

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ И  
КОСМЕТОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИИ

*На правах рукописи*

РУНИНА АНАСТАСИЯ

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

03.02.03 – Микробиология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
Дерябин Дмитрий Геннадьевич

Москва – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Характеристика возбудителя сифилиса <i>T. pallidum ssp. pallidum</i> .....	10
1.1.1 Морфология и физиология <i>T. pallidum</i> .....	11
1.1.2 Механизмы заражения и персистенции <i>T. pallidum</i> в организме человека .....	13
1.2 Клиническая характеристика сифилиса .....	14
1.2.1 Врожденный сифилис.....	14
1.2.2 Приобретенные формы сифилиса .....	16
1.3 Эпидемиология сифилиса.....	19
1.4 Методы диагностики сифилиса .....	24
1.4.1 Прямые методы диагностики .....	25
1.4.2 Непрямые методы диагностики – характеристика и алгоритмы применения .....	26
1.4.3 Характеристика нетрепонемных серологических тестов .....	31
1.4.4 Характеристика трепонемных серологических тестов .....	32
1.4.5 Новые методики трепонемных серологических тестов – белковые микрочипы (иммуночипы).....	36
1.5 Перспективы развития диагностики сифилиса – рекомбинантные антигены <i>T. pallidum</i> .....	39
1.5.1 Геном и протеом <i>T. pallidum</i> .....	39
1.5.2 Современное применение рекомбинантных антигенов <i>T. pallidum</i> .....	41
1.5.3 Изучение протеома <i>T. pallidum</i> и поиск новых иммуногенных белков .....	45
1.5.4 Биоинформатический анализ кандидатных антигенов <i>T. pallidum</i> .....	47
1.5.5 Белки наружной мембраны <i>T. pallidum</i> .....	50
1.5.6 Мембранные и периплазматические белки <i>T. pallidum</i> .....	53
1.5.7 Цитоплазматические белки <i>T. pallidum</i> .....	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	58
2.1 Материалы исследования .....	58
2.2 Методы исследования .....	65
2.2.1 Выполнение биоинформатического анализа .....	65
2.2.2 Получение генетических экспрессионных систем .....	66
2.2.3 Получение и очистка рекомбинантных белков <i>T. pallidum</i> .....	73
2.2.4 Проведение серологических исследований с полученными рекомбинантными белками <i>T. pallidum</i> .....	77
2.2.5 Интерпретация результатов .....	80

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	82
3.1 Биоинформатический анализ кандидатных антигенов <i>T. pallidum</i> .....	82
3.1.1 Отбор новых кандидатных антигенов среди белков иммунопротеома <i>T. pallidum</i> .....	82
3.1.2 Характеристика субклеточной локализации исследуемых белков <i>T. pallidum</i> .....	84
3.1.3 Наличие сигнального пептида в структуре исследуемых белков <i>T. pallidum</i> .....	87
3.1.4 Выявление остатков жирных кислот в структуре белка.....	88
3.1.5 Анализ специфичности выявленных белков <i>T. pallidum</i> для микроорганизмов порядка <i>Spirochaetales</i> и рода <i>Treponema</i> .....	89
3.2 Получение новых целевых рекомбинантных антигенов <i>T. pallidum</i> для серодиагностики сифилиса.....	89
3.2.1 Создание экспрессионных систем, содержащих гены целевых белков <i>T. pallidum</i> .....	91
3.2.2 Выделение и очистка целевых рекомбинантных белков <i>T. pallidum</i> .....	95
3.3 Оценка диагностических характеристик рекомбинантных белков <i>T. pallidum</i> .....	98
3.4 Апробация модельного иммуночипа с расширенной панелью антигенов <i>T. pallidum</i> для диагностики сифилиса.....	112
3.4.1 Результаты скрининга образцов сыворотки крови больных сифилисом на иммуночипах с расширенной панелью антигенов <i>T. pallidum</i> .....	112
3.4.2 Результаты применения расширенной панели рекомбинантных антигенов <i>T. pallidum</i> для дифференциальной диагностики различных форм сифилиса.....	116
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	135
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	137
ВЫВОДЫ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	140
СПИСОК ТЕРМИНОВ.....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [7]. 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 [6, 150].

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 [136]. Более высокой чувствительностью и специфичностью обладают трепонемные тесты с обнаружением антител к видоспецифичным (липо)протеинам *T. pallidum* [154, 26]. 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 [22, 24]. 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 [154].

Однако, достигаемые с их использованием значения чувствительности лабораторного исследования существенно варьируются, снижаясь в случае ранних и поздних

форм сифилиса [150]. Указанные обстоятельства определяют интерес к расширению перечня рекомбинантных белков (антигенов) *T. pallidum* для совершенствования лабораторной диагностики сифилиса [45, 40, 181, 39, 13]. При этом особенный интерес привлекают к себе белки протеома *T. pallidum*, интенсивность иммунного ответа на которые оказывается дифференцированной при различных формах заболевания [36, 108]. Полученные с их использованием экспериментальные и клинические данные пока ещё относительно немногочисленны [82, 56, 161, 150], 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 исследования выбраны Tr0277 (Prс; С-терминальная пеп-

тидаза 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 (нРИФ).

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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Характеристика возбудителя сифилиса *T. pallidum ssp. pallidum*

Бледная трепонема (*Treponema pallidum ssp. pallidum*) – возбудитель сифилиса, является грам-отрицательной спирохетой и относится к семейству *Spirochaetaceae*, порядку *Spirochaetales*, классу *Spirochaetes*, отделу *Spirochaetae*. Длина бледной трепонемы составляет 5–15 мкм, диаметр 0,2–0,5 мкм [98]. Визуальную идентификацию бледной трепонемы осуществляют по морфологическим свойствам (характерной спиралевидной форме) с помощью микроскопии (чаще всего микроскопии в темном поле) образцов биоматериала из очагов поражения на коже или видимых слизистых оболочках больных сифилисом (Рисунок 1).

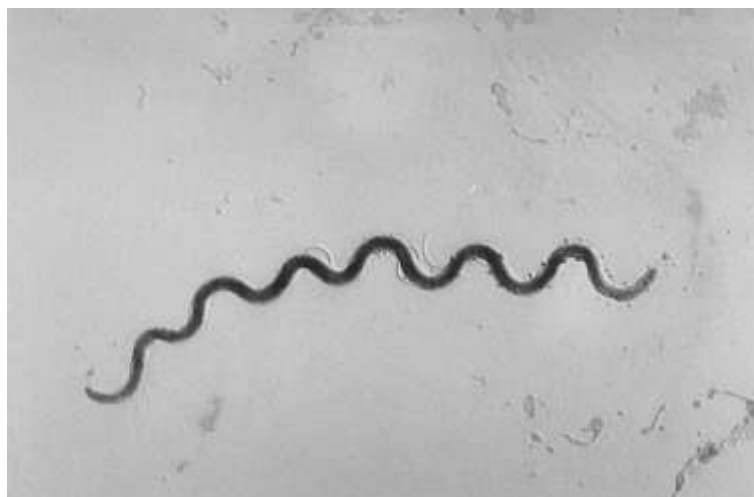


Рисунок 1 – Микроскопия *T. pallidum* с характерной структурой бактерии<sup>1</sup>

Патогенная *T. pallidum* относится к трудно культивируемым на искусственных питательных средах микроорганизмам, при выращивании *in vitro* этот микроорганизм теряет свойство патогенности и некоторые исходные специфические антигенные характеристики [120]. К группе культивируемых на искусственных средах бледных трепонем относятся наиболее широко известные штаммы непатогенных бледных трепонем: *Reiter*, *Kroo*, *Noguchi*, *Kazan* [182].

Для получения препаративных количеств нативных антигенов *T. pallidum* патогенного штамма *Nichols* был разработан способ культивирования возбудителя в семен-

<sup>1</sup> [<https://mechpath.com/2017/12/20/treponema-pallidum/>]

никах лабораторных кроликов с последующим выделением обогащенной суспензии клеток *T. pallidum* из тканей и их разрушением путем воздействия ультразвуком. Производственный выход антигенов зависит от многих факторов: качества инокулируемого материала, условий содержания зараженных лабораторных животных, времени инкубации. Получаемый биоматериал представляет собой сложную смесь нескольких различных антигенов, включая тканевые белки лабораторного животного [175].

Для лабораторных исследований разработаны также методики культивирования клинических изолятов патогенной бледной трепонемы *in vitro* на клеточных культурах млекопитающих, однако эти методики позволяют поддерживать не более 11 пассажей и при этом не обеспечивают получение значимых количеств биомассы микроорганизма [60, 61, 121].

### ***1.1.1 Морфология и физиология T. pallidum***

*T. pallidum* имеет сложное клеточное строение с рядом ключевых особенностей. Микроорганизм покрыт наружной и внутренней (цитоплазматической) мембраной (Рисунок 2) и содержит в периплазме между ними слой пептидогликана с флагеллярными фибриллами, обеспечивающими форму и движение бактерии [178]. Винтовое поступательное движение дает возможность для *T. pallidum* диссеминировать в различные ткани организма хозяина. Наружная мембрана *T. pallidum* представлена билипидным слоем и играет важную роль при первичном контакте бактерии с организмом хозяина; она содержит небольшое количество трансмембранных белков, определяющих вирулентность бледной трепонемы. Цитоплазматическая мембрана *T. pallidum* содержит высокоиммуногенные липопроотеины, ассоциированные с периплазматической поверхностью цитоплазматической мембраны [90].

*T. pallidum* обладает различными системами транспорта для переноса макромолекул через внутреннюю мембрану. Такие системы включают в себя гомологи транспортных белков других микроорганизмов, например, системы транспорта метионина, ионов металлов, сахаров. Предположительно, что гомологи АТФ-связывающих транспортных комплексов (*ABC-transporters*) могут функционировать как переносчики близких типов молекул, таких как глюкозы наравне с галактозой (*Mgl-ABC*) [90, 62]. Также было обнаружено, что в состав цитоплазматической мембраны входят пенициллин-связывающие белки [120].

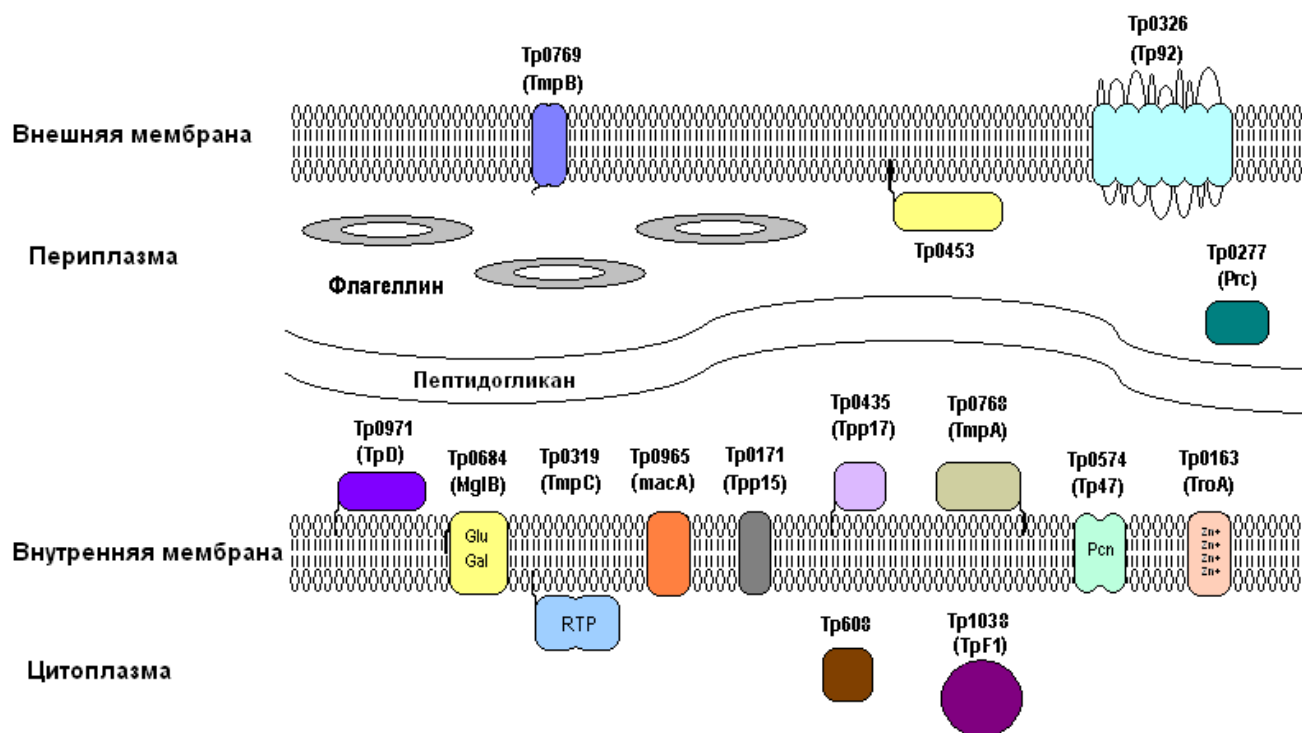


Рисунок 2 – Строение клеточной мембраны *T. pallidum*

Стоит отметить, что, поскольку для *T. pallidum* белки класса порины не описаны, в настоящий момент неясен механизм транспорта метаболитов через наружную мембрану. Единственным возможным кандидатным белком для выполнения данной функции считается Trp0453, для которого предполагают участие в неспецифической диффузии метаболитов через наружную мембрану *T. pallidum* [70].

