

РУНИНА АНАСТАСИЯ

**НОВЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ –
АНТИГЕНЫ *TREPONEMA PALLIDUM*
ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА**

03.02.03 – Микробиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Дерябин Дмитрий Геннадьевич**
доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты: **Иванов Андрей Михайлович**
член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Черкасов Сергей Викторович
член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 года в «___» часов на заседании Диссертационного совета Д 208.130.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра www.gamaleya.org

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Русакова Екатерина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сифилис остается одним из наиболее распространенных заболеваний, передаваемых половым путем, современной особенностью эпидемиологии которого является преобладание скрытых форм, составляющих более 60% от вновь регистрируемых случаев [Кубанова А. А. и др., 2018]. Бессимптомное течение скрытых форм сифилиса существенно осложняет диагностику заболевания из-за отсутствия возможности получить образцы возбудителя инфекции *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* из очагов поражения. Вследствие этого наибольшее значение в диагностике данного заболевания приобретают непрямые, а именно серологические методы исследования [Красносельских Т. В. и др., 2015; Smith B. C. et al., 2013].

Непрямые методы диагностики сифилиса включают в себя нетрепонемные и трепонемные лабораторные тесты. Первые основаны на обнаружении антител к липидному компоненту клеточной стенки *T. pallidum* в различных вариантах реакции микропреципитации, и в этой связи характеризуются достаточно низкой специфичностью [Ratnam S., 2005]. Более высокой чувствительностью и специфичностью обладают трепонемные тесты с обнаружением антител к видоспецифичным (липо)протеинам *T. pallidum* [Sun A. H. et al., 2009; Winnicker et al., 2011]. Ограничением данных тестов является необходимость использования белковых антигенов возбудителя сифилиса, и поскольку *T. pallidum* не культивируется на искусственных питательных средах, трепонемные тесты получили широкое распространение только после разработки технологии рекомбинантных белков [Baughn R.E. et al., 1986; Becker P.S. et al., 1994]. Одним из значимых направлений совершенствования серодиагностики сифилиса является поиск антигенов *T. pallidum* с выраженной иммуногенностью для решения широкого перечня диагностических задач.

Степень разработанности темы исследования

Используемые в современной серологической диагностике рекомбинантные белки Tr15 (Tr0171), Tr17 (Tr0435), Tr47 (Tr0574) и TmpA (Tr0768) являются липопротеинами внутренней цитоплазматической мембраны *T. pallidum* и относятся к т. н. «иммунодоминантным» антигенам, обуславливающим формирование наиболее выраженного иммунного ответа при сифилисе [Sun A.H. et al., 2009].

Однако, достигаемые с их использованием значения чувствительности лабораторного исследования существенно варьируются, снижаясь в случае ранних и поздних форм сифилиса [Smith B. C. et al., 2013]. Указанные обстоя-

тельства определяют интерес к расширению перечня рекомбинантных белков (антигенов) *T. pallidum* для совершенствования лабораторной диагностики сифилиса [Chi B. et al., 1999; Cameron C.E. et al., 2000; Sanchez J.C. et al., 2006; Cameron C.E. et al., 2008; Фриго Н.В. и др., 2012]. При этом особенный интерес привлекают к себе белки протеома *T. pallidum*, интенсивность иммунного ответа на которые оказывается дифференцированной при различных формах заболевания [Brinkman M.B. et al., 2006; McGill M.A. et al., 2010]. Полученные с их использованием экспериментальные и клинические данные пока ещё относительно немногочисленны [Isaacs R.D. et al., 1990; Deka R.K. et al., 2006; Van Voorhis W.C. et al., 2003; Smith B. C. et al., 2013], но убедительно свидетельствуют о целесообразности расширения спектра диагностических антигенов *T. pallidum*.

Цель работы – совершенствование серологической диагностики сифилиса на основе применения новых рекомбинантных белков - антигенов *Treponema pallidum*.

Задачи исследования

1. Проведение биоинформатического анализа протеома *T. pallidum* для определения перечня белков, перспективных для использования в качестве диагностических антигенов при серологической диагностике сифилиса.

2. Получение отобранных рекомбинантных белков *T. pallidum*, предусматривающее клонирование целевых генов в экспрессионных системах, создание на их основе штаммов-продуцентов, экспрессию и очистку рекомбинантных белков, подтверждение их идентичности целевым белкам с помощью масс-спектрометрии.

3. Характеристика диагностической ценности полученных рекомбинантных белков *T. pallidum* на основе анализа их реагирования с образцами сыворотки крови больных различными формами сифилиса, другими спирохетозами (на примере боррелиоза) и здоровых индивидов.

4. Разработка иммуночипа, содержащего расширенную панель антигенов *T. pallidum*, и определение алгоритма интерпретации результатов исследования на иммуночипе для серологического скрининга на сифилис, а также для вероятностной дифференциации скрытых форм данного заболевания.

Научная новизна

С использованием комплекса методов биоинформатического анализа, учитывающих особенности структуры и локализации компонентов протеома *T. pallidum*, определен перечень потенциальных иммуногенных белков, перспективных для использования в качестве антигенов для специфической серодиагностики сифилиса. В качестве целевых белков для дальнейшего исследова-

ния выбраны Tr0277 (Prc; C-терминальная пептидаза S41A), Tr0319 (TmrC; PnrA; транспортер пуриновых нуклеозидов через внутреннюю цитоплазматическую мембрану), Tr0453 (белок, ассоциированный с внешней мембраной, транспортер липидов), Tr0684 (MglB-2; АТФ-зависимый транспортер глюкозы и галактозы через внутреннюю цитоплазматическую мембрану), Tr0965 (macA; транспортный белок, локализованный на внутренней мембране), Tr1038 (TrF1; бактериоферритин).

Проведено клонирование генов *tp0277*, *tp0319*, *tp0453*, *tp0684*, *tp0965* и *tp1038* *T. pallidum* штамма *Nichols*, обеспечена их эффективная экспрессия в штаммах-продуцентах, получены и очищены рекомбинантные белки, соответствие которых целевым белкам *T. pallidum* подтверждено методом масс-спектрометрии.

Экспериментально определены значения специфичности и чувствительности полученных рекомбинантных белков *T. pallidum*, на основании чего констатирована наибольшая ценность диагностического использования антигенов Tr0277, Tr0319 и Tr0453 при ограниченной эффективности Tr0684, Tr0965 и Tr1038.

Сконструирован оригинальный иммуночип, содержащий ячейки с расширенной панелью антигенов *T. pallidum*, включающей традиционно используемые «иммунодоминантные» антигены Tr15, Tr17, Tr47 и TmrA и синтезированные *de novo* антигены Tr0277, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0965 и Tr1038. Конструкция иммуночипа защищена патентом РФ на полезную модель №181902(U1) от 26.07.2018.

Разработан алгоритм интерпретации результатов исследования на иммуночипе, позволяющий проводить эффективную диагностику сифилиса, а также впервые осуществлять вероятностную дифференциацию ранних и поздних скрытых форм сифилиса.

Теоретическая и практическая значимость

Созданные экспрессионные системы и штаммы-продуценты позволяют синтезировать рекомбинантные белки Tr0277, Tr0319, Tr0684, Tr0965, Tr0453 и Tr1038 и дают возможность разработки с их использованием нового поколения диагностических тест-систем, основанных на использовании расширенной панели диагностических антигенов *T. pallidum*. Разработанные штаммы-продуценты рекомбинантных белков *T. pallidum* депонированы в Национальном биоресурсном центре – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (регистрационные номера

№13267, №13266, №13268, №13458, №13457 и №13459), откуда могут быть получены для последующего научного и коммерческого применения.

С использованием синтезированных *de novo* антигенов *T. pallidum* на базе ООО «Биочип ИМБ» при ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук (Акт внедрения №54/04-10/2018 от 04.10.2018) изготовлена модельная серия иммуночипов для специфической диагностики сифилиса. Ожидаемое использование иммуночипа с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* в комплексе лабораторных тестов определяет перспективу повышения чувствительности и специфичности серологической диагностики сифилиса, а также появления новых аналитических возможностей проводимого исследования.

