспецифично очищать рекомбинантный белок путем его связывания с закрепленным на носителе глутатионом [46]. Этот подход был применен для очистки рекомбинантных фрагментов гена *ligB* и *ligA* [61], порина OmpL1 [59], липопротеинов LipL41 и LipL36, шаперона gHsp58 [70].

Кроме фьюжн-конструкции для очистки белка может использоваться более простая его модификация. Методика, позволяющая очищать белок на гранулах сефарозы, связанной с никелем, требует прикрепления к рекомбинантному гену небольшой последовательности, кодирующей полигистидиновый участок. Последовательное отмывание сорбента в растворе имидазола повышающейся концентрации и элюция раствором имидазола, содержащем Tris-HCl и NaCl позволяет получить очищенный белок. Таким образом, были созданы рекомбинантные липопротеины наружной мембраны MPL17 и MPL21, антигенные свойства которых позволяют использовать их для выявления антител к лептоспирам на ранних стадиях заболевания, когда реакция микроагглютинации еще не дает положительных результатов (Lin X. et al., 2008), и LipL32, который также может применяться в качестве компонента диагностических систем на основе ИФА [23].

Чтобы получить антиген лептоспир, обеспечивающий более высокую чувствительность при выявлении антител, был разработан синтетический рекомбинантный белок, включающий эпитопы белков с наиболее выраженными антигенными свойствами, Lmp. Его последовательность включала в себя эпитопы OmpL1, LipL21 и LipL32 (5 различных последовательностей, по две копии каждой), соединенные линкерами, включающими 4 остатка глицина. Синтетический ген, кодирующий эту структуру, был встроен в плазмиду и перенесен в клетки кишечной палочки. Его применение повышает точность выявления антител, поскольку синтезируемый протеин включает в себя эпитопы различных белковых молекул [27].

В настоящее время проводятся эксперименты по оценке протективного эффекта иммунизации лабораторных животных различными белковыми антигенами лептоспир. Иммунизация хомяков молекулами LigA (как полными молекулами, так и фрагментами молекул, включающими С-терминальный домен), полученными из рекомбинантного штамма *E. coli* давала протективный эффект при последующем заражении лептоспирами. Однако в экспериментальной группе в некоторых случаях наблюдались незначительные патологические изменения, хотя и менее выраженные, чем в контрольной группе. Иммунизация как С-терминальными фрагментами, так и фрагментами, соответствую-

ющими аминокислотным повтором молекулы LigB не давала протективного эффекта [73]. При иммунизация хомяков молекулами LipL41 не происходило развития иммунитета, защищающего животных при заражении лептоспирами от развития инфекции. Эффект иммунизации молекулами OmpL1 также выражен крайне слабо. Тем не менее, иммунизация обоими белками одновременно дает выраженный протективный эффект [35].

Существующие вакцины против лептоспироза включают антиген, полученный из убитых клеток лептоспир, они обеспечивают сероваро-специфический иммунитет, поэтому в их состав входят лептоспиры нескольких серовариантов, наиболее распространенных на данной территории. Использование вакцин, содержащих в качестве антигена очищенные белки, позволило бы снизить побочные эффекты и вырабатывать иммунитет против всего спектра возбудителей лептоспирозов.

Заключение

Наружная мембрана лептоспир содержит широкий спектр белков, в том числе задействованных в процессе патогенеза лептоспирозной инфекции. В настоящее время установлена структура и функция лишь некоторых белковых молекул, входящих в ее состав.

Патогенные лептоспиры различной систематической принадлежности различаются по ряду биологических признаков — устойчивости во внешней среде, оптимальным для роста концентрациям мочевины и других веществ, гостальной специфичности и тяжести вызываемого ими заболевания. Особенности течения заболевания, а так же, возможно, и другие различия между видами и серогруппами лептоспир могут быть ассоциированы с особенностями белкового состава наружной мембраны, поскольку среди белков наружной мембраны выявлены адгезины, термолизины, гомологи сфингомиелиназы, фосфолипазы и металлопротеазы, белки, защищающие клетки лептоспир при окислительном стрессе. Установлено, что набор адгезинов, присутствующих в наружной мембране лептоспир, варьирует в зависимости от вида. Кроме того, нельзя исключать роли вариативности структуры белковых молекул в изменчивости биологических свойств патогенных лептоспир.