На поверхности наружной мембраны *T. pallidum* количество белков очень мало, и, кроме этого, отсутствуют липополисахариды, типичные для грам-отрицательных бактерий [90]. Основными факторами вирулентности являются белки наружной мембраны, белки флагеллярного комплекса и липопротеины. *T. pallidum* способна связывать компоненты сыворотки организма хозяина, клеточные мембраны и компоненты экстрацеллюлярного матрикса. При контакте *T. pallidum* с клетками эндотелия сосудов, клетками иммунной системы происходит их активация, вырабатываются медиаторы воспаления, запускаются механизмы клеточного и гуморального иммунитета [90, 126].

*T. pallidum* является микроаэрофильной бактерией с оптимальной температурой роста 37 °С, что обуславливает сложности культивирования данного микроорганизма *in vitro*. Ее метаболизм включает в себя ограниченное число процессов, которые спирохета способна осуществлять самостоятельно (такие, как гликолиз, преобразование аминокислот и жирных кислот), при этом большинство метаболитов *T. pallidum* получает за счет

клеток организма хозяина. У *T. pallidum* отсутствуют цикл Кребса и цепи переноса электронов через мембраны [114]; также не обнаружены белки, позволяющие использовать альтернативные источники углерода для получения энергии и синтеза кофакторов ферментов и нуклеотидов [143, 62, 90].

Транспорт макромолекул из тканей организма хозяина внутрь клетки патогена осуществляется посредством специальных белков–транспортёров. Медленный рост *T. pallidum in vitro* также связан с чувствительностью бактерии к кислороду вследствие отсутствия у неё таких ферментов, как каталаза и оксидаза [133]. Чувствительность *T. pallidum* к температуре окружающей среды можно объяснить отсутствием у бактерии реакции теплового шока, и, как следствие, термолабильностью ферментов *T. pallidum* [152]. Ограниченное число делений *T. pallidum* может происходить в культуре клеток, но стандартным методом культивирования является выращивание бактерий *in vivo* [47].

### **1.1.2 Механизмы заражения и персистенции *T. pallidum* в организме человека**

Инфицирование происходит преимущественно половым путём, но инфекция может передаваться также трансплацентарно (врождённый сифилис), при тесных бытовых контактах (бытовой путь передачи) и при переливании крови (гематрансфузионный путь передачи) [136]. *T. pallidum* не выживает вне организма хозяина и теряет вирулентность в течение нескольких часов или дней [90]. Во влажной среде трепонемы могут сохранять жизнеспособность до 15 ч, а в замороженных тканях – несколько недель [177]. *T. pallidum* чувствительна к высыханию, солнечным лучам, дезинфицирующим средствам; при нагревании до 60 °С гибнет в течение 15 мин, при 100 °С – мгновенно [178].

Главным преимуществом в отношении вирулентности *T. pallidum* принято считать особенности строения внешней мембраны и практически полное отсутствие (за редким исключением) иммуногенных агентов на поверхности данного патогена. Внешняя мембрана *T. pallidum*, в отличие от мембран других грамотрицательных бактерий, лишена липополисахаридов и эндотоксинов, а количество белков на ее поверхности значительно меньше, чем у других бактерий [90, 67]. Это приводит к тому, что возбудитель сифилиса может персистировать в организме хозяина в течение длительного времени, оставаясь мало заметным для иммунной системы [90, 35].

Особыми формами существования бледной трепонемы являются цисты, споры, L–формы, зёрна, которые при снижении иммунитета могут переходить в вирулентную

форму и вызывать активизацию болезни. *T. pallidum* способна проникать в иммунопри-вигированные зоны организма, такие как центральная нервная система, глаза, плацен-та, где выживает и медленно размножается и накапливается, способствуя хронизации процесса. При возникновении благоприятных условий происходит реактивация инфек-ции и бактерия быстро распространяется по организму хозяина [174].

## 1.2 Клиническая характеристика сифилиса

Согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) сифилис подразделяют на следующие группы согласно формам заболевания [174]:

- врожденный сифилис (код по МКБ-10 – А50.0–А50.9), включающий в себя врож-денные манифестные формы, врожденный ранний и поздний скрытый сифилис, а также врожденный нейросифилис;
- ранний сифилис (код по МКБ-10 – А51.0–А51.9), включающий в себя ранние приобретенные манифестные формы, в том числе внутренних органов и опорно-двигательного аппарата и нейросифилис, а также ранний сифилис скрытый;
- поздний сифилис (код по МКБ-10 – А52.0–А52.9), включающий в себя поздние приобретенные манифестные формы, в том числе внутренних органов и опорно-двигательного аппарата и нейросифилис, а также поздний сифилис скрытый;
- другие и неуточненные формы сифилиса (код по МКБ-10 – А53.0–А53.9), вклю-чающий в себя скрытый сифилис, неуточненный как ранний или поздний и другие не-уточненные формы.

### 1.2.1 Врожденный сифилис

Врождённый сифилис передается через плацентарный барьер во время беремен-ности от матери к ребенку через плаценту или в процессе родов в результате контакта с поражёнными участками слизистой оболочки [107]. В большинстве случаев плод инфицируется от больной матери после 16 недели беременности, что приводит к поражению плода, заканчивающемуся либо его гибелью на 24-28 неделе и выкидышем, либо рожде-нием ребенка с врожденным сифилисом. Различают ранний (проявляется в первые 2 го-да жизни) и поздний (проявляется в более позднем возрасте) врожденный сифилис, про-

текающий как с клиническими проявлениями (манифестный), так и без них (скрытый) [177, 178].

Первые симптомы раннего врожденного сифилиса появляются сразу после рождения или в возрасте 1,5–4 мес и являются характерными для врожденного сифилиса и не встречаются при приобретенных формах (сифилитический пемфигоид, диффузная инфильтрация кожи Гохзингера, специфический ринит (сухая, катаральная и язвенная стадии) и остеохондрит длинных трубчатых костей Вегнера (I, II и III степени, выявляется при рентгенологическом исследовании). У новорожденных могут быть типичные проявления сифилиса, встречающиеся не только при раннем врожденном, но и при приобретенном сифилисе (папулезная и розеолезная сыпь), поражения костей в виде периостита, остеопороза и остеосклероза, поражения внутренних органов в виде специфических гепатита, гломерулонефрита, миокардита, эндо- и перикардита, а также поражения центральной нервной системы в виде специфического менингита, гидроцефалии [174, 27].

Симптомы позднего врожденного сифилиса обычно появляются в пятилетнем возрасте и напоминают симптомы третичной формы с типичными поражениями костной и нервной ткани, прогрессирующей глухотой и слепотой [177]. Детально эти симптомы можно охарактеризовать достоверными признаками (триада Гетчинсона: паренхиматозный кератит, лабиринтная глухота, зубы Гетчинсона), вероятными признаками (саблевидные голени, хориоретиниты, деформации носа, лучистые рубцы вокруг рта, ягодицеобразный череп, деформации зубов, сифилитические гониты, поражения нервной системы в виде гемипарезов и гемиплегий, расстройств речи, слабоумия, церебрального детского паралича и джексоновской эпилепсии) и дистрофиями (утолщение грудинного конца правой ключицы, дистрофии костей черепа в виде «олимпийского» лба, высокое «готическое» или «стрельчатое» небо, отсутствие мечевидного отростка грудины, инфантильный мизинец, широко расставленные верхние резцы, бугорок на жевательной поверхности первого моляра верхней челюсти). Кроме того, характерны специфические поражения на коже и слизистых оболочках в виде бугорковых и гуммозных сифилидов кожи, слизистых оболочек, поражения органов и систем, особенно костной (периостит, остеопериостит, гуммозный остеомиелит, остеосклероз), печени и селезенки, сердечно-сосудистой, нервной и эндокринной систем [174]. Серологическим признаком наличия врожденного сифилиса является повышение уровня антител класса IgA и IgM, так как указанные антитела не проходят через плаценту [144].

### 1.2.2 Приобретенные формы сифилиса

**Первичный сифилис** развивается в среднем через 3-4 недели после внедрения возбудителя сифилиса через повреждения на коже или слизистой оболочке [107]. В области заражения возникает первичный аффект (твёрдый шанкр, *ulcus durum*), как правило, локализующийся в ано-генитальной области, представляющий собой поверхностную язву или эрозию диаметром от 0,2-2 см и более, округлых очертаний, с ровными краями, гладким, блестящим дном розового или красного, иногда серовато-желтого цвета, блюдцеобразной формы (язва), со скудным серозным отделяемым, безболезненная при пальпации; в основании первичной сифиломы — плотноэластический инфильтрат. Первичный аффект сопровождается регионарным лимфаденитом, реже лимфангитом; может быть типичным (эрозивный, язвенный) и атипичным (индуративный отек, шанкр-панариций и шанкр-амигдалит); единичным и множественным; генитальным, перигенитальным и экстрагенитальным; при присоединении вторичной инфекции — осложненным (импетигинизация, баланопостит, вульвовагинит, фимоз, парафимоз, гангренизация, фagedенизм) [174]. Встречаются как одиночные, так и множественные формы шанкра, в настоящее время имеется тенденция к увеличению числа больных с множественными формами [178]. Одновременно с появлением первичного аффекта проявляется комплекс симптомов с вовлечением в процесс региональных лимфатических узлов. Через 3-4 недели после образования шанкра или через 6-7 недель после инфицирования в крови нарастает титр антител. При отсутствии лечения возникает гематогенное распространение возбудителя, а первичный аффект через 8-12 недель заживает, формируя рубец [177].