Методология и методы исследования

1. Методы биоинформатического анализа: *LipoP*, *UiB Lipo*, *PSORTb*, *Cello*, *TMHMM*, *SignalP*, *BOMP*, *TMBETADISC*.

2. Молекулярно-генетические методы: выделение геномной ДНК, амплификация и клонирование генов; трансформация компетентных клеток *E.coli*, экспрессия целевых белков в клетках-продуцентах.

3. Биохимические методы очистки рекомбинантных белков: металл-хелатная хроматография.

4. Методы иммунологического (серологического) исследования: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция непрямой иммунофлуоресценции (ИРИФ).

5. Методы статистической обработки результатов исследования: программное обеспечение *AtteStat* и *Statistica 8,0*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты биоинформатического анализа протеома *T. pallidum* характеризуют белки Tr0277, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 в качестве перспективных антигенов для совершенствования серологической диагностики сифилиса.

2. Разработанные экспрессионные конструкции, кодирующие отобранные белки *T. pallidum*, а также созданные на их основе штаммы-продуценты позволяют получить высокоочищенные фракции рекомбинантных белков Tr0277, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0965 и Tr1038.

3. Рекомбинантные белки Tr0277, Tr0319 и Tr0453 при их использовании в качестве антигенов для серологической диагностики сифилиса показывают высокие значения чувствительности и специфичности, в то время как рекомбинантные белки Tr0684, Tr0965 и Tr1038 характеризуются сниженными значениями диагностической эффективности.

4. Применение иммуночипа для определения иммуноглобулинов IgG и IgM к расширенной панели антигенов, включающей традиционно используемые и вновь синтезированные рекомбинантные белки *T. pallidum*, повышает эффективность серологической диагностики сифилиса, а также обеспечивает возможность вероятностной дифференциации скрытых форм данного заболевания.

Личный вклад автора

Описанные в диссертации экспериментальные исследования проведены лично автором диссертации. Автор выполнял основную роль в постановке задач, планировании исследования, а также в обработке полученных данных и в написании статей по теме исследования.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена контролем основных этапов исследования, в том числе секвенированием клонированных последовательностей генов *T. pallidum* штамма *Nichols* в экспрессионных системах, а также идентификацией полученных рекомбинантных белков с применением метода масс-спектрометрии (*MALDI-TOF MS*) и сравнением полученных и эталонных масс-спектров базы данных *SwissProt* в программном обеспечении *Mascot*. Достоверность результатов ИФА и нРИФ обеспечивалась использованием соответствующих контролей (контроль присутствия антител в сыворотке крови, контроль гибридизации детектирующих антител и контроль неспецифического связывания), а также отрицательными и положительными контролями реакции. Выбор применяемых статистических методов соответствовал поставленным задачам и позволял охарактеризовать статистически значимые результаты с необходимой степенью достоверности.

Апробация работы

Основные результаты диссертации представлены в докладах на IV и V Российском конгрессе лабораторной медицины (2–4 октября 2018 г., 11–13 сентября 2019 г., Москва), Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (18–20 апреля 2017 г., Москва) и «Молекулярная диагностика 2014» (18–20 марта 2014 г., Москва), VII Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем» (14–18 ноября 2016 г., Москва), а также на XIV–XVIII Всероссийских съездах дерматовенерологов и косметологов (2014–2018 гг., Москва).

Апробация работы состоялась 17 июня 2020 г. на научно-практической конференции ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют п/п 10 формулы специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 4 статьи в рецензируемых журналах, учитываемых в международных системах научного цитирования *Scopus* или *Web of Science*. Получен 1 патент РФ на полезную модель.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, включает 15 таблиц и 39 рисунков. Список литературы содержит 193 источника, из них 172 публикации в отечественных и зарубежных журналах, 10 книг, 2 патента, 1 диссертация и 8 интернет-ресурсов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей белков *T. pallidum* проводился с использованием следующих специализированных программ: 1) клеточная локализация белков оценивалась с помощью программ *PSORTb 3.0.2* и *Cello*; 2) выявление трансмембранных альфа-спиральных областей осуществлялось с использованием *TMHMM Server v. 2.0*; 3) обнаружение участков бета-складок выполнено с применением ресурсов *BOMP* и *TMBETADISC*; 4) наличие сигнального пептида у предшественников белков определялось с помощью *SignalP 4.0*; 5) поиск сайтов липидирования проводился программами *UiB Lipo* и *LipoP*. При подтверждении специфичности исследуемых белков для рода *Treponema* использовалась база данных Национальной лаборатории Лос-Аламоса, США (*STD Sequence databases*; <http://stdgen.northwestern.edu>), содержащей полную информацию информация о белках *T. pallidum* с Tr0001 по Tr1041.

В качестве исходного материала для создания **генетических экспрессионных систем** целевых белков *T. pallidum* использовалась геномная ДНК штамма *Nichols* (GenBank NC_000919.1: 1134809..1135342), культивируемого на тестискулярной модели у кроликов в виварии Сергиево-Посадского филиала ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России. Конструирование праймеров проведено в программах *NCBI Blast* и *OLIGO 6.0*. Амплификация целевых фрагментов про-

водилась высокоточной полимеразой *Pfu* (*Thermo*, США) по следующей программе: 95 °С – 5 мин; (95 °С – 30 сек, 59 °С – 30 сек, 72 °С – 5 мин) 45 циклов; 72 °С – 7 мин. Полученные ПЦР-продукты и использованный для клонирования вектор pET28a(+) (содержащий ген устойчивости к канамицину и последовательность *His*-тега) обрабатывались парой рестрикционных эндонуклеаз *NdeI* и *BamHI/HindIII/XhoI* (*Thermo*, США), соответствующих сайтам рестрикции в последовательности праймеров для каждого гена, и соединялись с помощью лигазы T4 (*Thermo*, США). Продукты лигирования использовали для трансформации компетентных клеток *E.coli* штамм TOP10 (*Sigma Aldrich*, США), полученных путем обработки свежей культуры стерильным водным раствором CaCl₂ с последующей заморозкой на -80°С в растворе с 15% глицерина. Трансформацию проводили методом теплового шока, инкубируя продукты лигирования с компетентными клетками *E. coli* TOP10 во льду в течение 30 мин с последующим нагревом до 42°С в течение 2 мин и повторным охлаждением во льду. Трансформированные клетки высевали на чашки с агаризованной средой 2xTY, содержащей селективный антибиотик канамицин в конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 18 часов при 37°С.

Для **гетерологической экспрессии** белков *T. pallidum* использовались штаммы-продуценты, полученные путем трансформации клеток *E. coli* BL-21(DE3) или *E. coli* BL-21(DE3)PlysS (*Sigma Aldrich*, США) описанными выше экспрессионными системами после их предварительного наращивания и выделения из клеток *E.coli* TOP10. При синтезе целевых продуктов каждый из штаммов-продуцентов пересевали в жидкую среду 2xTY с 50 мкг/мл канамицина и культивировали при 37 °С с непрерывным перемешиванием в течение 3 часов. Индукцию биосинтеза рекомбинантного белка вызывали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ, после чего культивирование продолжали еще в течение 3 часов. Биомассу штамма-продуцента осаждали центрифугированием после чего лизировали в фосфатном буфере (50 мМ Na₃PO₄, 0,5 М NaCl, pH = 7,4) с применением лизоцима и смеси ингибиторов протеиназ (*Sigma Aldrich*, США).

Очистку рекомбинантных белков *T. pallidum* проводили методом метал-хелатной хроматографии на сорбенте *Sepharose Ni-NTA* (*GE Healthcare*, Великобритания). После нанесения бесклеточного лизата штамма-продуцента хроматографическую колонку промывали буфером с 50 мМ имидазолом, а затем элюировали целевой белок линейным градиентом концентрации имидазола 100-500 мМ. Очищенные с помощью металл-хелатной хроматографии рекомбинантные белки диализировали против исходного буфера, концентрировали в фильтрационных колонках *Amicon Ultracel* (*Millipore*, США) с пределом отсе-чения 10 кДа и определяли их финальную концентрации по методу Бредфорд.