Регуляция белкового состава наружной мембраны лептоспир, в частности при их проникновении в организм хозяина, зависит от изменения различных факторов. Сигналом для экспрессии тех или иных генов могут быть изменение температуры или осмолярности среды, дефицит доступного железа, присутствие тех или иных веществ. При культивировании в лабораторных условиях происходят глубокие

изменения белкового состава наружной мембраны, ассоциированные с утратой вирулентности.

Таким образом, более детальное изучение состава наружной мембраны и его регуляции позволит более четко понять процесс патогенеза лептоспироза и механизмы взаимодействия патогена с организмом хозяина.

С практической точки зрения изучение молекулярного состава наружной мембраны также важно, поскольку применение рекомбинантных антигенных молекул лептоспир в качестве компонентов тест-систем и вакцин позволяет усовершенствовать диагностику и профилактику лептоспирозной инфекции среди людей и животных. Создание на основе генов лептоспир генноинженерных конструкций, при экспрессии которых образуются продукты, включающие антигенные эпитопы различных белковых молекул, и не токсичные при введении в организм, позволит повысить эффективность диагностических препаратов и вакцин.

Список литературы

1. Ананьина Ю.В., Зайцев С.В. Внутривидовая гетерогенность *Leptospira interrogans* по экологическим признакам // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: Материалы конф. — СПб., 1995. — С. 123.
2. Карасева Е.В. Некоторые особенности экологии патогенных лептоспир в естественных условиях природного очага // ЖМЭИ. — 1974. — № 5. — С. 36–40.
3. Куликов В.Н., Токаревич Н.К., Стоянова Н.А., Майорова С.О. Получение родоспецифических рекомбинантных антигенов лептоспир и изучение их активности // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: Материалы конф. — СПб., 2008. — С. 95.
4. Amutha R., Chaudhuri P., Garg A.P., Cheema P.S., Srivastava S.K. Immunoreactive outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Hond Utrecht IV // Indian J. Med. Res. — 2006. — Vol. 124, N 5. — P. 569–574.
5. Artiushin S., Timoney J. F., Nally J., Verma A. Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of *Leptospira interrogans* // Infect. Immun. — 2004. — Vol. 72, N 2. — P. 742–749.
6. Asuthkar S., Velineni S., Stadlmann J., Altmann F., Sritharan M. Expression and characterization of an iron-regulated hemin-binding protein, HbpA, from *Leptospira interrogans* serovar Lai // Infect. Immun. — 2007. — Vol. 75, N 9. — P. 4582–4591.
7. Atzingen M.V., Barbosa A.S., De Brito T., Vasconcellos S.A., de Moraes Z.M., Lima D.M., Abreu P.A., Nascimento A.L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection // BMC Microbiol. — 2008. — Vol. 8. — e70.
8. Barbosa A.S., Abreu P.A.E., Neves F.O., Atzingen M.V., Watanabe M.M., Vieira M.L., Moraes Z.M., Vasconcellos S.A., Nascimento A.L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin // Infect. Immun. — 2006. — Vol. 74, N 11. — P. 6356–6364.