**Вторичный сифилис.** После появления первичного аффекта (через 7-8 недель) бледная трепонема проходит барьер лимфатической системы, после чего попадает в кровеносную систему человека, запуская тем самым гематогенную диссеминацию и генерализацию инфекции. В этот период у части пациентов появляются продромальные симптомы, возникающие обычно за 7-10 дней до появления вторичных сифилидов. Отмечаются слабость, снижение работоспособности, адинамия, головная боль, артралгии, миалгии, боли в костях, повышение температуры тела (чаще до 37,5-38 °С) [107]. Вторичный период сифилиса вследствие гематогенной диссеминации трепонем проявляется высыпаниями на коже розеолезными (пятнистыми), папулезными (узелковыми), папуло-



пустулезными (гнойничковыми) и редко везикулезными (пузырьковыми) и слизистых оболочках (ограниченными и сливными розеолезными и папулезными сифилидами). Возможны остаточные явления первичного сифилиса, поражения внутренних органов, опорно-двигательного аппарата и нервной системы [174]. Ещё одним клиническим проявлением вторичного сифилиса является диффузная алопеция [27]. Уровень антител в сыворотке крови достигает в этот период наиболее высокого уровня. На стадии вторичного сифилиса происходит резкое увеличение фракции IgG3 антител; формируется иммунный комплекс, состоящий из антител IgG1/IgG3 классов, связанных с антигенами *T. pallidum* [177].

**Третичный сифилис** развивается у 8–40 % пациентов, не получивших своевременного лечения [27]. Он может следовать сразу за вторичным сифилисом, однако в большинстве случаев между вторичным и третичным периодами наблюдается скрытый период. Появление симптомов третичного сифилиса возможно спустя многие годы после заражения при бессимптомном течении инфекции. На стадии третичного сифилиса происходит поражение внутренних органов и систем, в которых появляются гуммы – очаги специфического воспаления, имеющие некротизированный центр, окружённый слоями макрофагов и фибробластов, снаружи от которых располагаются лимфоциты и плазматические клетки. Проявляется высыпаниями на коже и слизистых оболочках (бугорковый и гуммозный сифилиды, третичная розеола Фурнье). Поражения могут быть не только очаговые, но и диффузные. В третичном периоде чаще всего поражается аорта (80–85% случаев), центральная нервная система (5–10% случаев), а также печень, кости и яички [176, 174].

**Скрытый сифилис** клинически никак не проявляется, и возможности стандартных тестов лабораторной диагностики в данном случае ограничены. Причиной скрытого сифилиса и бессимптомного течения заболевания считают наличие у *T. pallidum* L-форм, а также явления эндоцитобиоза [178]. Выделяют две разновидности скрытого сифилиса – ранняя (до 2 лет после инфицирования) и поздняя (более 2 лет после инфицирования) формы. Различие между этими формами состоит в эпидемиологической опасности больного: при половых контактах пациенты с ранним скрытым сифилисом потенциально заразны. Ранний скрытый сифилис, как правило, развивается в течение 1 года после инфицирования, характеризуется сероконверсией, отсутствием симптомов первичного и вторичного сифилиса, при этом в анамнезе часто присутствуют половые контакты с ли-

цами с первичной, вторичной, ранней скрытой формами сифилиса в течение предшествующего года [27]. Диагноз устанавливается на основании результатов исследования сыворотки крови с помощью серологических методов (нетрепонемных и трепонемных тестов) и анамнестических данных. В некоторых случаях диагностике сифилиса помогают данные объективного осмотра (рубец на месте бывшей первичной сифиломы, увеличение лимфатических узлов), а также появление температурной реакции обострения (реакция Яриша-Герксгеймера) после начала специфического лечения [174]. Поздний скрытый сифилис асимптоматичен и развивается через несколько лет после инфицирования. Более чем у половины пациентов без соответствующего лечения скрытый сифилис может оставаться в той же стадии, однако у одной трети больных заболевание прогрессирует – развивается третичная форма сифилиса [27]. В случае нелеченного скрытого сифилиса выявляется невысокий уровень антител класса IgM на фоне повышенного уровня IgG антител [146].

**Нейросифилис.** Поражение центральной и периферической нервной системы может возникать в любой стадии развития сифилиса и отличаться разнообразными неврологическими или психическими нарушениями [90]. Различают асимптомный и манифестный нейросифилис. По срокам от момента заражения нейросифилис условно разделяют на ранний (до 5 лет с момента заражения) и поздний (свыше 5 лет с момента заражения) [178]. Асимптомный нейросифилис характеризуется отсутствием клинических проявлений. Нейросифилис с симптомами проявляется любыми неврологическими или психическими нарушениями, которые имеют острое или подострое развитие и прогрессируют в течение нескольких месяцев или лет. Чаще всего из ранних форм нейросифилиса встречается менингovasкулярный сифилис, в клинической картине которого преобладают симптомы поражения оболочек и сосудов мозга: сифилитический менингит (острый конвекситальный, острый базальный, острая сифилитическая гидроцефалия), сифилитический увеит (хориоретинит, ирит), васкулярный нейросифилис (ишемический, реже геморрагический инсульт), спинальный менингovasкулярный сифилис (сифилитический менингомиелит). К поздним формам нейросифилиса относят прогрессирующий паралич, спинную сухотку, табопаралич, атрофию зрительных нервов и гуммозный нейросифилис, в клинической картине которых преобладают симптомы поражения паренхимы мозга. Диагноз нейросифилиса с симптомами устанавливается на основании сочетания клинических проявлений с положительными результатами серологи-

ческих тестов с цереброспинальной жидкостью и изменением состава последней (числа клеток и уровня белка), скрытого – на основании лабораторного выявления патологических изменений цереброспинальной жидкости [174]. Диагноз нейросифилиса подтверждается характерными изменениями в составе цереброспинальной жидкости, а также положительными результатами лабораторных тестов [136].

**Сифилис внутренних органов и опорно-двигательного аппарата** по срокам от момента заражения условно разделяют на ранние (до 2 лет с момента заражения) и поздние (свыше 2 лет с момента заражения) формы. При ранних формах чаще всего развиваются только функциональные расстройства пораженных органов. В патологический процесс преимущественно вовлекается сердце (ранний кардиоваскулярный сифилис), печень (безжелтушные или желтушные формы гепатита), желудок (преходящая гастропатия, острый гастрит, образование специфических язв и эрозий), почки (бессимптомная дисфункция почек, доброкачественная протеинурия, сифилитический липоидный нефроз, сифилитический гломерулонефрит). Наиболее ранний симптом поражения опорно-двигательного аппарата – ночные боли в длинных трубчатых костях конечностей. Никакими объективными изменениями костей боли не сопровождаются. Могут наблюдаться специфические синовиты и остеоартриты. При поздних формах наблюдаются деструктивные изменения внутренних органов. Чаще всего регистрируются специфические поражения сердечно-сосудистой системы (мезаортит, недостаточность аортальных клапанов, аневризма аорты, миокардит, гуммозные эндо- и перикардиты), реже – поздние гепатиты (ограниченный (очаговый) гуммозный, милиарный гуммозный, хронический интерстициальный и хронический эпителиальный), еще реже – другие поздние висцеральные сифилитические поражения. К поздним проявлениям патологии опорно-двигательного аппарата относятся табетическая артропатия и гуммозные поражения костей и суставов [178, 174].

### **1.3 Эпидемиология сифилиса**

Сифилис остается одной из наиболее распространенных в мире инфекций, передаваемых половым путем. По данным мировой статистики сифилисом инфицировано более 25 млн человек, ежегодно выявляется около 12 млн новых случаев инфицирования, из них более 2 млн случаев среди беременных женщин [150]. Ситуация усугубляет-

ся тем, что у больных сифилисом повышен риск заражения ВИЧ (по разным оценкам варьируется от 2,3 % до 8,6 %) вследствие наличия эрозивных и язвенных дефектов кожи и слизистых оболочек половых органов, и эти инфекции в значительной степени сопутствуют друг другу и осложняют течение каждой из них [150, 5].

В отчете Всемирной Организации Здравоохранения, ВОЗ (*World Health Organization, WHO*) заболеваемость сифилисом в мире за 2013 год составила 25,1 (варьируется по странам от 0,1 до 1664) случаев на 100 000 населения, а в 2014 году – 25,7 (варьируется по странам от 0,1 до 609,5) на 100 000 населения. Среди мужчин и женщин этот показатель был практически одинаковым – 17,2 и 17,7 случаев на 100 000 населения, соответственно. Наивысшая заболеваемость сифилисом по данным ВОЗ за 2014 год наблюдалась в странах западной части Тихого океана – 93,0 случаев (варьируется по странам от 7,4 до 609,5) на 100 000 населения и на африканском континенте – 46,6 (варьируется по странам от 23,5 до 452,4) на 100 000 населения, что значительно отличалось от средней заболеваемости сифилисом в европейских странах – 6,2 случаев (варьируется по странам от 0,1 до 58,7) на 100 000 населения [186]. Однако особо отмечается, что во многих странах в наши дни скрининг населения на сифилис весьма ограничен, в частности, вследствие малых поставок диагностических тест-наборов. Также во многих странах ограничены поставки и применение бензатин бензилпенициллина, особенно в странах Африки. ВОЗ в своем отчете говорит о том, что ликвидация врожденного сифилиса требует международных координированных действий в сфере усиления правовой защиты и привлечения инвестиций в данной области для улучшения текущей эпидемиологической ситуации.

В США с начала 2000-х г.г. наблюдалось постепенное увеличение заболеваемости сифилисом (Рисунок 3). Так, в 2001 году заболеваемость сифилисом (первичный и вторичный сифилис) составила 2,1 случая на 100 000 населения, что является самым низким значением данного показателя начиная со второй половины прошлого века. В 2012 году было зарегистрировано уже 5,0 случаев, а в 2015 году - 7,4 случая на 100 000 населения. В 2016 году этот показатель вырос до 8,7 случаев на 100 000 населения, что на 17,6% и 74,0% больше по сравнению с данными 2015 и 2012 г.г., соответственно.



Рисунок 3 – Частота выявления сифилиса в США за период 1990-2017 г.г. по данным американского Центра контроля и профилактики заболеваний Министерства здравоохранения США [187]

В абсолютных значениях общее число вновь зарегистрированных случаев сифилиса всех форм (первичный, вторичный, ранний скрытый, поздний, поздний скрытый и врожденный) за период 2015–2016 г.г. в США выросло на 17,8 % (с 74 707 до 88 042 случаев). За тот же период процент ранних скрытых форм сифилиса по данным CDC увеличился на 19,7 % (с 24173 до 28924 случаев), а поздних и поздних скрытых форм на 17,2 % (с 26170 до 30676 случаев) [187]. В 2017 году в США было зарегистрировано 30 644 вновь выявленных случаев сифилиса, что составило 9,5 случаев на 100 000 населения. Эта цифра превысила соответствующий показатель 2013 года на 72,7% (5,5 случаев на 100 000 населения).

По данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний (*European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC*) в 30 странах Европы в промежуток между 2005 и 2014 г.г. было зарегистрировано 208 134 случая заболевания сифилисом. Общий тренд в 2005–2009 г.г. был на снижение, однако начиная с 2010 года поменялся на противоположный, в частности, повышение заболеваемости сифилисом более чем на 50 % было зарегистрировано в Бельгии, Франции, Германии, Исландии, Ирландии, Люксембурге, Мальте, Норвегии, Португалии и Великобритании (Рисунок 4).