При оценке эффективности использования синтезированных рекомбинантных белков *T. pallidum* в качестве антигенов для трепонема-специфической диагностики сифилиса использована **коллекция образцов сыворотки крови**, полученных от пациентов консультативно-диагностического центра ФГБУ «ГНЦДК» с предварительно верифицированным диагнозом первичного ($n=19$), вторичного ($n=27$), раннего скрытого ($n=36$) и позднего скрытого ($n=52$) сифилиса; больных боррелиозом ($n=10$) и здоровых индивидов ($n=61$).

Для исследования реактивности тестируемых образцов сыворотки методом **иммуноферментного анализа (ИФА)** каждый из рекомбинантных белков *T. pallidum* в концентрации 2 мкг/мл фосфатного буфера (1xPBS) наносили на планшеты высокой сорбции (*Greiner Bio-One*, Германия) и инкубировали 12–16 часов при 4°C. Далее планшеты блокировали 1%-го раствором БСА и отмывали в 1x PBS-T (с 0,05% *Tween-20*). Для анализа образцы сыворотки крови (разведение 1:10 в 1x PBS) вносили в лунки, инкубировали 3 часа при 37°C, отмывали 1x PBS-T и далее проводили гибридизацию с конъюгатом антител к человеческим IgG с пероксидазой хрена в течение 1 часа. После этого планшеты отмывали 1x PBS-T и добавляли раствор хромогена *o*-фенилендиамина в цитратном буфере с 0,03% пероксида водорода, инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Результат реакции оценивали значениями оптической плотности при длине волны 492 нм, регистрируемой на ИФА-анализаторе *Multiscan Ascent* (*Thermo*, США).

Для проведения **реакции непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ)** растворы рекомбинантных белков *T. pallidum* в концентрации 0,750 мг/мл в смеси с гелеобразующими мономерами (метакриламида и N-замещенных аминсахаров) наносились на поверхность активированного силаном стеклянного слайда (*Corning*, США) и полимеризовали облучением с длиной волны 350 нм и интенсивностью 0,06 мкВт/см². Растворы образцов сыворотки 1:10 в 1x PBS наносили на стекло в зоне печати антигенов. После инкубации в течение 12–16 часов при 37°C стекла ополаскивали деионизированной водой, промывали 1x PBS-T в течение 30 минут при скорости 200 об/мин, вновь ополаскивали деионизированной водой и высушивали в потоке воздуха. Далее наносили раствор конъюгата антител к Fc-фрагменту иммуноглобулина человека с флуоресцентным красителем Cy5 (*Sigma Aldrich*, США). После повторной инкубации в течение 1 часа при 37°C стекла промывали деионизированной водой, высушивали в потоке воздуха и сканировали при длине волны 670 нм.

Печать экспериментальной партии **иммуночипов**, содержащих расширенную панель диагностических антигенов *T. pallidum* проводили на базе ООО «Биочип ИМБ» по описанной выше методике, нанося рекомбинантные белки в смеси гелеобразующих мономеров на поверхность стеклянных слайдов с сила-

новым покрытием. Качество полученных иммуночипов оценивали в проходящем свете с помощью биочип-анализатора (ИМБ РАН, Россия) с программным обеспечением *TestChip* и *QualityControl*. Готовые к использованию иммуночипы закрывали пластиковой инкубационной камерой объемом 60 мкл с отверстиями для введения образца и хранили при +4 °С до проведения анализа.

Статистический анализ результатов взаимодействия рекомбинантных белков *T. pallidum* с образцами сыворотки больных сифилисом, боррелиозом и здоровых индивидов проводили с использованием программного обеспечения *AtteStat* по критерию Манна-Уитни для непарных выборок с поправкой на множественное сравнение. Характеристика диагностической ценности отдельных рекомбинантных белков *T. pallidum* дана в соответствии с ГОСТ Р53022.3–2008 «Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3». Для решения задачи интегральной диагностики сифилиса и вероятностной дифференциации его отдельных форм использован алгоритм линейного дискриминантного анализа на основе пакета программ *Statistica 8.0*.

Результаты исследования

Первый этап **биоинформатического анализа** был направлен на поиск наиболее иммунореактивных белков *T. pallidum* и базировался на сравнительном анализе иммунопротеомов (совокупности белков, в отношении которых в сыворотке крови больных сифилисом регистрировался специфический иммунный ответ). Проводилось сопоставление баз данных, полученных с использованием двух взаимодополняющих подходов: 1) серологического скрининга тотальной библиотеки рекомбинантных белков *T. pallidum* [Brinkman M.B. et al., 2006]; 2) серологического скрининга нативных белков *T. pallidum*, разделенных методом двумерного электрофореза [McGill M.A. et al., 2010].

Констатирован ограниченный перечень иммунореактивных белков *T. pallidum*: 39 в составе тотальной библиотеки и 38 в нативном протеоме. Среди них для дальнейшего углубленного исследования были отобраны 7 белков, показавших иммунореактивность по результатам использования обеих платформ, а именно: Tr0163, Tr0216, Tr0319, Tr0684, Tr0769, Tr0971 и Tr1038.

Таблица 1 – Результаты биоинформатического анализа белков *T. pallidum*

Номер открытой рамки считывания	Клеточная локализация		Локализация на наружной мембране (наличие β-складок)		Количество α-спиральных трансмембранных участков	Наличие сигнальной последовательности	Наличие сайта липидирования		Клеточная локализация (на основании комплексного анализа)	Специфичность для рода <i>Treponema</i>	
	Программа	<i>PSORTb 3.0</i>	<i>Cello</i>	<i>BOMP</i>			<i>TM BETA DISC-PSSM</i>	<i>TMHMM</i>			<i>SignalP 4.0</i>
Tr0108		Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0136		Секр.	Секр.	–	–	1	+	–	+	Цитопл. мемб.	–
Tr0163		Цит. мембр.	Цитопл.	–	–	0	+	++	+	Цитопл. мемб.	–
Tr0216		Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0249		Перипл.	Цитопл.	–	–	0	+	–	–	Цитопл. мемб.	–
Tr0259		Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	+
Tr0277		Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0319		Цит. мембр.	Цитопл.	–	–	0	+	+	+	Цитопл. мемб.	–
Tr0326		Наружн. м.	Наружн. м.	+	+	1	+	–	–	Наружн. м.	–
Tr0453		Неизв.	Наружн. м.	–	+	1	+	+	+	Наружн. м.	+
Tr0608		Цитопл.	Цитопл.	–	–	1	–	–	–	Цитоплазма	+
Tr0684		Перипл.	Цитопл.	–	–	0	+	–	+	Цитопл. мемб.	–
Tr0769		Неизв.	Цит./нар. мембр.	–	–	0	+	–	–	Наружн. м.	–
Tr0886		Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0965		Цитопл.	Цитопл.	–	–	1	–	–	–	Цитопл. мемб.	–
Tr0971		Цитопл.	Перипл./цитопл.	–	–	0	+	++	+	Цитопл. мемб.	–
Tr1038		Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–

Кроме того, аналогичное решение было принято в отношении ещё 10 белков (Tr0108, Tr0136, Tr0249, Tr0259, Tr0277, Tr0326, Tr0453, Tr0574, Tr0786, и Tr0965), показавших свою иммуногенность с использованием только одной протеомной платформы, но упоминаемых в современных научных источниках в качестве «кандидатных» антигенов для совершенствования серологической диагностики сифилиса.

Второй этап биоинформатического анализа был ориентирован на исследование структуры отобранных белков *T. pallidum*, поиск сайтов липидирования и определение их вероятной клеточной локализации (Таблица 1). Оценка локализации анализируемых белков в клетке *T. pallidum* с помощью программ *PSORTb* и *CELLO* указывала на цитоплазматическое расположение Tr0108, Tr0216, Tr0259, Tr0277, Tr0608, Tr0886 и Tr1038, что согласовывалось с результатами их структурного анализа (для белка Tr0277 возможной также являлась локализация в периплазматическом пространстве клетки *T. pallidum*).