9. Barnett J.K., Barnett D., Bolin C.A., Summers T.A., Wagar E.A., Cheville N.F., Hartskeerl R.A., Haake D.A. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters // *Infect. Immun.* — 1999. — Vol. 67, N 2. — P. 853–861.
10. Brown J.A., LeFebvre R.B., Pan M.J. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans* // *Infect. Immun.* — 1991. — Vol. 59, N 5. — P. 1772–1777.
11. Braun V., Wolff H. The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli* // *Eur. J. Biochem.* — 1970. — Vol. 14, N 2. — P. 387–391.
12. Bulach D.M., Kalambaheti T., de la Peña-Moctezuma A., Adler B. Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis // *Infect. Immun.* — 2000. — Vol. 68, N 7. — P. 3793–3798.
13. Cachay E.R., Vinetz J.M. A global research agenda for leptospirosis // *J. Postgrad. Med.* — 2005. — Vol. 51, N 3. — P. 174–178.
14. Carvalho E., Barbosa A.S., Gómez R.M., Cianciarulo A.M., Hauk P., Abreu P.A., Fiorini L.C., Oliveira M.L., Romero E.C., Gonçalves A.P., Morais Z.M., Vasconcelos S.A., Ho P.L. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity // *FEBS Lett.* — 2009. — Vol. 583, N 8. — P. 1381–1385.
15. 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. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (*lig*) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of *ligB* to typing leptospiral isolates // *J. Med. Microbiol.* — 2009. — Vol. 58, N 9. — P. 1173–1181.
16. Chapman A.J., Everard C.O., Faine S., Adler B. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados // *Epidemiol. Infect.* — 1991. — Vol. 107, N 1. — P. 143–155.
17. Chassin C., Picardeau M., Goujon J.M., Bourhy P., Quellard N., Darche S., Badell E., d'Andon M.F., Winter N., Lacroix-Lamandé S., Buzoni-Gatel D., Vandewalle A., Werts C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans* // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 183, N 4. — P. 2669–2677.
18. Choy H.A., Kelley M.M., Chen T.L., Møller A.K., Matsunaga J., Haake D.A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: *LigA* and *LigB* bind extracellular matrix proteins and fibrinogen // *Infect. Immun.* — 2007. — Vol. 75, N 5. — P. 2441–2450.
19. Cinco M., Banfi E., Panfili E. Heterogeneity of lipopolysaccharide banding patterns in *Leptospira* spp // *J. Gen. Microbiol.* — 1986. — Vol. 132, N 4. — P. 1135–1138.
20. Croda J., Ramos J.G., Matsunaga J., Queiroz A., Homma A., Riley L.W., Haake D.A., Reis M.G., Ko A.I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45, N 5. — P. 1528–1534.
21. Cullen P.A., Cordwell S.J., Bulach D.M., Haake D.A., Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai // *Infect. Immun.* — 2002. — Vol. 70, N 5. — P. 2311–2318.
22. Cullen P.A., Haake D.A., Bulach D.M., Zuerner R.L., Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species // *Infect. Immun.* — 2003. — Vol. 71, N 5. — P. 2414–2421.
23. Dey S., Mohan C.M., Ramadass P., Nachimuthu K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA // *Indian J. Med. Res.* — 2008. — Vol. 128, N 2. — P. 172–177.
24. Dong H., Hu Y., Xue F., Sun D., Ojcius D.M., Mao Y., Yan J. Characterization of the *ompL1* gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the *OmpL1* protein // *BMC Microbiol.* — 2008. — Vol. 8. — e223.
25. Eshghi A., Cullen P.A., Cowen L., Zuerner R.L., Cameron C.E. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans* // *J. Proteome Res.* — 2009. — Vol. 8, N 10. — P. 4564–4578.
26. Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. — Melbourne: MediSci, 1999. — 272 p.
27. Feng C.Y., Li Q.T., Zhang X.Y., Dong K., Hu B.Y., Guo X.K. Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32–41-OmpL1 vaccines against *Leptospira* // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2009. — Vol. 42, N 9. — P. 796–803.
28. Flannery B., Costa D., Carvalho F.P., Guerreiro H., Matsunaga J., Da Silva E.D., Ferreira A.G., Riley L.W., Reis M.G., Haake D.A., Ko A.I. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39, N 9. — P. 3303–3310.
29. Guerreiro H., Croda J., Flannery B., Mazel M., Matsunaga J., Galvão Reis M., Levett P.N., Ko A.I., Haake D.A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69, N 8. — P. 4958–4968.
30. Haake D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis // *Microbiology.* — 2000. — Vol. 146. — P. 1491–1504.
31. Haake D.A., Champion C.I., Martinich C., Shang E.S., Blanco D.R., Miller J.N., Lovett M.A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding *OmpL1*, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. // *J. Bacteriol.* — 1993. — Vol. 175, N 13. — P. 4225–4234.
32. Haake D.A., Chao G., Zuerner R.L., Barnett J.K., Barnett D., Mazel M., Matsunaga J., Levett P.N., Bolin C.A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection // *Infect. Immun.* — 2000. — Vol. 68, N 4. — P. 2276–2285.
33. Haake D.A., Martinich C., Summers T.A., Shang E.S., Pruetz J.D., McCoy A.M., Mazel M.K., Bolin C.A. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection // *Infect. Immun.* — 1998. — Vol. 66, N 4. — P. 1579–1587.
34. Haake D.A., Matsunaga J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane // *Mol. Microbiol.* — 2010.
35. Haake D.A., Mazel M.K., McCoy A.M., Milward F., Chao G., Matsunaga J., Wagar E.A. Leptospiral outer membrane proteins *OmpL1* and *LipL41* exhibit synergistic immunoprotection // *Infect. Immun.* — 1999. — Vol. 67, N 12. — P. 6572–6582.
36. Haake D.A., Suchard M.A., Kelley M.M., Dundoo M., Alt D.P., Zuerner R.L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves

- horizontal DNA transfer // *J. Bacteriol.* — 2004. — Vol. 186, N 9. — P. 2818–2828.
37. Haake D.A., Walker E.M., Blanco D.R., Bolin C.A., Miller M.N., Lovett M.A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation // *Infect. Immun.* — 1991. — Vol. 59, N 3. — P. 1131–1140
 38. Hoke D.E., Egan S., Cullen P.A., Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata* // *Infect. Immun.* — 2008. — Vol. 76, N 5. — P. 2063–2069.
 39. Hung C.C., Chang C.T., Tian Y.C., Wu M.S., Yu C.C., Pan M.J., Vandewalle A., Yang C.W. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2006. — Vol. 21, N 4. — P. 898–910.
 40. Isogai E., Isogai H., Kubota T., Fujii N., Hayashi S., Indoh T., Takagi S., Miura H., Kimura K. Apoptosis of lymphocytes in mice administered lipopolysaccharide from *Leptospira interrogans* // *Zentralbl. Veterinar-med B.* — 1998. — Vol. 45, N 9. — P. 529–537
 41. Isogai E., Isogai H., Kurebayashi Y., Ito N. Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide // *Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiol Hyg A.* — 1986. — Vol. 261, N 1. — P. 53–64.
 42. Koizumi N., Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity // *Vaccine.* — 2004. — Vol. 22, N 11–12. — P. 1545–1552
 43. Lee S.H., Kim K.A., Park Y.G., Seong I.W., Kim M.J., Lee Y.J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai // *Gene.* — 2000. — Vol. 254. — P. 19–28.
 44. Levett P.N. Leptospirosis // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2001. — Vol. 14, N 2. — P. 296–326.
 45. Lin X., Chen Y., Lu Y., Yan J., Yan J. Application of loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira* // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 63, N 3. — P. 237–242.
 46. Lin X., Chen Y., Yan J., Adler B. Recombinant multi-epitope protein for diagnosis of leptospirosis // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2008. — Vol. 15, N 11. — P. 1711–1714.
 47. Lo M., Cordwell S.J., Bulach D.M., Adler B. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature // *PLoS Negl Trop Dis.* — 2009. — Vol. 3, N 12. — e560.
 48. Longhi M.T., Oliveira T.R., Romero E.C., Gonçalves A.P., de Morais Z.M., Vasconcellos S.A., Nascimento A.L. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin // *J. Med. Microbiol.* — 2009. — Vol. 58, N 10. — P. 1275–1282.
 49. Ludwig W., Euzéby J., Whitman W.B. Draft taxonomic outline of the Bacteroidetes, Planctomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Fibrobacteres, Fusobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Dictyoglomi, and Gemmatimonadetes. *Bergey's Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines.* — Vol. 4. — P. 16
 50. Matsunaga J., Sanchez Y., Xu X., Haake D.A. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA // *Infect. Immun.* — 2005. — Vol. 73, N 1. — P. 70–78.
 51. Matsunaga J., Young T.A., Barnett J.K., Barnett D., Bolin C.A., Haake D.A. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein // *Infect. Immun.* — 2002. — Vol. 70, N 1. — P. 323–334.
 52. 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. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily // *Mol. Microbiol.* — 2003. — Vol. 49, N 4. — P. 929–945.
 53. Matsunaga J., Werneid K., Zuerner R.L., Frank A., Haake D.A. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host // *Microbiology.* — 2006. — Vol. 152, N 12. — P. 3777–3786.