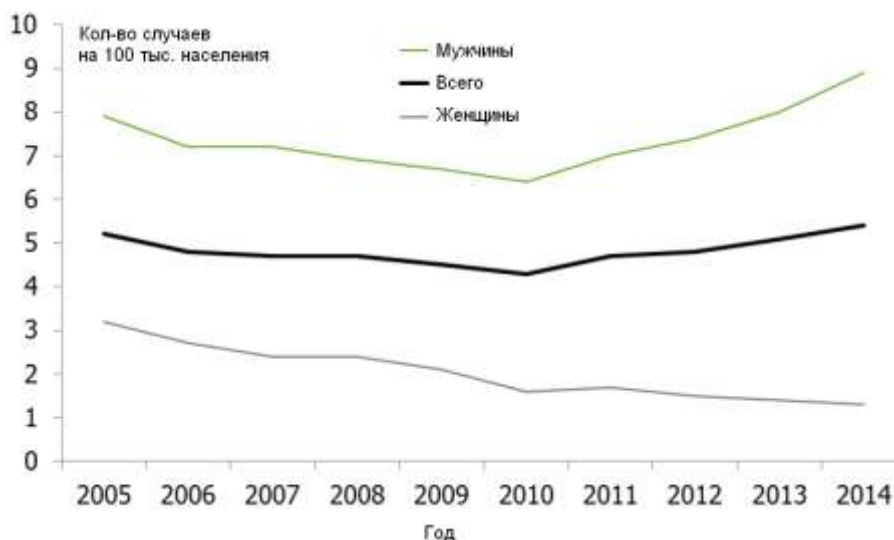


Рисунок 4 – Частота выявления сифилиса в Европе за период 2005-2014 г.г. [188]

Последние эпидемиологические данные подтверждают общую тенденцию роста заболеваемости сифилисом в Европе, но за период 2008-2013 г.г. было отмечено снижение количества выявленных случаев заражения у женщин с 2,3 до 1,6 случаев на 100 000 населения, и за тот же период заболеваемость у мужчин выросла с 6,5 до 8,5 случаев на 100 000 населения [87].

За последние 10 лет заболеваемость сифилисом в России, в отличие от общемировых тенденций, значительно снизилась: с 65,4 в 2006 году до 21,3 случая в 2016 году на 100 000 населения [8]. В 2013 г. было зарегистрировано 333 852 вновь выявленных случая заражения ИППП, из них 41 455 вновь выявленных случаев сифилиса, что составило 233,4 и 28,9 на 100 000 населения, соответственно [9]. В 2016 году было зарегистрировано уже 31 143 новых случаев заражения, и далее наблюдалась тенденция к снижению данного показателя: в 2017 году было выявлено 28 639 новых случаев сифилиса (19,5 случаев на 100 000 населения), а в 2018 году – 24 563 новых случаев сифилиса (16,7 случаев на 100 000 населения) по данным сборника статистических материалов «Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и заболеваниями кожи» за 2017-2018 г.г. [193].

Как видно из графика на рисунке 5, заболеваемость сифилисом в РФ значительно уменьшилась за последнее десятилетие как среди мужчин, так и среди женщин. Заболеваемость сифилисом выше среди мужчин, однако превышает соответствующий показатель среди женщин не более чем в 1,5 раза.

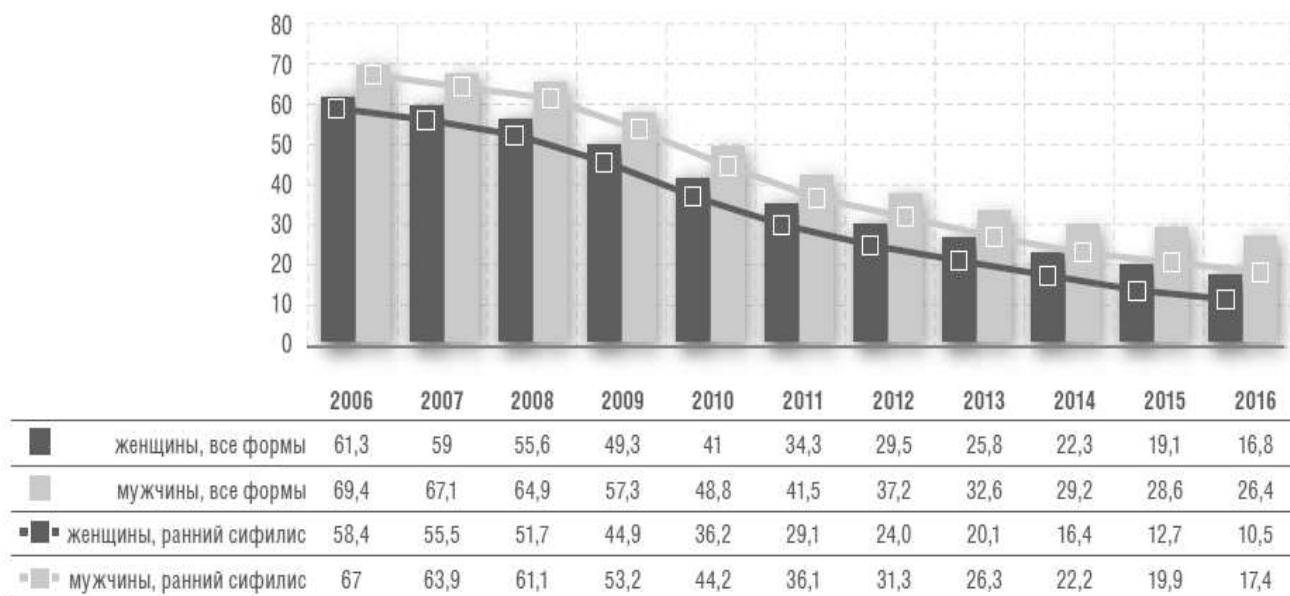


Рисунок 5 – Частота выявления сифилиса в РФ за период 2006-2016 г.г. среди мужчин и женщин на 100 000 населения [7]

Важным аспектом современной эпидемиологии сифилиса является преобладание скрытых форм сифилиса. Детальное изучение структуры заболеваемости сифилисом в России показало, что, к примеру, в 2006 году среди ранних форм сифилиса почти половина всех случаев пришлось на ранний скрытый сифилис (47,3%), вслед за которым по частоте выявляемости встали вторичный (34,1%) и первичный сифилис (14,0%). Далее наблюдалось увеличение процента скрытых форм данного заболевания, как среди ранних, так и среди поздних форм. В 2013 г. на долю раннего сифилиса пришлось 79,5% от общей заболеваемости, при этом среди ранних форм наибольший процент занимают ранние скрытые формы – 58,6%. В структуре поздних форм сифилиса (12,2% в общей структуре заболеваемости) также преобладает поздний скрытый сифилис – 76,0%. [9]. В 2016 году количество ранних форм сифилиса составило 64,4% от всех зарегистрированных случаев, из которых на долю первичного, вторичного и неуточненного сифилиса пришлось только 34,2%, тогда как 65,8% составили случаи раннего скрытого сифилиса. Из общего числа зарегистрированных случаев поздних форм сифилиса доля позднего скрытого сифилиса составила 77,1% [8].

Актуальные данные по заболеваемости сифилисом в РФ (Рисунок 6) характеризуют общее снижение данного показателя в период 2006-2018 г.г., а также отражают сохранение преобладания скрытых форм сифилиса в последние годы.

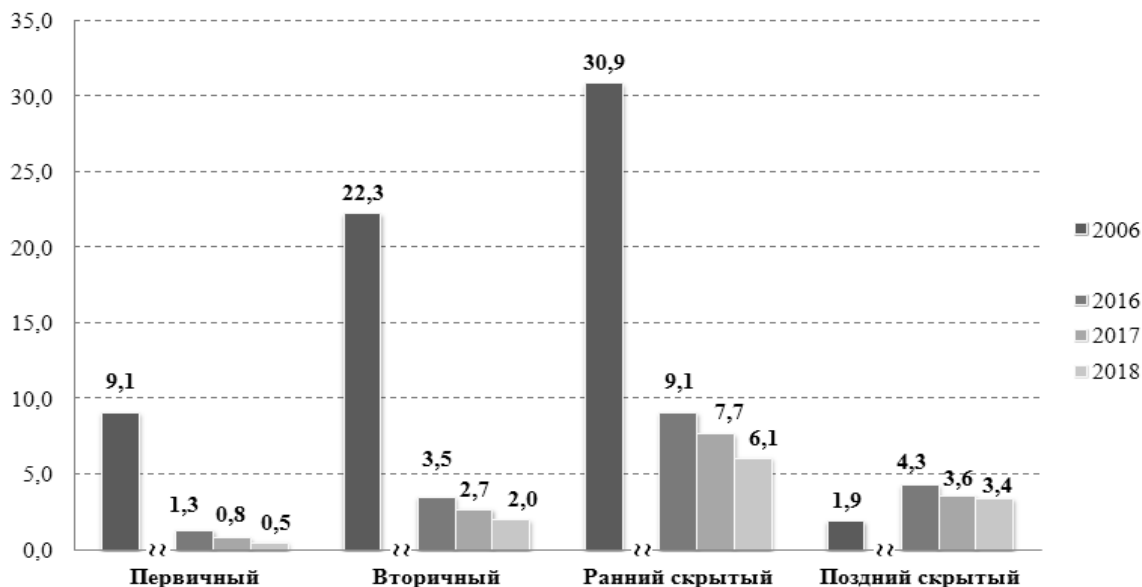


Рисунок 6 – Заболеваемость сифилисом (по формам) в 2006 г. и в 2016-2018 г.г. на 100 000 населения в РФ [189]

Заболеваемость ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом в 2018 году составила 6,1 и 4,7 случаев на 100 000 населения, что значительно превышало заболеваемость первичным и вторичным сифилисом в этот же период, которая составила 0,5 и 2,0 случаев на 100 000 населения, соответственно [193]

Эти данные однозначно указывают на необходимость усиления эпидемиологического контроля и широкого внедрения в практику современных высокочувствительных и специфичных методов исследований для диагностики сифилиса, в особенности его скрытых форм.

#### 1.4 Методы диагностики сифилиса

Первыми и актуальными в настоящее время методами лабораторной диагностики сифилиса остаются методы прямого выявления возбудителя в образцах биоматериала больных. Прямые методы диагностики сифилиса представляют собой исследование биообразцов из очагов поражения на коже и видимых слизистых оболочках, и основаны на визуальной идентификации *T. pallidum* по морфологическим свойствам при микроскопии в темном поле, а также на применении прямой иммунофлуоресценции, гистологического исследования тканей или выявлении уникальных фрагментов генетического материала молекулярно-биологическими методами (ПЦР, ДНК/ДНК гибридизация)



[123]. Для методов прямой диагностики первичного, вторичного и раннего врожденного сифилиса используют серозную жидкость, полученную из области повреждения, кроме этого исследуются образцы биопсии лимфатических узлов, других поражённых тканей, а также спинномозговая и амниотическая жидкости [136].

Однако диагностика сифилиса осложняется наличием множественных скрытых форм, при которых нет открытых поражений кожи и невозможно получить образец возбудителя для конкретного пациента. Вследствие этого огромное значение в диагностике сифилиса имеют непрямые методы, основанные на исследовании образцов сыворотки крови для выявления антител к кардиолипиновому антигену или антигенам *T. pallidum* с помощью нетрепонемных и трепонемных серологических тестов, соответственно [3, 3].

#### **1.4.1 Прямые методы диагностики**

В основе прямых методов диагностики сифилиса лежит обнаружение непосредственно возбудителя заболевания в образцах биоматериала, полученных из очага поражения или биологических жидкостей, с визуальной идентификацией патогена с помощью микрокопии или выявлением уникальных фрагментов его генетического материала молекулярно-биологическими методами.

**Темнопольную микроскопию (*Dark-field microscopy, DFM*)** применяют при наличии сифилитических повреждений на коже и слизистых оболочках, поскольку экссудат поражённого участка содержит множество трепонем. Образцами для исследования могут быть соскобы очагов поражения, пункции региональных лимфатических узлов, образцы спинномозговой и амниотической жидкости. Идентификация бледной трепонемы основана на характерной морфологии и подвижности спирохеты. Тем не менее, в некоторых случаях наличие непатогенных трепонем в урогенитальном тракте затрудняет исследование, так как морфология этих трепонем сходна с таковой у *T. pallidum* и, таким образом, возможно получение ложноположительных результатов [136, 11]. Использование данного метода диагностики сифилиса предпочтительно у пациентов с иммунодефицитом или на ранних стадиях инфекции, когда антитела ещё не вырабатываются.