В свою очередь комплексный анализ белков Tr0249 и Tr0965 свидетельствовал об их локализации на цитоплазматической мембране. Белок Tr0326 был определен как компонент наружной мембраны, а Tr0136 определился обеими программами как «секретируемый» с вероятной локализацией на клеточной поверхности. Для белков Tr0163, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0769 и Tr0971 клеточные локализации, предсказанные программами *PSORTb* и *CELLO*, совпадали не полностью или идентифицировались только одной из программ.

С использованием программы *TNNMM* наличие единичных α -спиральных участков было показано для 5 белков: Tr0136, Tr0326, Tr0453, Tr0608 и Tr0965. При этом интерпретация данного результата предполагала низкую вероятность локализации подобных белков на наружной мембране при более высокой вероятности как белков внутренней (цитоплазматической) мембраны. С помощью серверов *BOMP* и *TMBETADISC* были определены β -складчатые структуры исследуемых белков, являющихся топологическими маркерами их расположения на наружной мембране *T. pallidum*. При этом наличие β -складчатых структур было показано только для двух белков – Tr0326 и Tr0453, для которых ранее было установлено присутствие транс-мембранных α -спиральных областей.

Поиск сигнальных пептидов, являющихся характерной особенностью предшественников мембранных белков и указывающих на их вероятный экспорт через цитоплазматическую мембрану, был выполнен с помощью сервера *SignalP 4.0*. Наличие сигнального пептида было установлено для 9 из 17

анализируемых белков *T. pallidum* (Tr0136, Tr0163, Tr0249, Tr0319, Tr0326, Tr0453, Tr0684, Tr0769 и Tr0971).

На основе интегральной оценки результатов биоинформатического анализа по совокупности критериев: 1) иммунореактивность, доказанная при исследовании иммунопротеома *T. pallidum*; 2) локализация в клетке *T. pallidum*, доказанная с использованием специализированных компьютерных программ и лежащая в основе их различной доступности для иммунной системы.

Для последующей разработки были отобраны 6 белков:

- Tr0277 (Prc) – нелипидированная С-терминальная пептидаза S41A;
- Tr0319 (TmpC; PngA) – липопротеин, связанный с цитоплазматической мембраной и выполняющий функцию рецептора и транспортера пуриновых нуклеозидов через цитоплазматическую мембрану;
- Tr0453 – липопротеин, ассоциированный с наружной мембраной, транспортер липидов и гликолипидов через наружную мембрану;
- Tr0684 (MglB-2) – липопротеин периплазмы, связанный с цитоплазматической мембраной и обеспечивающий АТФ-зависимый транспорт глюкозы и галактозы;
- Tr0965 (macA) – нелипидированный белок внутренней мембраны с вероятной транспортной функцией;
- Tr1038(TrF1) – нелипидированный цитоплазматический бактериоферритин.

Для создания **генетических экспрессионных систем**, кодирующих выбранные целевые белки, была осуществлена амплификация соответствующих генов из тотальной ДНК *T. pallidum* штамм *Nichols* (GenBank NC_000919.1: 1134809..1135342).

Проведенное с этой целью конструирование праймеров, наряду со стандартными требованиями, предусматривало: 1) фланкирование полной транскрибируемой последовательности; 2) добавление с 5'-конца каждого праймера трех дополнительных нуклеотидов и далее последовательности сайта расщепления рестрикционной эндонуклеазы; 3) контроль положения последовательности целевого белка в рамке считывания вектора, 4) присоединение *His*-тэга с N-конца синтезируемого пептида и 5) стоп-кодон, обеспечивающий остановку синтеза в конце последовательности целевого белка.

Последовательности сконструированных праймеров приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Последовательности праймеров, использованных для амплификации целевых генов *T. pallidum* штамм *Nichols* и длина соответствующих продуктов ПЦР

Название	Последовательность 5'-3'	Длина (п.о.)
Trp0277_F_NdeI	AATCATATGCAGACGGTGCAGGATGTCTAC	1347
Trp0277_R_HindIII	TTTAAGCTTTCAAGATACCTTCTTTTTTTTCCTGT	
Trp0319_F_NdeI	TATCATATGGACAGGCCGCAGATGGGAAAC	1080
Trp0319_R_XhoI	TTTCTCGAGTGTTCATCATGCGTGCAGATCG	
Trp0453_F_NdeI	GTTCATATGGCATCAGTAGATCCGTTGGGG	880
Trp0453_R_BamHI	TGTGGATCCCGAACTTCCCTTTTTGGAGTACAA	
Trp0684_F_NdeI	TTTCATATGGCGGTGCTTGTGGTAGGCTGT	1212
Trp0684_R_HindIII	TTTAAGCTTGGTATTTGAGCTTGTCTGTATAG	
Trp0965_F_NdeI	TTTCATATGCTGCGTCGGGTTCCGCCG	980
Trp0965_R_XhoI	TTTCTCGAGTTTTCTCGCTGCACTTTGGTC	
Trp01038_F_NdeI	GGGCATATGAACATGTGTACAGATGGAAAAAAA	550
Trp01038_R_XhoI	TTTCTCGAGTCAGGCTTTCAGGGTAGCAC	

Примечание – подчеркиванием выделены сайты расщепления соответствующих рестрикционных эндонуклеаз

Эффективность амплификации была подтверждена наличием продукта ПЦР соответствующей длины при электрофорезе в 2% агарозном геле. Очищенные продукты ПЦР были обработаны смесью двух рестрикционных эндонуклеаз, соответствующих имеющимся в праймерах сайтам рестрикции, после чего были лигированы в вектор pET28a(+).

Полученные в результате лигирования экспрессионные системы были использованы для трансформации компетентных клеткок *E. coli* TOP10 с последующим высевом на чашки с агаризованной средой 2xTY, содержащей селективный фактор – антибиотик канамицин (50 мкг/мл).

Наличие целевой генетической конструкции в выросших колониях было подтверждено результатами амплификации с праймерами к встроенному фрагменту ДНК, а также с праймерами к регионам T7-промотора (5'-ATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTG-3') и T7-терминатора (5'-GTTATGСТАGTTATTGCTCAGCGGT-3'), охватывающими локусы встраивания кодирующего фрагмента в вектор pET28a(+). Окончательное подтверждение локусов встраивания целевых кодирующих последовательностей в вектор pET28a(+) и положения целевых фрагментов ДНК в соответствии с рамкой считывания создаваемой экспрессионной системы было подтверждено секвенированием продуктов ПЦР по Сенгеру.

Подтвержденные экспрессионные системы амплифицировали в клетках *E. coli* TOP10 и выделенной плазмидной ДНК трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL-21(DE3) или BL-21(DE3)pLysS, оптимальные для экспрессионных систем на основе вектора pET28a(+).

Экспрессию целевых белков в полученных штаммах-продуцентах BL-21(DE3)-Tr0319, BL-21(DE3)-Tr0453, BL-21(DE3)-Tr0965, BL-21(DE3)-Tr1038 индуцировали добавлением ИПТГ; для штаммов BL-21(DE3)pLysS-Tr0277 и BL-21(DE3)pLysS-Tr0684 использовали протокол «холодной индукции» при температуре 18°C. Результаты экспрессии подтверждены денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле с окраской Кумасси G250, свидетельствующим о появлении четко выраженных полос, при сравнении с маркерами молекулярных весов несколько превышающих молекулярные массы целевых белков за счет присоединения фрагмента из 6 аминокислотных остатков гистидина.

Последовательности полученных рекомбинантных белков подтверждены в ходе масс-спектрометрического анализа (*MALDI-TOF MS*) методом прямого профилирования с использованием времяпролетного масс-спектрометра *MALDI Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия)* и идентифицированы с помощью программного обеспечения *Mascot (Matrix Science)* методом *Peptide Mass Fingerprint*, основанном на анализе масс-спектрометрических пептидных карт специфического протеолитического гидролиза исследуемых белков в ЦКП «Протеом человека» на базе ФГБНУ «Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича».