 54. Nahori M.A., Fournié-Amazouz E., Que-Gewirth N.S., Balloy V., Chignard M., Raetz C.R., Saint Girons I., Werts C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 175, N 9. — P. 6022–6031.
 55. Nally J.E., Chow E., Fishbein M.C., Blanco D.R., Lovett M.A. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections // *Infect. Immun.* — 2005. — Vol. 73, N 6. — P. 3251–3260.
 56. Nally J.E., Timoney J.F., Stevenson B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans* // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69, N 1. — P. 400–404.
 57. Nally J.E., Whitelegge J.P., Bassilian S., Blanco D.R., Lovett M.A. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection // *Infect. Immun.* — 2007. — Vol. 75, N 2. — P. 766–773.
 58. Nascimento A.L., Verjovski-Almeida S., Van Sluys M.A., Monteiro-Vitorello C.B., Camargo L.E., Digiampietri L.A., Harstkeerl R.A., Ho P.L., Marques M.V., Oliveira M.C., Setubal J.C., Haake D.A., Martins E.A. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2004. — Vol. 37, N 4. — P. 459–477.
 59. Okuda M., Sakai Y., Matsuuchi M., Oikawa T., Watanabe M., Itamoto K., Iwata H., Kano R., Hasegawa A., Onishi T., Inokuma H. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant OmpL1 protein // *J. Vet. Med. Sci.* — 2005. — Vol. 67, N 3. — P. 249–254.
 60. Oliveira T.R., Longhi M.T., de Morais Z.M., Romero E.C., Blanco R.M., Kirchgatter K., Vasconcellos S.A., Nascimento A.L. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2008. — Vol. 15, N 11. — P. 1715–1722.
 61. Palaniappan R.U.M., Chang Y.-F., Hassan F., McDonough S.P., Pough M., Barr S.C., Simpson K.W., Mohammed H.O., Shin S., McDonough P., Zuerner R.L., Qu J., Roe B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA // *J. Med. Microbiol.* — 2004. — Vol. 53. — P. 975–984.
 62. 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. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans* // *Infect. Immun.* — 2002. — Vol. 70, N 10. — P. 5924–5930.
63. Palaniappan R.U., McDonough S.P., Divers T.J., Chen C.S., Pan M.J., Matsumoto M., Chang Y.F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection // *Infect. Immun.* — 2006. — Vol. 74, N 3. — P. 1745–1750.
 64. Paster B.J., Dewhirst F.E., Weisburg W.G., Tordoff L.A., Fraser G.J., Hespell R.B., Stanton T.B., Zablén L., Mandelco L., Woese C.R. Phylogenetic analysis of the spirochetes // *J. Bacteriol.* — 1991. — Vol. 173, N 19. — P. 6101–6109
 65. Patarakul K., Lo M., Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum // *BMC Microbiol.* — 2010. — Vol. 10. — e31.
 66. Peca-Moctezuma A. de la, Bulach D.M., Kalambaheti T., Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1999. — Vol. 177, N 2. — P. 319–326.
 67. Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C., Zuerner R.L., Zidane N., Wilson P.J., Creno S., Kuczek E.S., Bommezadri S., Davis J.C., McGrath A., Johnson M.J., Bour-saux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R.L., Rood J.I., Lajus A., Davies J.K., Médigue C., Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis // *PLoS One.* — 2008. — Vol. 3, N 2. — e1607.
 68. Pinne M., Haake D.A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans* // *PLoS One.* — 2009. — Vol. 4, N 6. — e6071.
 69. Qin J.H., Sheng Y.Y., Zhang Z.M., Shi Y.Z., He P., Hu B.Y., Yang Y., Liu S.G., Zhao G.P., Guo X.K. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601 // *BMC Microbiol.* — 2006. — Vol. 6. — e51.