**Прямая иммунофлуоресценция (*Direct fluorescent antibody test for T. pallidum, DFA-TP*)**. Это наиболее специфичный метод для диагностики сифилиса при наличии сифилитических повреждений. В этом методе используются антитела к антигенам тре-

понемы, меченные изотиоцианатной флуоресцентной (FITC) меткой. Применение этого метода может быть ограничено доступностью коммерческих реагентов, в том числе меченых моноклональных антител к *T. pallidum* [136, 11].

**Гистологическое исследование** выполняется преимущественно в стадии вторичного или уже третичного сифилиса, когда в поражённых тканях обнаруживаются гуммы. Для того чтобы обнаружить *T. pallidum* в гистологических образцах используют метод прямой иммунофлуоресценции, часто в сочетании с окрашиванием тканей специфическими красителями (иммуногистохимическое исследование), что позволяет одновременно исследовать тканевые структуры [136].

**Полимеразная цепная реакция, ПЦР (*Polymerase chain reaction, PCR*)**. Методы, в основе которых лежит амплификация нуклеиновых кислот, обладают высокой чувствительностью и специфичностью. ПЦР используют для диагностики врождённого сифилиса, нейросифилиса, а также в раннем периоде первичного сифилиса, когда традиционные тесты имеют ограниченную чувствительность [136]. Ограничение метода состоит в доступности и содержании генетического материала возбудителя в анализируемом образце [1].

#### **1.4.2 Непрямые методы диагностики – характеристика и алгоритмы применения**

Непрямые методы имеют большое значение в диагностике сифилиса и включают в себя различные типы серологических исследований. Первый серологический тест – реакция связывания комплемента (РСК) был предложен в 1901 г. Bordet J. и Gengou V. [30], а в 1906 г. был адаптирован Вассерманом А. [164]. В качестве антигена в реакции Вассермана использовался экстракт печени новорождённых с врождённым сифилисом.

Применение нетрепонемных серологических тестов в начале 40-х годов XX века связывают с открытием Pangborn M.C. кардиолипинового антигена [124, 91]. Высокоиммуногенная смесь очищенных кардиолипина, холестерина и лецитина стала применяться в тестах, основанных на реакции микрофлюккуляции [68].

В настоящее время применяются стандартизированные, достаточно эффективные серологические методы, которые можно разделить на две большие категории:

– **нетрепонемные тесты** основаны на обнаружении антител к липидным антигенам (в основном – к кардиолипину), и традиционно использовались в качестве скрининговых в рамках прямого алгоритма серодиагностики сифилиса;

– **трепонемные тесты** основаны на выявлении трепонема-специфических антител в биообразцах пациента, и в роли антигена выступает непосредственно *T. pallidum* или её компоненты.

В некоторых нетрепонемных серологических тестах в качестве анализируемого образца используется плазма крови, однако основным материалом для исследования как в нетрепонемных, так и в трепонемных серологических тестах является сыворотка крови. Кроме этого может исследоваться спинномозговая жидкость в случае врожденного или третичного сифилиса, и при наличии неврологической симптоматики. При врожденном сифилисе анализируются одновременно образцы сыворотки крови матери и ребенка [136, 10].

Уровень антител (трепонемных и нетрепонемных) по результатам серологических исследований характеризует иммунный ответ пациента на инфекцию и является основой для постановки диагноза. Первым повышается титр трепонема-специфических иммуноглобулинов класса IgM, и затем через несколько недель следует повышение титра иммуноглобулинов класса IgG (Рисунок 7).

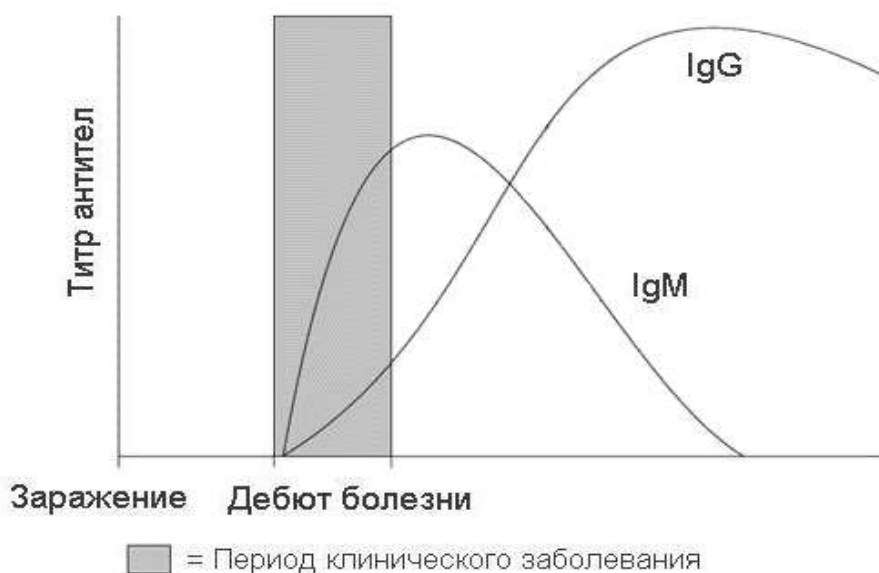


Рисунок 7 – Профиль изменения уровня иммуноглобулинов IgG и IgM после заражения<sup>2</sup>

<sup>2</sup> [<http://www.mims.com/hongkong/diagnoses/info/>]

Специфические антитела класса IgG и IgM детектируются в трепонемных серологических тестах через 1-2 недели после инфицирования (Рисунок 8), за ними через 2-3 недели становятся положительными нетрепонемные тесты [125].

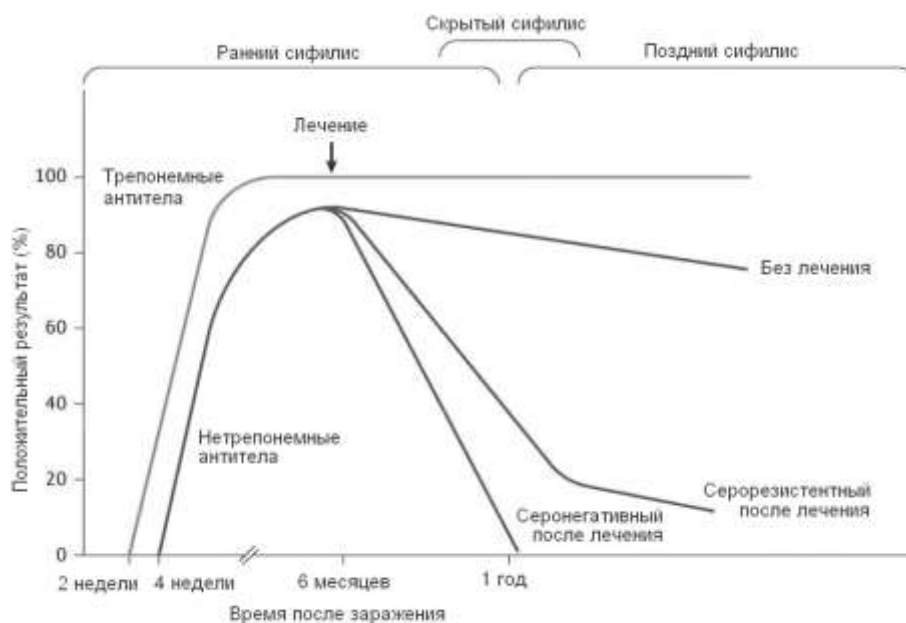


Рисунок 8 – Профиль изменения уровня трепонемных и нетрепонемных антител в течение сифилитической инфекции и после проведения лечения [125]

После эффективного лечения (условно обозначено на рисунке 8 в срок 6 месяцев) уровень нетрепонемных антител падает, тогда как уровень трепонемных антител может оставаться высоким многие годы. Приблизительно у 20% пациентов нетрепонемные антитела детектируются в крови в течение 6 месяцев после лечения, этих пациентов относят к группе больных сифилисом с серорезистентностью. После повторного лечения около 11% из этих пациентов так и остаются серорезистентными.

Согласно общепринятым критериям лабораторной диагностики сифилиса, диагноз «сифилис» устанавливается при одновременном получении положительных результатов нетрепонемного теста (*RPR*, *RMP*, *VDRL*), и подтверждающего трепонемного теста (ИФА, РПГА, РИФ) [174, 136].

Прямой алгоритм серологического исследования сифилитической инфекции включает в себя первичное определение кардиолипидных антител с использованием нетрепонемного теста *RPR* (*RMP* или *VDRL*), а далее образцы с положительной реакцией исследуются на наличие трепонемаспецифических антител с применением лабораторных тестов ИФА, РПГА, РИФ<sub>abc</sub> (Рисунок 9) [125].

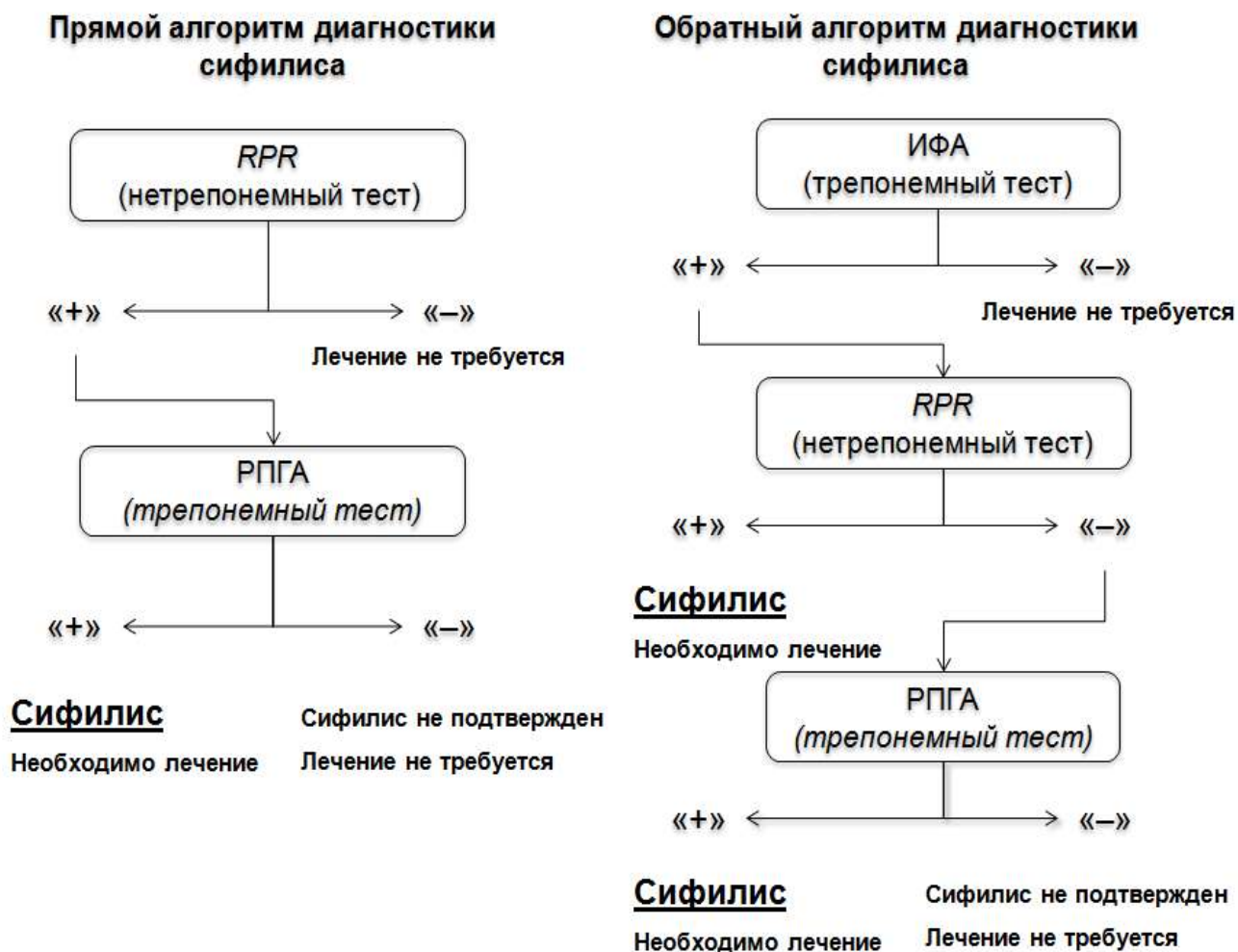


Рисунок 9 – Прямой и обратный алгоритмы диагностики сифилиса

Однако современные российские и зарубежные клинические рекомендации по диагностике сифилиса говорят о переходе от прямого алгоритма к обратному. Последний заключается в исходном скрининге сыворотки крови трепонемными методами ИФА/РИФ/РПГА с набором рекомбинантных трепонемных антигенов, и дальнейшем применении нетрепонемного теста [11, 174, 125, 190, 191]. Обратный алгоритм позволяет эффективно идентифицировать различные формы течения сифилиса, а также отличить пациентов, успешно прошедших терапию сифилиса от пациентов, частично излеченных и пациентов, не получавших терапию.