Очистка целевых рекомбинантных белков из лизированной и обработанной ультразвуком биомассы штаммов-продуцентов после индукции ИПТГ проведена методом металл-хелатной хроматографии на никель-сефарозном сорбенте. Наличие целевых белков в хроматографических фракциях было подтверждено с помощью денатурирующего полиакриламидного гелевого электрофореза в 14% полиакриламидном геле с окраской Кумасси G250. Фракции, содержащие целевые белки в гомогенном состоянии, объединяли, диализировали против исходного фосфатного буфера, после чего концентрировали в фильтрационных колонках с пределом отсечения 10кДа (Рисунок 1).

Окончательная оценка концентрации целевых белков по методу Бредфорд характеризовала их следующими значениями: 1,5 мг/мл для Tr0277; 2,05 мг/мл для Tr0319; 1,95 мг/мл для Tr0453; 1,93 мг/мл для Tr0684; 1,1 мг/мл для Tr0965 и 0,85 мг/мл для Tr1038.

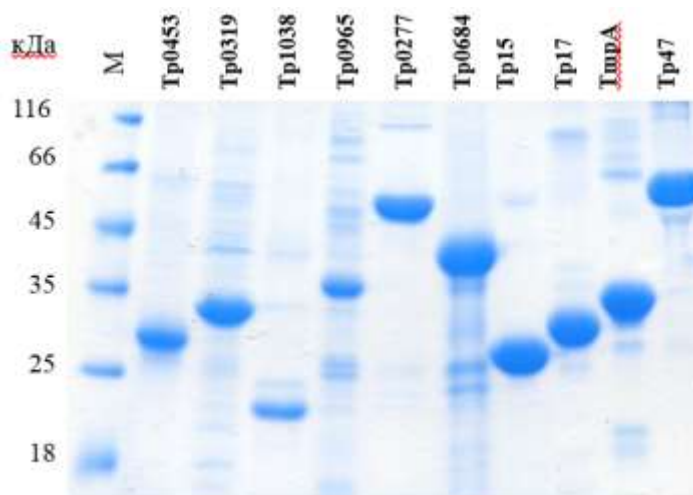


Рисунок 1 – Результаты электрофореза синтезированных *de novo* целевых рекомбинантных белков *T. pallidum*

Характеристика диагностической ценности полученных рекомбинантных белков *T. pallidum*. Предварительная оценка возможности использования рекомбинантных белков Tr0277, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 в качестве антигенов для специфической серологической диагностики сифилиса проведена методом иммуноферментного анализа (ИФА) на выборке образцов сыворотки крови больных сифилисом, сыворотки больных боррелиозом и здоровых индивидов. Сравнительное изучение диагностической ценности 6 синтезированных *de novo* и 4 коммерчески доступных рекомбинантных белков Tr15, Tr17, Tr47 и TmpA проведено методом непрямой иммунофлуоресценции (ИРИФ) на примере той же выборки образцов сыворотки крови больных различными формами сифилиса и здоровых индивидов.

Tr0277. Изучение антител против белка Tr0277 методом ИФА выявило значительную долю результатов, которые в соответствии с использованными критериями относились к «серой зоне» диагностического исследования, как в группе больных сифилисом (38,5 %), так и в группе здоровых индивидов (20,0 %). При этом положительный результат ИФА в группе больных сифилисом был зафиксирован в 59,0 %, а отрицательный в группе здоровых индивидов – в 80,0 % случаев. Сыворотки крови больных боррелиозом были оценены как «отрицательные» в 100,0 % случаев. Тестирование того же антигена методом ИРИФ характеризовало его специфичность значением 100,0 %, однако чувствительность подобного исследования оказывалась существенно ниже, варьируя в диапазоне 30,0-77,8% в зависимости от формы сифилиса. Интегральная диагностическая эффективность использования рекомбинантного белка Tr0277 характеризовалась величиной 72,1%.

Тр0319. Исследование образцов сыворотки больных сифилисом в отношении белка Тр0319 методом ИФА показало 59,7 % положительных результатов, и 19,5 % результатов «серой зоны». Отрицательный результат зафиксирован со 100% образцов сыворотки крови больных боррелиозом и 83,3 % сыворотками здоровых индивидов. При проведении нРИФ специфичность Тр0319 оказывалась достаточно высокой (97,8%), а чувствительность характеризовалась значением 71,8% за счет относительно низкой чувствительности в группах больных первичным сифилисом (50,0%) и поздним скрытым сифилисом (41,7%) при высоких значениях чувствительности 90,0 % и 95,8 % в группах больных вторичным и ранним скрытым сифилисом, соответственно. Интегральная оценка диагностической эффективности белка Тр0319 выводила его на высокий уровень – 81,3 %.

Тр0453. Использование рекомбинантного белка Тр0453 в формате ИФА обеспечило 92,0 % положительных результатов в группе больных сифилисом, а также 100,0 % и 83,0 % отрицательных результатов в группе больных боррелиозом и у здоровых индивидов, соответственно. Специфичность данного антигена в нРИФ составила 100,0 %, а общая чувствительность 95,0 % при 100 % значениях чувствительности в группах больных вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом. В результате этого диагностическая эффективность использования рекомбинантного белка Тр0453 для трепонема-специфической серологической диагностики сифилиса характеризовалась наиболее высоким из зафиксированных значений – 96,8 %.

Тр0684. Результаты ИФА с белком Тр0684 оценивали как «положительные» 53,9 % образцов сыворотки больных сифилисом, а как «отрицательные» только 30,0 % образцов здоровых индивидов. Соплывающийся с этим результат получен и при использовании белка Тр0684 при постановке нРИФ: значения чувствительности диагностического исследования в группах больных сифилисом варьировали от 9,1 % до 28,6 % со средним значением 16,9 %. Вследствие этого даже при 100 % специфичности интегральная диагностическая эффективность применения данного белка составила только 46,7%.

Тр0965. Исследование антител к белку Тр0965 методом ИФА в группе больных сифилисом оценивало 94,0 % образцов как «положительные», а 100,0 % и 87,5 % в группах больных боррелиозом и здоровых индивидов как «отрицательные». Однако, по результатам нРИФ чувствительность диагностического исследования с использованием данного антигена составила всего 10,8 %, а специфичность – 80,4 %, что приводило к наименьшим из зарегистрированных значений интегральной диагностической эффективности – 35,7%.

Tr1038. Исследование антител к белку Tr1038 методом ИФА в группе больных сифилисом позволило получить положительный результат в 76,2 %, в то время как аналогичное исследование в группах больных боррелиозом и здоровых индивидов давало отрицательный результат в 100,0 % случаев. Однако, по результатам нРИФ на фоне 100,0 % специфичности использования белка Tr1038, значения чувствительности диагностического исследования в группах пациентов с различными формами сифилиса распределились в диапазоне от 9,1 % до 22,2 % со средним значением 15,1 %, эффективность диагностического использования белка Tr1038 составила 47,5%.

Обобщающий анализ серореактивности синтезированных *de novo* рекомбинантных белков *T. pallidum* в сравнении с коммерчески доступными рекомбинантными белками (Таблица 3) позволил ранжировать их по общей диагностической эффективности в ряду: Tr0453 (96,8 %) → Tr17 (93,6 %) → Tr15 (81,8 %) → Tr0319 (81,3 %) → Tr47 (74,8 %) → TmpA (72,7 %) → Tr0277 (72,1 %) → Tr1038 (47,5%) → Tr0684 (46,7%) → Tr0965 (35,7%).

Таким образом, три из шести полученных рекомбинантных белков (Tr0277, Tr0319 и Tr0453) продемонстрировали показатели чувствительности и специфичности, сопоставимые с таковыми у традиционно используемых рекомбинантных белков, что характеризует их как новые «кандидатные» антигены для совершенствования специфической серологической диагностики сифилиса и определяет целесообразность их включения в состав расширенной панели диагностических антигенов *T. pallidum*. При этом наиболее высокие значения чувствительности и специфичности белка Tr0453 подтверждают целесообразность диагностического использования белков наружной мембраны *T. pallidum*, количество которых, однако, чрезвычайно немногочисленно. Высокие значения диагностической эффективности белка Tr0319 соответствуют представлениям о высокой иммуногенности и иммунореактивности липопротеинов цитоплазматической мембраны *T. pallidum*.