 70. Saengjaruk P., Chaicumpa W., Watt G., Bunyaraksyotin G., Wuthiekanun V., Tapchaisri P., Sittinont C., Panaphut T., Tomanakan K., Sakolvaree Y., Chongsanguan M., Mahakunkijcharoen Y., Kalambaheti T., Naigowit P., Wambangco M.A., Kurazono H., Hayashi H. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40, N 2. — P. 480–489
 71. Shang E.S., Exner M.M., Summers T.A., Martinich C., Champion C.I., Hancock R.E., Haake D.A. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin // *Infect. Immun.* — 1995. — Vol. 63, N 8. — P. 3174–3181.
 72. Shang E.S., Summers T.A., Haake D.A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species // *Infect. Immun.* — 1996. — Vol. 64, N 6. — P. 2322–2330.
 73. Silva E.F., Medeiros M.A., McBride A.J., Matsunaga J., Esteves G.S., Ramos J.G., Santos C.S., Croda J., Homma A., Dellagostin O.A., Haake D.A., Reis M.G., Ko A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis // *Vaccine.* — 2007. — Vol. 25, N 33. — P. 6277–6286.
 74. Srivastava S.K., Chaudhuri P., Thangapandian E., Mariya R., Amutha R. Evaluation of recombinant *Leptospira interrogans* serovar canicola outer membrane proteins as diagnostic antigen // *Indian J. Med. Microbiol.* — 2006. — Vol. 24, N 4. — P. 346–348.
 75. Stevenson B., Choy H.A., Pinne M., Rotondi M.L., Miller M.C., Demoll E., Kraiczky P., Cooley A.E., Creamer T.P., Suchard M.A., Brisette C.A., Verma A., Haake D.A. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement // *PLoS One.* — 2007. — Vol. 14, N 11. — e1188.
 76. Tahiliani P., Kumar M.M., Chandu D., Kumar A., Nagaraj C., Nandi D. Gel purified lipL32: a prospective antigen for detection of leptospirosis // *J. Postgrad. Med.* — 2005. — Vol. 51, N 3. — P. 164–168.
 77. Verma A., Hellwage J., Artiushin S., Zipfel P.F., Kraiczky P., Timoney J.F., Stevenson B. LfhA, a novel factor h-binding protein of *Leptospira interrogans* // *Infect. Immun.* — 2007. — Vol. 74, N 5. — P. 2659–2666.
 78. Vieira M.L., Pimenta D.C., de Moraes Z.M., Vasconcelos S.A., Nascimento A.L. Proteome analysis of *Leptospira interrogans* virulent strain // *Open Microbiol. J.* — 2009. — Vol. 7, N 3. — P. 69–74.
 79. Vieira M.L., Atzingen M.V., Oliveira T.R., Oliveira R., Andrade D.M., Vasconcelos S.A., Nascimento A.L. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans* // *PLoS One.* — 2010. — Vol. 5, N 6. — e11259.
 80. Vijayachari P., Sugunan A.P., Shriram A.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem // *J. Biosci.* — 2008. — Vol. 33, N 4. — P. 557–569.
 81. Vinh T., Adler B., Faine S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni // *J. Gen. Microbiol.* — 1986. — Vol. 132, N 1. — P. 103–109.
 82. Werts C., Tapping R.I., Mathison J.C., Chuang T.H., Kravchenko V., Saint Girons I., Haake D.A., Godowski P.J., Hayashi F., Ozinsky A., Underhill D.M., Kirschning C.J., Wagner H., Aderem A., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism // *Nat. Immunol.* — 2001. — Vol. 4, N 2. — P. 346–352.
 83. Yang C.W., Wu M.S., Pan M.J., Hsieh W.J., Vandewalle A., Huang C.C. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2002. — Vol. 13, N 8. — P. 2037–2045.
 84. Yang H.L., Zhu Y.Z., Qin J.H., He P., Jiang X.C., Zhao G.P., Guo X.K. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans* // *BMC Genomics.* — 2006. — Vol. 7. — e293.
 85. Zhang X.Y., Yu Y., He P., Zhang Y.X., Hu B.Y., Yang Y., Nie Y.X., Jiang X.G., Zhao G.P., Guo X.K. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* — 2005. — Vol. 37, N 1. — P. 649–656.