Показано, что первыми в крови обнаруживаются трепонема-специфические антитела, поэтому обратный алгоритм позволяет диагностировать ранние формы сифилиса, которые могут быть пропущены при скрининге нетрепонемными тестами на самых ранних этапах инфекции [125]. Первым выполняется трепонемный тест (ИФА или реакция иммунохемилюминисценции), и его положительный результат далее подтверждается

стандартным нетрепонемным тестом (*RPR*, *VDRL*) с указанием титра (Таблица 1). Если результат нетрепонемного теста оказывается отрицательным, то следует провести дополнительный трепонемный тест, предпочтительно с другими антигенами. Если результат второго трепонемного теста положительный, то пациенты с терапией сифилиса в анамнезе не нуждаются в каких-либо дальнейших процедурах. В противном случае рекомендуется провести дополнительный нетрепонемный тест через 2–4 недели для определения ранней инфекции. Пациентам без лечения сифилиса в анамнезе должен быть предложен курс терапии данного заболевания. В отсутствие клинических проявлений текущей сифилитической инфекции, таких пациентов следует вести по схеме лечения поздних скрытых форм сифилиса. Если же результат второго трепонемного теста отрицательный, то при низких эпидемиологических и социальных рисках у конкретного пациента результат исследования считается отрицательным, и дальнейших процедур не требуется [191].

Таблица 1 – Интерпретация комбинаций результатов нетрепонемных и трепонемных серологических тестов в отношении сифилиса

<b>Результат нетрепонемного теста</b>	<b>Результат трепонемного теста</b>	<b>Интерпретация</b>
+	+	Сифилис (или другой трепонематоз)
+	–	Ложноположительный случай
–	+	Первичный или скрытый сифилис, с предшествующей терапией или без нее (или другой трепонематоз)
–	–	Нет данных за сифилис, либо начальная стадия сифилитической инфекции

Основной идеей современной диагностики сифилиса независимо от применяемого алгоритма является наличие результатов как трепонемного, так и нетрепонемного теста, которые в итоге приводят к общему заключению о наличии/отсутствии/возможном течении сифилитической инфекции [136].

### **1.4.3 Характеристика нетрепонемных серологических тестов**

**Реакция микропреципитации, РМП (*Reaction of microprecipitation, RMP*).** В качестве материала для исследования используется плазма крови, инактивированная сыворотка или спинномозговая жидкость (ликвор). При добавлении эмульсии антигена (кардиолипин, холестерол, лецитин) к плазме крови, сыворотке или спинномозговой жидкости больного сифилисом происходит агглютинация и преципитация комплекса антиген-антитело в виде белых хлопьев. Количественный *RMP*-тест применяется для оценки динамики течения заболевания и оценки эффективности лечения [11].

**Тест быстрых плазменных реагинов (*Rapid Plasma Reagin Test, RPR*).** В данном тесте к сыворотке или плазме крови больного добавляют суспензию стабилизированного антигена кардиолипин-холестерол-лецитин на мелких частицах угля, которые агрегируют при формировании комплексов антиген-антитело [11].

**Тест исследовательской лаборатории венерических заболеваний (*Venereal Diseases Research Laboratory, VDRL*).** В данном методе используют кардиолипиновый антиген и инактивированную сыворотку, которые смешивают на предметном стекле, и формирование комплексов антиген-антитело оценивают под микроскопом. Недостатком теста *VDRL* является необходимость готовить суспензию антигена ежедневно [11].

**Тест на реагины с непрогретой сывороткой (*Unheated serum reagin, USR*).** В тесте *USR* используется антиген, стабилизированный за счет добавления хлорида холина и ЭДТА, и непрогретая сыворотка, и далее формирование комплексов антиген-антитело оценивают под микроскопом [11, 92].

**Тест с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой (*Toluidine red unheated serum test, TRUST*).** Вариант теста быстрых плазменных реагинов, в котором используется непрогретая сыворотка, а вместо частиц угля применяется толуидиновый красный [11, 136].

Диагностические характеристики нетрепонемных тестов в значительной степени зависят от типа теста и формы сифилиса [91, 92, 136, 146]. Чувствительность и специфичность некоторых нетрепонемных тестов (*RMP, RPR, VDRL, TRUST*) приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Средние значения чувствительности и специфичности нетрепонемных тестов на сифилис [11]

Название теста	Формы сифилиса, чувствительность (%)				Специфичность (%)
	Первичный	Вторичный	Ранний скрытый	Поздний скрытый	
<i>RMP</i>	81,0	91,0	94,0	70,0	98,0
<i>RPR</i>	86,0	100,0	98,0	73,0	98,0
<i>VDRL</i>	78,0	100,0	95,0	71,0	98,0
<i>TRUST</i>	85,0	100,0	98,0	-	99,0

Как видно из таблицы 2, тесты *VDRL*, *RPR* и *RMP* имеют относительно низкую чувствительность при первичном сифилисе (78,0 %, 86,0 % и 81,0 % соответственно) и поздней скрытой форме заболевания (71,0 %, 73, % и 70,0 % соответственно). Диагностическую ценность нетрепонемных тестов снижает тот факт, что антилипидные антитела могут вырабатываться при других трепонематозах и нетрепонемных болезнях, сопровождающихся повреждением тканей и высвобождением липидных частиц из разрушенных клеток [92]. Вирусные инфекции, беременность, аутоиммунные и онкологические заболевания, пожилой возраст могут также стать причиной ложноположительных реакций при выполнении нетрепонемных тестов [146]. С этим связано ограниченное применение нетрепонемных тестов в популяциях с низким уровнем заболеваемости [11]. Ложноотрицательные результаты встречаются примерно в 2 % случаев, наиболее часто в результате феномена прозоны, который связан с диспропорциональным соотношением антител и антигена [136].

#### 1.4.4 Характеристика трепонемных серологических тестов

**Реакция иммунофлуоресценции с абсорбцией, РИФ<sub>абс</sub> (*Fluorescent treponemal antibody absorption, FTA<sub>abs</sub>*).** В 1957г. Deacon W.E. с соавт. предложили реакцию иммунофлуоресценции с трепонемными антителами (РИФ) [52], которая легла в основу «золотого стандарта» диагностики сифилиса в форме реакции иммунофлуоресценции с абсорбцией (РИФ<sub>абс</sub>), разработанной в 1964 г. [79]. В данной серологической реакции в образцах сыворотки крови трепонема-специфические антитела выявляются путем их абсорбции на суспензии бледных трепонем с окраской вторичными антителами против IgG и IgM человека. Часто применяется модификация РИФ<sub>абс</sub> с двойным окрашиванием



с контрастированием. РИФ–тесты считаются относительно дорогими, трудоёмкими, поэтому не используются для ежедневного скрининга. Кроме того, для проведения теста РИФ<sub>abc</sub> необходим доступ к живым трепонемам или суспензиям возбудителя сифилиса [11]. РИФ<sub>abc</sub> и его вариант РИФ<sub>abc</sub> с двойным окрашиванием имеют относительно низкую чувствительность при первичном сифилисе по сравнению с поздним и скрытым сифилисом [136].

**Реакция иммобилизации бледных трепонем РИБТ (*Treponema pallidum immobilization, TPI*).** РИБТ был описан впервые в 1949 году исследователями Robert A. Nelson и Manfred M. Mayer, и чуть позже как диагностический тест в 1956 году исследователями Hans Aage Nielsen и Alice Reyn [115]. В качестве антигена используется суспензия живых вирулентных трепонем, полученных из яичек кролика через 7–9 дней после интратестикулярного заражения [177]. В основе метода лежит иммобилизация подвижных трепонем комплексами антиген-антитело при добавлении сыворотки больного. Этот тест используется преимущественно при диагностике скрытых форм сифилиса, сифилиса внутренних органов, нейросифилиса, так как антитела-иммобилизины появляются относительно поздно [11].

**Реакция пассивной гемагглютинации, РПГА (*Treponema pallidum haemagglutination, TPHA*).** Серологические тесты, в основе которых лежит реакция гемагглютинации, были впервые предложены в 1965 г. [135]. Данный метод основан на агглютинации эритроцитов баранов, сенсibilизированных антигеном *T. pallidum*, при их взаимодействии с трепонема-специфическими антителами в сыворотке больных [95]. РПГА имеет определённые преимущества по сравнению с другими трепонемными тестами (такими, как, например, РИБТ, РИФ<sub>abc</sub>): применение стандартизированных реагентов, отсутствие необходимости работы с патогенными штаммами *T. pallidum*, возможность автоматизации метода [11]. Одним из вариантов РПГА является *TPPA (Treponema pallidum particle agglutination)* с использованием полимерных искусственных частиц – желатина, латекса, полиакриламида, бентонита, которые, в отличие от эритроцитов, не имеют собственных антигенов, обуславливающих биологическую активность [59].

Также в практике применяется реакция микроагглютинации, РМГА (*microhemagglutination assay, МНА-ТР*), наиболее часто – в автоматизированном варианте. В реакции РМГА вместо эритроцитов используются окрашенные желатиновые частицы, в связи с чем устраняются неспецифические реакции с образцами плазмы крови

[91]. Ложноположительные результаты тестов геммаглютинации возможны у пациентов с заболеваниями соединительных тканей, лепрой [136].

**Иммуноферментный анализ, ИФА (*Enzyme immunoassay, EIA*).** В основе иммуноферментных тестов лежит непрямой метод Кунса [91]. Специфические антигены *T. pallidum*, сорбированные в лунках плоскодонных планшетов, используются для определения трепонема-специфических антител в сыворотке крови больного. В ранних работах по использованию ИФА для диагностики сифилиса в качестве антигена применяли обработанный ультразвуком препарат вирулентных штаммов *T. pallidum* [93, 92]. В настоящее время в ИФА используются в основном рекомбинантные антигены *T. pallidum*. ИФА позволяет выявить антитела всех классов и подходит для одновременного исследования большого числа образцов [42]. По чувствительности и специфичности ИФА сравним с иммунофлуоресцентными тестами [93]. По данным исследований Castro R. с соавт. чувствительность и специфичность метода достигает 100% в зависимости от используемого набора антигенов [42].

**Иммуноблоттинг (*Western blot, WB*).** Метод иммуноблоттинга основан на связывании трепонема-специфических антител в сыворотке крови больных с антигенами бледной трепонемы на микроцеллюлозной подложке и позволяет охарактеризовать иммунный ответ на инфекцию путём визуализации характерного набора полос [18, 136]. Применение рекомбинантных антигенов TrN47, TrpA, TrN37, TrN17, TrN15 в данной методике показало высокую общую чувствительность и специфичность метода – 98,8 % и 97,1 % [94].