В свою очередь продемонстрированные диагностические характеристики белка Tr0277 свидетельствуют о возможности использования для заявленных целей нелипидированных антигенов иной клеточной локализации. На этом фоне белки Tr0684, Tr0965 и Tr1038 характеризовались сниженными значениями общей диагностической эффективности, что ограничивает их применение для заявленной цели. Однако, обеспечиваемые при этом высокая специфичность и положительная предсказательная ценность диагностического исследования, сохраняют перспективу использования названных белков для иных целей, в частности – для вероятностной лабораторной дифференциации скрытых форм сифилиса.

Таблица 3 – Диагностические характеристики рекомбинантных белков *T. pallidum* при их использовании в качестве антигенов для серологической диагностики сифилиса

Диагностические характеристики	Tr0277	Tr0319	Tr0453	Tr0684	Tr0965	Tr1038	Tr15*	Tr17*	Tr47*	TrpA*
Специфичность (%)										
Общая	100,0	97,8	100,0	100,0	80,4	100,0	100,0	97,8	97,8	97,8
Чувствительность (%)										
Общая	56,4	71,8	95,0	16,9	10,8	15,1	71,1	91,3	60,8	57,3
Первичный сифилис	30,0	50,0	75,0	9,1	20,0	9,1	45,5	60,0	33,3	45,5
Вторичный сифилис	77,8	90,0	100,0	17,6	28,6	22,2	89,5	100,0	75,0	85,7
Ранний скрытый сифилис	75,0	95,8	100,0	28,6	4,2	15,8	81,0	87,5	76,2	71,4
Поздний скрытый сифилис	34,6	41,7	100,0	10,7	3,4	12,0	60,0	100,0	45,8	22,7
Положительная предсказательная ценность (%)										
Общая	100,0	98,2	100,0	100,0	50,0	100,0	100,0	98,6	97,8	97,7
Отрицательная предсказательная ценность (%)										
Общая	56,4	66,7	91,7	40,2	33,3	42,1	67,2	86,3	60,3	58,4
Диагностическая эффективность (%)										
Общая	72,1	81,3	96,8	46,7	35,7	47,5	81,8	93,6	74,8	72,7

Примечание – * коммерческие рекомбинантные белки, используемые в рамках регламентированных лабораторных исследований для специфической серологической диагностики сифилиса

Печать иммуночипов, содержащих расширенную панель антигенов *T. pallidum*, а также маркирующие и контрольные реагенты, предназначенные для оценки корректности его диагностического использования, проведена на поверхности стеклянных слайдов с силановым покрытием с применением технологии сополимеризационной иммобилизации (Рисунок 2).

Принципиальная схема расположения ячеек на рабочей поверхности иммуночипа представлена на рисунке 2, А. Центральная группа ячеек (выделена серым) содержит рекомбинантные антигены *T. pallidum* в четырех проворностях каждый, что при проведении исследования позволяет рассчитывать усредненное значение флуоресцентного сигнала. Боковые группы ячеек содержат маркирующие (Cy5) и контрольные материалы.

Полученная экспериментальная серия иммуночипов была протестирована на серии образцов сыворотки здоровых индивидов, что позволило определить пороговые уровни флуоресценции ($ФЛ_{\text{порог}}$) для каждого использованного рекомбинантного антигена *T. pallidum*.

В примере (Рисунок 2, Б) результата исследования на иммуночипе образца сыворотки здорового индивида детектируется флуоресценция маркирующих (Cy5) и контрольных (IgG, анти-IgG) ячеек; антитела к рекомбинантным антигенам *T. pallidum* не обнаружены.

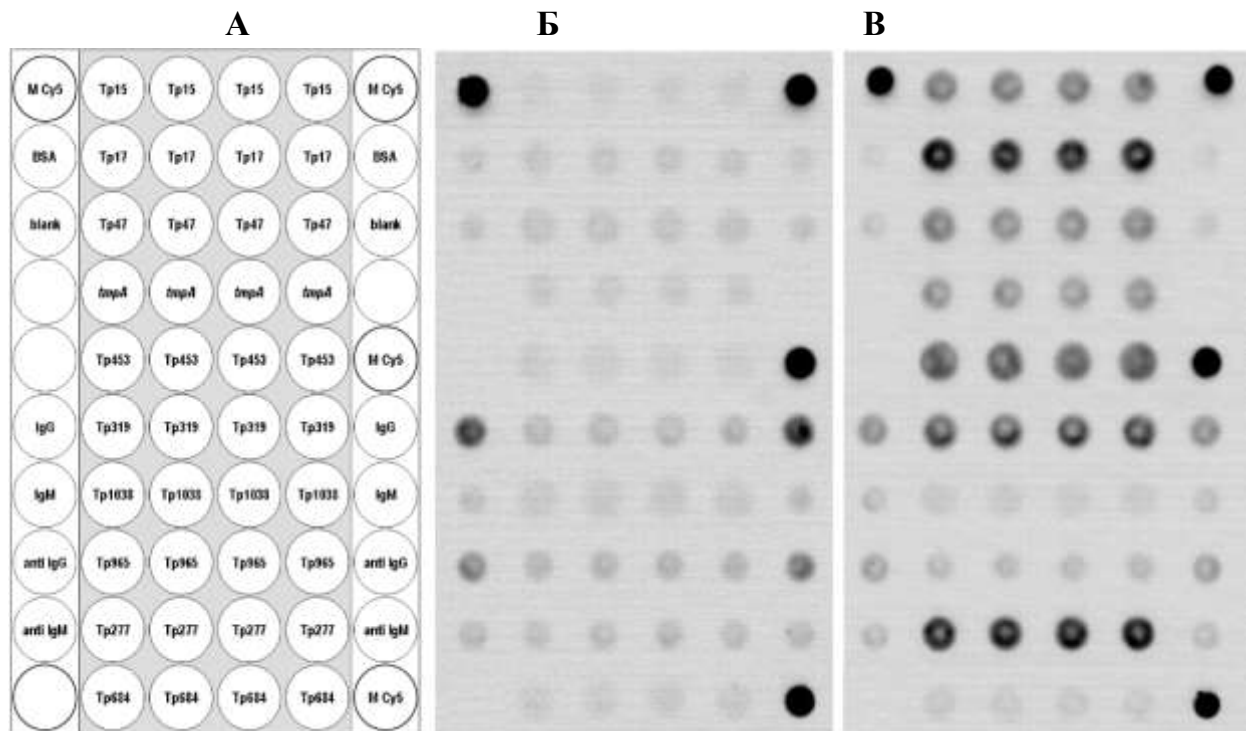


Рисунок 2 – Схема печати иммуночипа с использованием расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* (А) и примеры полученных с его использованием распределений флуоресценции при тестировании образцов сыворотки здорового индивида (Б) и пациента больного сифилисом (В)

В дальнейшем те же иммуночипы были использованы для исследования иммунореактивности индивидуальных образцов сыворотки крови больных сифилисом, пример которого представлен на рисунке 2 В с положительным результатом взаимодействия антител с антигенами Tr15, Tr17, Tr47, TmpA, Tr0277, Tr0319 и Tr0453, а также с флуоресценцией маркирующих (Cy5) и контрольных (IgG, анти-IgG) ячеек.

Определение алгоритма интерпретации результатов исследования на иммуночипе для серологического скрининга на сифилис. Использование алгоритма линейного дискриминантного анализа позволило представить результаты исследования на иммуночипе в виде уравнения общего вида:

$$D = a_1(\text{ФЛ}_{\text{Tr15}}) + a_2(\text{ФЛ}_{\text{Tr17}}) + \dots + a_n(\text{ФЛ}_{\text{TrN}}) + b, \quad (1)$$

где D – значение дискриминантной функции; $\text{ФЛ}_{\text{Tr15}} - \dots - \text{ФЛ}_{\text{TrN}}$ – независимые переменные, соответствующие интенсивности флуоресценции (о.е.) в ячейке с определенным антигеном; $a_1 - a_n$ – коэффициенты уравнения, принимающие значения от $-0,00025$ до $0,041$ и характеризующие вклад каждой из независимых переменных в дискриминацию групп здоровых и больных сифилисом; b – поправочная константа.

Достигнутое распределение дискриминантной функции D в группах больных сифилисом и здоровых индивидов оказалось близким к нормальному, но существенно различалось по своему диапазону (Рисунок 3).

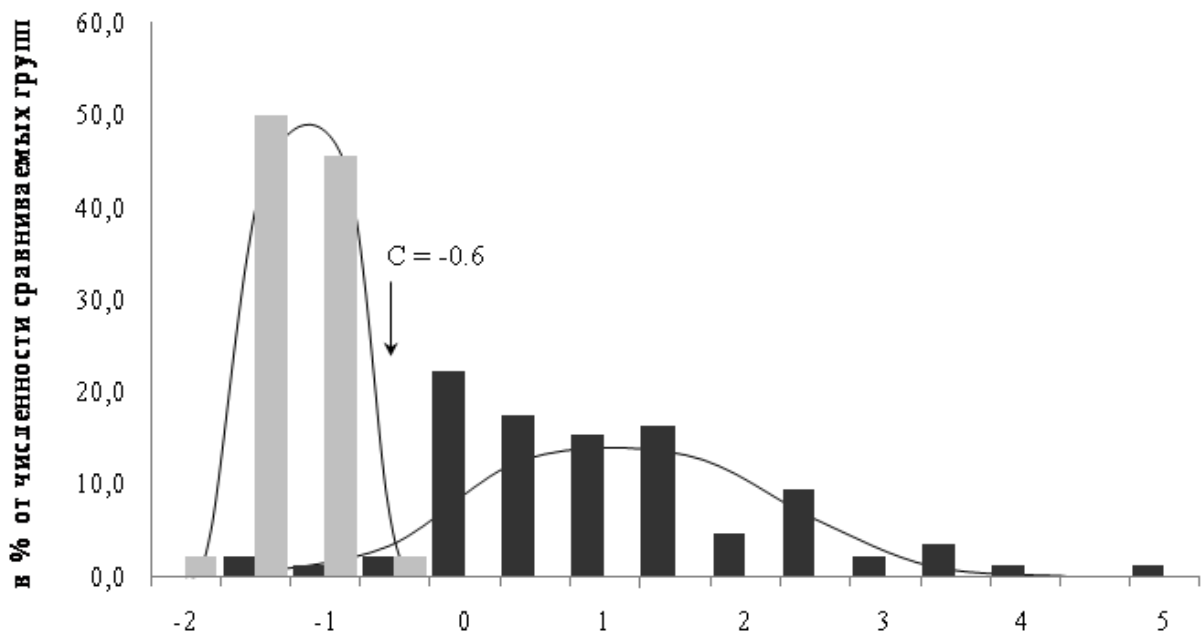


Рисунок 3 – Распределения значений линейной дискриминантной функции D (по оси абсцисс) по результатам анализа образцов сыворотки крови на иммуночипах с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* в группах больных сифилисом (серые столбики) и здоровых индивидов (черные столбики). C – порог отсечения.

В группе здоровых индивидов значения D варьировали в диапазоне от $-2,03$ до $-0,88$, что исключало получение ложноположительных результатов и обеспечивало $100,0\%$ специфичность проведенного исследования. Значения дискриминантной функции в группе больных сифилисом распределялись в более широком диапазоне (от $-1,97$ до $+5,01$), а установленный «порог отсе-чения» $C \geq -0,6$ позволял правильно идентифицировать 80 из 85 тестируемых образцов сыворотки, что соответствовало чувствительности $94,1\%$.

Использование результатов исследования на иммуночипе для вероятностной дифференциации скрытых форм сифилиса. С применением данных исследования образцов сыворотки крови, полученных от пациентов с ранним и поздним скрытым сифилисом, а также образцов сыворотки крови здоровых индивидов был проведен дополнительный дискриминантный анализ, ориентированный на вероятностную дифференциацию сравниваемых групп. По его результатам наиболее высокое значение статистического показателя «лямбды Уилкса», характеризующего потенциальный вклад определенного антигена в дифференциацию скрытых форм сифилиса, было продемонстрировано для синтезированного *de novo* белка Tr0319 (F-удаление переменной 22,85; $P < 0,001$). Также статистически значимым являлось использование двух «иммунодоминантных» антигенов Tr15 и Tr17 (значения F-фактора 8,77 и 8,08 соответственно; $P < 0,001$). При этом их совместное использование обеспечивало значительную степень совпадения результатов серологического и клинического исследования, что, однако, обеспечивало эффективность проводимой дифференциации на уровне только $70,8\%$ для раннего скрытого и $65,5\%$ для позднего скрытого сифилиса.

С целью повышения эффективности дифференциации скрытых форм сифилиса была проверена гипотеза о возможности её по результатам исследования на иммуночипе с добавлением в панель дополнительных антигенов и определением в сыворотке крови двух классов иммуноглобулинов (IgG и IgM). В расширенную панель рекомбинантных антигенов *T. pallidum* были добавлены два экспериментальных коммерческих белка, а именно Tr0163 (липопротеин в составе АТФ-связывающего транспортного комплекса на внутренней мембране) и Tr0971 (лактоферрин-связывающий, Zn^{2+} связывающий липо-протеин внутренней мембраны) (*Cusabio*, Китай). Опубликованные исследования [Brinkman M.V. et al., 2006] характеризуют данные белки как наиболее серореактивные при скрытых формах сифилиса, что дало основание для их включения в разработанную панель антигенов. В свою очередь определение антител классов IgG и IgM проводилось с использованием специфичных к ним конъюгатов, меченых флуорофорами Cy5 и Cy3, соот-

ветственно, что позволяло выполнять анализ последовательно на одном и том же иммуночипе.

В результате анализа было получено однозначное (100%) распределение здоровых индивидов в одну группу (Рисунок 4).

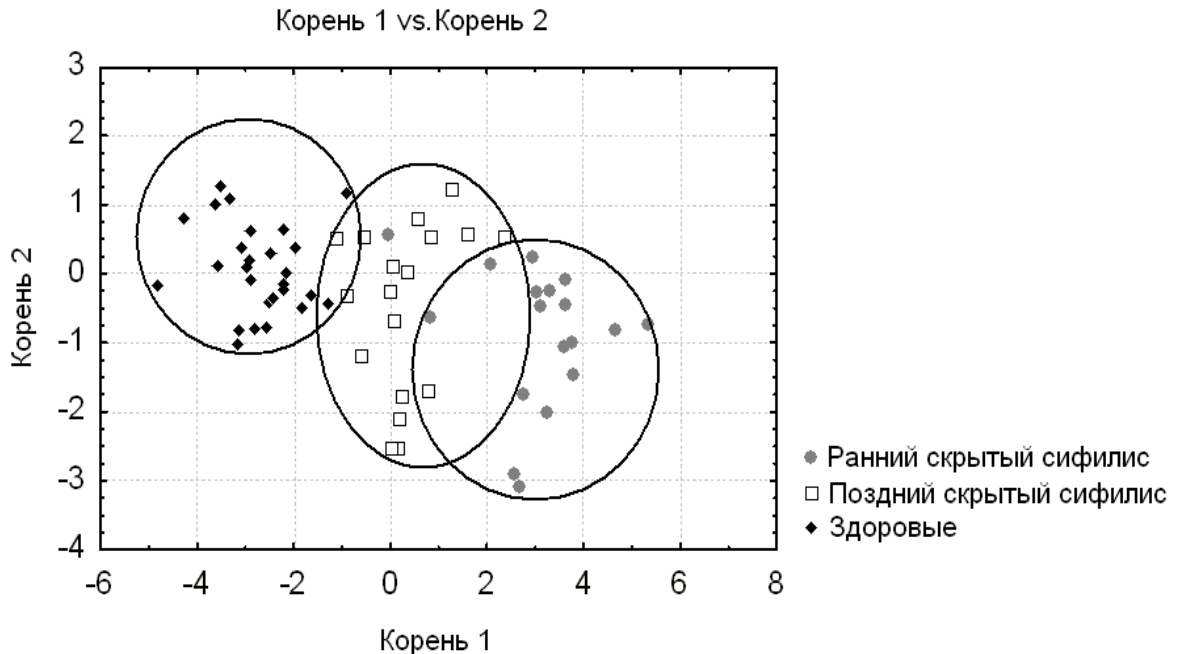


Рисунок 4 – Результаты исследования на иммуночипе иммуноглобулинов IgG и IgM к расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* в сыворотке крови больных скрытыми формами сифилиса и здоровых индивидов по данным дискриминантного анализа в двух проекциях (Корень 1, Корень 2)