**Экспресс-тесты на сифилис (*Point of care tests, POCs*).** Не так давно произошло внедрение в клиническую практику экспресс-тестов на сифилис. В качестве материала для исследования в данных тестах используется капиллярная кровь [136]. Разработанные коммерческие наборы основаны, преимущественно, на методе ИФА. *POCs* тесты просты и удобны в использовании, позволяют получить надёжный результат в течение 5 мин. Данный метод диагностики имеет значение преимущественно для развивающихся стран, так как позволяет быстро и относительно недорого обследовать большое число пациентов [11]. В исследовании Herring A.J. с соавт. чувствительность и специфичность *POCs* тестов составила 84,5–97,7 % и 92,8–98 % соответственно [72]. Среди тестов, использующих рекомбинантные антигены (TrN15, TrN17, TrN47), следует выделить *Syph-*

*ilis fast (Diesse)*, который показал чувствительность и специфичность 95,6 % и 99,9 % соответственно [168].

**Метод проточного иммунофлуоресцентного анализа (*Multiplex flow immunoassay, MFI*).** Это современный автоматизированный метод комплексного обследования пациентов, позволяющий выявить наличие широкого спектра маркёров различных заболеваний в одном биологическом образце. Тест-системы для диагностики сифилиса (BioPlex 2200 Syphilis IgG, BioPlex 2200 Syphilis IgM), в основе которых лежит анализ антител в сыворотке крови больных сифилисом путем их связывания с антигенами на магнитных сферах и вторичными антителами с флуоресцентным красителем в качестве маркера образования комплексов антиген-антитело. Метод *MFI* обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет за короткий срок исследовать большое число образцов [64, 106].

**Метод иммунохемилюминесценции, ИХЛ (*Chemiluminescence immunoassay, CLIA/CIA*).** В основе данного метода лежит взаимодействие между хемилюминесцентным субстратом и ферментом, связанным с комплексом антиген-антитело. В ходе данной реакции выделяется значительное количество энергии. По данным многих исследователей, тест-системы для диагностики сифилиса, в основе которых лежит метод ИХЛ, обладают высокой чувствительностью и специфичностью, соответственно: *LIAISON Treponema Screen* – 99,2 %, 99,9 %; *Immulite Syphilis screen assay* – 98 %, 98,9 %; *Boson CIA* – 99,38 %, 99,65 % [105, 142, 130].

Трепонемные тесты в настоящее время являются основой серодиагностики сифилитической инфекции благодаря своему главному преимуществу, а именно – специфичности детектируемых агентов, т.е. антител непосредственно к белкам бледной трепонемы. В связи с невозможностью культивирования *T. pallidum* в условиях *in vitro*, наиболее перспективным и доступным источником антигенов для проведения трепонема-специфических тестов являются рекомбинантные белки [76]. В частности, широкое применение в составе современных тест-систем получили рекомбинантные белки (липопротеины) Tr15, Tr17, Tr47 и TmpA, совместное использование которых в проводимых исследованиях обеспечивает чувствительность 93,8–96,9 % и специфичность 94,7–99,0 % [26]. Чувствительность и специфичность некоторых трепонемных тестов приведена в таблице 3.

Таблица 3 – Чувствительность и специфичность трепонемных тестов [136, 11, 154, 26]

Название теста	Формы сифилиса, чувствительность (%)				Специфичность (%)
	Первичный	Вторичный	Ранний скрытый	Поздний скрытый	
РИФ <sub>abc</sub>	84,0	100,0	100,0	96,0	97,0
РИФ <sub>abc</sub> (II)*	80,0	100,0	100,0	–	98,0
РПГА	88,0	100,0	100,0	–	96,0
РМГА	76,0	100,0	97,0	97,0	99,0
ИФА (IgG)	98,9	100,0	90,5	–	100,0
<i>MFI</i> (IgG)					98,5
<i>WB</i> (IgG)					98,5

Примечание – \* РИФ<sub>abc</sub> с двойным окрашиванием

По данным Sambri V. с соавт. общая чувствительность и специфичность ИФА (анти-IgG) с антигенами Tr47, Tr17 и Tr15 составила 98,9 % и 98,3 % соответственно, однако эти показатели варьируются для разных стадий заболевания [141]. В исследовании Sun с соавт. чувствительность ИФА с рекомбинантными белками Tr15, Tr17, Tr47 на стадии первичного, вторичного и раннего скрытого сифилиса составила 99,8 %, 100 % и 90,5 % соответственно, при общей чувствительности ИФА 99,5 %. Кроме этого, в группе здоровых индивидов ложноположительные результаты отсутствовали, что обусловило 100 % специфичность метода [154].

Из опубликованных в литературе значений диагностических характеристик трепонемных тестов можно увидеть, что данные существенно отличаются при разных формах заболевания, снижаясь в случае раннего сифилиса, а также в случае его скрытых форм [146]. Кроме этого, применение трепонемных тестов может сопровождаться ложноположительными реакциями, которые часто связаны с наличием системной красной волчанки, коллагенозов, встречаются у людей пожилого возраста [88]. Также наблюдаются перекрёстные реакции с другими трепонематозами [78, 104]. Эти факты определяют необходимость совершенствования серологических трепонемных методов диагностики данного заболевания.

#### **1.4.5 Новые методики трепонемных серологических тестов – белковые микрочипы (иммуночипы)**

Разработка новых подходов к проведению серологических исследований для диагностических задач, в частности, разработка белковых микрочипов, в последние годы

стала особо популярна благодаря огромному потенциалу данной методики для *in vitro* диагностики [77]. Технология, созданная изначально для исследования молекул ДНК, была успешно адаптирована под задачи, включающие в себя анализ белковых молекул [21].

Иммуночипы представляют собой вариант белковых микрочипов, которые позволяют проводить исследование в миниатюрном формате и детектировать параллельно множество аналитов с применением взаимодействий антиген-антитело. Различные белковые зонды в зависимости от целевых аналитов иммобилизуют в микрокаплях на активированной поверхности предметного стекла с частотой от нескольких десятков до нескольких тысяч на  $\text{см}^2$  [69]. Белки пришивают к стеклянной поверхности иммуночипа посредством неспецифических взаимодействий или же ковалентных связей, на плоской поверхности или же в трехмерных полусферах, однако важной целью создания микрочипов остается достижение максимальной связывающей способности молекул-зондов. При этом важно блокировать поверхность вне точек нанесения зондов для предотвращения неспецифического связывания компонентов анализируемого образца с активированной поверхностью чипа. Таким образом достигается максимальное отношение получаемого в ячейке сигнала к общему фону и повышается чувствительность метода. Визуализацию связавшихся аналитов проводят преимущественно с применением вторичных антител, конъюгированных с флуорофорами. Важным отличием белковых чипов от их аналогов с применением нуклеиновых кислот состоит в необходимости сохранять функциональность белковых зондов в процессе хранения и транспортировки, то есть при температуре  $+4^\circ\text{C}$ .

Одним из главных преимуществ данного метода стал малый объем зондов, необходимый для печати иммуночипов и вместе с этим небольшой объем необходимого анализируемого биологического материала [148]. Кроме этого применение иммуночипов позволяет делать несколько повторов каждого зонда в рамках одного печатного поля (эррея) и характеризовать все аналиты в одном объеме исследуемого образца, тогда как в других методиках необходимо ставить отдельную реакцию для повтора исследования каждого аналита. Таким образом значительно сокращается количество манипуляций в ходе проведения исследования, снижается влияние человеческого фактора и ошибок пипетирования, что значительно повышает достоверность результатов исследования. Благодаря современным роботизированным станциям и флуоресцентным сканерам ста-

ла возможна автоматизация и увеличение пропускной способности данной методики, что позволит ей войти в клиническую лабораторную диагностику [69].

В настоящее время описано несколько иммуночипов для серологической диагностики сифилиса. В одной из ранних публикаций описан белковый чип для детектирования иммуноглобулинов класса IgG к рекомбинантному белку Trp47 *T. pallidum* [163]. Методика включала в себя иммобилизацию рекомбинантного белка Trp47 на стеклах с альдегидным покрытием, после чего проводилась количественная и полуколичественная обработка полученных результатов. Визуализацию связавшихся антител к Trp47 из сыворотки крови больных сифилисом проводили в формате «сэндвич» с использованием коллоидного раствора наночастиц золота, модифицированных протеином А стафилококков с дальнейшим окрашиванием серебром. Авторы не приводят значений диагностических параметров для данной методики, но отмечают, что используемая в данном эксперименте методика детектирования комплексов антиген-антитело является высокочувствительной, при этом применение белка Trp47 и наночастиц коллоидного золота увеличивают специфичность анализа. Также метод позволяет полуколичественную оценку и является достаточно быстрым для исполнения. Однако проведение анализа и подготовка реагентов достаточно трудоемка и требует высокочатратных реагентов.

Еще одной разработкой в данной области стала тест-система на основе иммуночипа для серодиагностики сифилиса, которая включала в себя иммобилизованные на активированных слайдах в виде индивидуальных спотов (точек) антигены Trp15, Trp17, TmpA и Trp47 *T. pallidum*, конъюгат и реагенты, необходимые для выявления взаимодействий антигена с соответствующими антителами [12]. Исследование представляло собой непрямой иммунофлуоресцентный анализ с детекцией IgG человека к антигенам на иммуночипе, которые визуализировали вторичными антителами с флуоресцентной меткой. Чувствительность и специфичность данного метода оценивали на образцах сыворотки крови больных сифилисом (n=200) и контрольной группы (n=200, 50 образцов больных Лайм-боррелиозом, 50 образцов больных лептоспирозом, 100 образцов сыворотки крови здоровых лиц). Специфичность выявлена на уровне 100%, тогда как 5 из 200 положительных образцов сыворотки были интерпретированы как неопределенные, так как в иммуночипе регистрировали позитивные значения только по антигену Trp17, остальные 195 образцов сыворотки крови оказались серореактивными по двум и более антигенам *T.pallidum*. Авторы замечают, что полученные диагностические характеристики метода

сопоставимы с результатами в иммуноблоттинге и с тест-системами на основе ИФА. Наиболее вероятной причиной недостижения высокой чувствительности при использовании описанного иммуночипа является ограниченное количество иммобилизованных на нем видоспецифичных антигенов *T. pallidum*.

Одной из последних разработок можно считать биочип для иммунологических исследований антител IgG и IgM в сыворотке крови больных сифилисом [77]. На поверхности чипа в монослое был иммобилизован химерный рекомбинантный белок TrN15-17-N47, который далее тестировали на 286 образцах сыворотки крови больных сифилисом и 270 образцах сыворотки здоровых индивидов. Чувствительность данного теста составила 99,0%, что превышало соответствующие значения для РПГА (97,9%) и теста с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой TRUST (76,2%). Специфичность метода составила 100%. Ограничением данного подхода являлась невозможность детекции антител к отдельным антигенам, и, как следствие, отсутствие данных для многомерного количественного анализа результата исследования.

Очевидно, что технология белковых чипов зарекомендовала себя как надежный метод проведения серологических исследований с высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов. Однако во всех вышеуказанных иммуночипах представлены только антигены, используемые и в других трепонемных тестах, описанных выше. На данный момент чувствительность тестов не достигает максимальных значений и не имеет дополнительных аналитических возможностей, таких как дифференциация форм сифилиса. Все вышеперечисленное показывает необходимость поиска новых высокоиммуногенных и специфических антигенов *T. pallidum*, а также отдельного исследования антител к каждому из антигенов.