Группы раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса были дифференцированы с эффективностью 88,9% и 94,4%, соответственно. Наибольшее значение для дифференциации имели данные определения антител класса IgG против антигенов Tr15, Tr17, Tr0163, Tr0277, Tr0319, Tr0453 и Tr0971 ($p < 0,00001$), выраженный иммунный ответ на которые был характерен для случаев раннего скрытого сифилиса. Дополнительный вклад в дифференциацию вносили единичные высокие уровни антител класса IgM некоторым названным антигенам, в первую очередь к Tr0277 и Tr0453 ($p < 0,001$). В свою очередь особенностью иммунного ответа при позднем скрытом сифилисе являлось обнаружение антител только к одному из используемых антигенов – Tr17, а также полным отсутствием иммунореактивных антител класса IgM.

Тем самым полученные данные свидетельствуют о существовании развернутого иммунного ответа на множество антигенов *T. pallidum* с различной клеточной локализацией при раннем скрытом сифилисе и его существенном «угасании» при позднем скрытом сифилисе, что может объясняться проис-

ходящим переходом возбудителя в иммунологически привилегированные органы и ткани, исключая его контакт с эффекторами иммунной системы. Указанное обстоятельство определяет возможность нового подхода к лабораторной дифференциации скрытых форм сифилиса, основанного на характеристике спектра антител к расширенной панели антигенов *T. pallidum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование новых рекомбинантных белков *T. pallidum* различной клеточной локализации в качестве антигенов для серологической диагностики сифилиса свидетельствует о целесообразности использования для этих целей периплазматического белка Tr0277, липопротеина цитоплазматической мембраны Tr0319 и белка наружной мембраны Tr0453. Формирование с их участием расширенной панели антигенов, включающей новые и традиционно используемые «иммунодоминантные» белки *T. pallidum*, и её практическое использование на основе технологии белковых биочипов (иммуночипов) позволило повысить чувствительность трепонема-специфической серологической диагностики сифилиса, а также подойти к решению принципиально новой задачи, связанной с вероятностной дифференциацией ранней скрытой и поздней скрытой форм данного заболевания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Применение тест-систем с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* (Tr15, Tr17, TmpA, Tr47, Tr0277, Tr0319, Tr0453) в формате иммуночипа рекомендуется для скрининга на сифилис с силу удобства применения и высокой чувствительности и специфичности проводимого серологического исследования, а также для уточнения противоречивых результатов других серологических тестов с ограниченным количеством используемых диагностических антигенов (Tr15, Tr17, TmpA, Tr47). Вместе с этим применение тест-систем с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* (Tr15, Tr17, TmpA, Tr47, Tr0163, Tr0277, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0965, Tr0971, Tr1038) в формате иммуночипа рекомендуется применять для вероятностной дифференциации скрытых форм сифилиса по результатам анализа данных серологического исследования с помощью линейного дискриминантного анализа с целью дальнейшего уточнения схем лечения и ведения пациентов с бессимптомным течением данного заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Биоинформатический анализ позволил выявить наиболее иммунореактивные компоненты протеома *T. pallidum*, для которых по результатам исследования сайтов липидирования, трансмембранных участков и сигнальных регионов в структуре пептидной цепи спрогнозирована клеточная локализация и определена перспектива использования белков Tr0277, Tr0319, Tr0684, Tr0965, Tr0453 и Tr1038 в качестве кандидатных антигенов для совершенствования специфической серологической диагностики сифилиса.

2. Клонирование генов *tp0277*, *tp0319*, *tp0453*, *tp0684*, *tp0965* и *tp1038* в векторе pET28a(+) позволило создать экспрессионные системы для целевых белков *T. pallidum*, а трансформация ими компетентных клеток *E. coli* BL-21(DE3) привела к созданию эффективных штаммов-продуцентов, обеспечивающих получение гомогенных фракций целевых белков.

3. В результате экспериментального исследования антител к полученным рекомбинантным белкам *T. pallidum* в образцах сыворотки крови больных сифилисом и здоровых индивидов констатирована высокая чувствительность и специфичность иммунологических реакций с использованием рекомбинантных белков Tr0277, Tr0319 и Tr0453, сопоставимая с таковыми у рекомбинантных белков Tr15, Tr17, Tr47, TmpA, используемых в рамках регламентированных лабораторных исследований для специфической серологической диагностики сифилиса, в то время как белки Tr0684, Tr0965 и Tr1038 характеризовались сниженной диагностической эффективностью.

4. Определение антител к расширенной панели антигенов *T. pallidum*, реализованной в формате белкового чипа (иммуночипа), а также использование соответствующего алгоритма интерпретации результатов исследования на иммуночипе обеспечило 94,1 % чувствительность и 100% специфичность серологического скрининга на сифилис, а также сформировало возможность с эффективностью 88,9% и 94,4%, осуществлять вероятностную дифференциацию ранних и поздних скрытых форм данного заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рунина А. В. Дифференциальная серодиагностика скрытых форм сифилиса на основе определения иммуноглобулинов классов IgG и IgM к расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* / Рунина А. В., Шпилевая М. В., Катунин Г. Л., Кубанов А. А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 4. – С. 452-456.
2. Рунина А.В. Иммуночип для серологической диагностики сифилиса с использованием расширенной панели рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*. / Рунина А.В., Катунин Г.Л., Филиппова М.А., Затевалов А.М., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т.165 – № 6 – С.726–731.
3. Kubanov A. Novel *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Syphilis Diagnostics: Current Status and Future Prospects / Kubanov A., Runina A., Deryabin D. // BioMed research international. – 2017. – Т. 2017, ID 1436080.
4. Рунина А.В. Варьирование иммунного ответа на антигены Tr0277, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 *Treponema pallidum* при различных формах сифилиса. / Рунина А.В., Затевалов А.М., Катунин Г.Л., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11. – № 1. – С. 70–78.
5. Рунина А.В. Рекомбинантный белок Tr0965 *Treponema pallidum* как перспективный антиген для совершенствования серологической диагностики сифилиса / Рунина А.В., Старовойтова А.С., Дерябин А.Г., Кубанов А.А. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т.71.– № 2.– С.109–113.
6. Рунина А.В. TrF1-новый потенциальный антиген для серодиагностики скрытых форм сифилитической инфекции / Рунина А.В., Рог К.В., Васильев М.М. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 6. – С. 86–92.
7. Рунина А.В. Новые рекомбинантные антигены *T. pallidum* Tr0453 и Tr0319 в диагностике сифилиса / Рунина А.В., Хайруллин Р.Ф., Рог К.В., Семина В.И., Ротанов С.В. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 3. – С. 72–78.
8. Хайруллин Р.Ф. Получение и оценка клинической эффективности рекомбинантного антигена *T. pallidum* Tr0453 для диагностики сифилиса / Хайруллин Р.Ф., Рунина А.В., Рог К.В., Фриго Н.В., Ротанов С.В. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. – № 6. – С. 73–79.
9. Хайруллин Р.Ф. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum* / Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Белоусова А.В.¹. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2012. – № 5. – С. 56–64.

Патент РФ

10. Патент РФ на полезную модель «Иммуночип для трепонема-специфической серологической диагностики сифилиса» / Дерябин Д.Г., Рунина А.В., Кубанов А.А. Бюл. №181902(U1); опубликовано 26.07.2018; приоритет от 20.12.2017.

¹До смены фамилии 13.05.2013