## **1.5 Перспективы развития диагностики сифилиса – рекомбинантные антигены *T. pallidum***

### ***1.5.1 Геном и протеом T. pallidum***

В 1998 году группой американских исследователей [62] был расшифрован геном *T. pallidum*, который представляет собой кольцевую молекулу ДНК размером 1138012 пар оснований (~1,14 млн. пар оснований). Данные параметры значительно меньше генома других грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: к примеру,

геном *E.coli* содержит 4,6 млн пар оснований (п.о.), а геном *B. subtilis* - 4,2 млн п.о. Как высокоспециализированный патоген, *T. pallidum* не имеет в своем геноме генов, отвечающих за синтез ферментов, расщепляющих жирные кислоты, а использует сахара, содержащиеся в жидких средах организма хозяина [143]. Геном *T. pallidum* насчитывает 1090 генов, из них 1039 кодируют белки, открытые рамки их считывания составляют 92,9 % генома. Молекулярная масса белков *T. pallidum* варьируется в диапазоне от 3,2 до 172,8 кДа, средний показатель составляет 37,7 кДа [120].

Для обозначения отдельных белков *T. pallidum* была предложена специальная номенклатура, в соответствие с которой формат обозначения включает префикс TrN (для референсного штамма *T. pallidum Nichols*), величину молекулярной массы в килодальтонах и, в случае необходимости, дополнительный буквенный постфикс для различных полипептидов с одинаковой молекулярной массой (например: TrN47, TrN15) [119, 179]. Для практических целей белки микроорганизма могут обозначаться по локализации в структуре клетки: флагеллярные белки (например: FlaA), белки наружной или цитоплазматической мембраны (TROMP) или по их функциональной принадлежности: пенициллин-связывающие белки (например: Pbp-1), экстрацеллюлярные белки. Для проведения генетических исследований существует классификация белков *T. pallidum*, исходя из номера открытой рамки считывания (последовательности нуклеотидов в составе ДНК или РНК, потенциально способная кодировать белок) с префиксом Tr (например: Tr0136). Таким образом, некоторые белки могут одновременно иметь несколько обозначений (например: TrmA, TrN41-42 или Tr0768).

Протеом *T. pallidum* представляет собой ценный материал для современной протеомики, в частности для изучения белков, которые могут быть экспрессированы микроорганизмом в различные фазы течения инфекции, предсказанием функциональной роли отдельных белков путем экспериментального сопоставления их качественного и количественного составов, а также установлением взаимосвязи между структурой белка и его функциями [50, 49, 63]. Анализ экспрессированного *in silico* генома *T. pallidum* показал, что протеом микроорганизма представлен в основном положительно заряженными белками, для которых среднее значение изоэлектрической точки (pI) составляет 8,1; при этом 66 % белков обладают  $pI > 7,0$  [112]. Установлено, что преобладание положительно заряженных белков характерно для протеомов паразитических микроорганизмов, и это свойство облегчает взаимодействие микроорганизма с организмом хозяина [86].



На основании исследования сходства аминокислотных последовательностей в белках разных микроорганизмов для 55 % открытых рамок считывания (ОРС) в структуре генома *T. pallidum* была предсказана биологическая функция кодируемых ими белков: для 17 % установлена аналогия с белками с гипотетическими или с неизвестными функциями, а в 28 % случаев наблюдаемые последовательности не обладали значимым сходством с белками других микроорганизмов [120]. Следует отметить, что за исключением белка Trp0326/Trp92 [49, 40], в геноме бледной трепонемы не обнаружены аналоги известных белков внешней мембраны других грамотрицательных микроорганизмов [62].

Несмотря на отсутствие у *T. pallidum* некоторых факторов патогенности, характерных для других бактерий (ЛПС, экзотоксины), в геноме *T. pallidum* найдены гены (*tp0027*, *tp0028*, *tp0649*, *tp0936*, *tp1037*), кодирующих белки, сходные по свойствам с бактериальными гемолизинами *Bacillus cereus* и *Serpulina hyodsentariae* [19, 157, 165].

Существует разнородная группа генов, отвечающих за взаимодействие *T. pallidum* с организмом хозяина. Например, ген *gcp* кодирует металлопротеиназу, специфически расщеляющую O-сиалогликопротеины [165]. Кроме того, обнаружены гены *ankA* и *ankB*, последовательность которых сходна с таковой у белка млекопитающих *ankyrin3*, взаимодействующего с компонентами цитоскелета [53]. К белкам, играющим важную роль в выживании *T. pallidum* в организме хозяина, относятся локализованные на поверхности транспортные системы, например фосфодиестеразы [153].

### **1.5.2 Современное применение рекомбинантных антигенов *T. pallidum***

Как было отмечено ранее, получение образцов клеток *T. pallidum* осложнено тем, что бледная трепонема практически не культивируется на искусственных питательных средах, при выращивании *in vitro* теряет свойство патогенности и некоторые исходные специфические антигенные характеристики [120]. Вместе с этим длительное время были ограничены сведения о белках *T. pallidum* не только вследствие невозможности культивирования возбудителя *in vitro*, но также и в связи с трудностями проведения непосредственных генетических манипуляций, что не позволяло осуществить прямой анализ функций продуктов индивидуальных генов.

Развитие методов молекулярной биологии в конце XX века, в том числе разработка технологии получения рекомбинантных белков, а также методов функциональной ге-

номики и протеомики открыло широкие перспективы в изучении функций белкового комплекса возбудителя и дало основу для широкомасштабного поиска новых потенциальных антигенов для диагностики сифилитической инфекции [110, 109, 3]. Технология получения рекомбинантных белков *T. pallidum* в гетерологических системах предусматривает внедрение генов, отвечающих за синтез определенного белка *T. pallidum*, в клетку другого хорошо культивируемого в искусственных питательных средах микроорганизма (например: кишечной палочки *E. coli* или дрожжевой клетки *Saccharomyces cerevisiae*), последующее выращивание полученного модифицированного микроорганизма, его дезинтеграцию, выделение и очистку рекомбинантного антигена [151, 162]. Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в гомогенном состоянии любой индивидуальный антиген [108, 183].

В настоящее время в качестве специфических антигенов в составе диагностических тест-систем используются рекомбинантные аналоги белков Tr15 (Tr0171), Tr17 (Tr0435), Tr47 (Tr0574) и TmpA (Tr44,5, Tr0768) [150]. Предполагается, что способность *T. pallidum* вызывать воспалительные явления в организме связана с наличием белков Tr47, Tr17, Tr15 [146].

**Tr15 (Tr0171).** Антиген Tr15 с молекулярной массой 15кД, впервые описанный исследовательской группой Lukehart с соавт. [101] и чуть позднее Hensel с соавт. [71], по своей структуре является липопротеином [44], локализованным на цитоплазматической мембране *T. pallidum* [131]. Клонирование и экспрессия в *E. coli*, и получение рекомбинантного белка Tr15 были выполнены в 1989 г. Purcell с соавт. [129]. Результаты исследования функций данного белка предполагают, что антиген Tr15 активизирует клеточное звено иммунитета, стимулируя пролиферацию Т-лимфоцитов [20]. Sun с соавт. показали, что чувствительность ИФА с рекомбинантным белком Tr15 составила 83,5 % для первичного сифилиса, 66,7 % для раннего скрытого сифилиса, 84,2 % для вторичного сифилиса при общей чувствительности метода 83,1 %. При этом в контрольной группе все результаты исследований были отрицательными [154].

**Tr17 (Tr0435).** Белок Tr17 с молекулярной массой 17 кД также является липопротеидом, кристаллическая структура которого представлена 8 скрученными  $\beta$ -складками с небольшим углублением на одном конце и  $\alpha$ -спиралью на другом конце молекулы. Очищенный Tr17 является мономером, однако способен существовать в виде димера, стабилизируемого дисульфидными мостиками. Димерная структура молекулы

обеспечивает белку лиганд-связывающую способность [33, 32]. Trp17 индуцирует пролиферацию спленоцитов у заражённых кроликов [20], стимулирует выработку TNF- $\alpha$  макрофагами [132, 14] и участвует в активации экспрессии генов молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, E-селектина и белка-хемоаттрактанта моноцитов MCP-1 в эндотелиальных клетках [171]. По данным Sun A.H. с соавт. показатели чувствительности ИФА с антигеном Trp17 для первичного, раннего скрытого и вторичного сифилиса составили 83,7 %, 71,4 %, 86,2 % соответственно при общей чувствительности 84,4 %. При этом все сыворотки здоровых индивидов были ареактивны [154].

**Trp47 (Trp0574).** Trp47 – высокоиммуногенный мембранный липопротеин с молекулярной массой 47 кД, участвующий в активации клеток эндотелия [139]. Клонирование и экспрессия белка Trp47 были впервые описаны Norgard с соавт. [117]. По данным Brinkman с соавт. и McGill с соавт. белок Trp47 является карбоксипептидазой, обладает пенициллин-связывающей способностью, а также стимулирует продукцию клетками эндотелия молекул ICAM-1 и VCAM-1. Серореактивность белка была описана при всех формах сифилиса [36, 108]. Белок Trp47 обнаружен и у других подвидов *T. pallidum* (*ssp. endemicum*, *ssp. pertenue*), однако отсутствует у сапрофитирующих форм [116]. Белок состоит из четырёх отдельных доменов: двух N-концевых доменов с  $\beta$ -складчатой структурой и двух C-концевых доменов. Trp47 содержит три пенициллин-связывающих последовательности (*SVTK*, *TEN* и *KTG*), однако они не образуют типичного для всех пенициллин-связывающих белков активного сайта. Это позволяет предположить, что Trp47 представляет собой новый тип пенициллин-связывающих белков [54]. Известно, что Trp47 инициирует гуморальный иммунный ответ примерно на 3–6 день после заражения [66]. При отсутствии лечения антитела против белка Trp47 выявляются на всех стадиях сифилиса [51]. IgM антитела против Trp47 были обнаружены у пациентов с врождённым сифилисом с помощью метода иммуноблоттинга [96]. В исследовании Sun A.H. с соавт. было показано, что уровень анти-Trp47 IgG антител зависел от длительности заболевания: прогрессивно увеличиваясь по мере развития инфекции и значительно снижался после лечения [155]. Чувствительность ИФА с рекомбинантным белком Trp47 составила 82,7 % для первичного сифилиса, 83,1 % для вторичного сифилиса и 64,3 % для раннего скрытого, при общей чувствительности 82,1 %. При этом в контрольной группе ложноположительные результаты отсутствовали [154].

**ТmрА (Тр44,5; Тр0768).** ТmрА – мембранный липопротеин *T. pallidum* [119], впервые клонирован и применён для серодиагностики сифилиса в 1989 году [145]. Гомологи данного белка обнаруживаются и у других трепонем, например, *T. phagenesis* [167]. В исследовании Ijsselmuiden с соавт., чувствительность ИФА (IgG) с антигеном ТmрА составила 76,0 % для первичного сифилиса, 100,0 % для вторичного, 98,0 % для раннего скрытого сифилиса, специфичность составила 99,6 % [80].

Диагностические тест-системы, в состав которых входят рекомбинантные антигены Тр15, Тр17, Тр47, ТmрА *T. pallidum*, как правило, имеют высокую чувствительность и специфичность, однако эти показатели варьируются в зависимости от используемого производителем состава рекомбинантных белков [80, 141, 154]. Кроме того, большое значение для серологической диагностики имеет форма заболевания, так как уровень экспрессии соответствующих антигенов *T. pallidum* и их доступность для иммунной системы макроорганизма существенно отличается при разных клинических формах сифилиса [41]. В связи с вышесказанным постоянно регистрируются случаи получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов тестов на сифилис при использовании лабораториями стандартных коммерческих наборов с рекомбинантными белками [76]. Серологические тесты с рекомбинантными белками Тр47, Тр15, Тр17, ТmрА демонстрируют относительно низкую чувствительность для скрытых форм сифилиса (64,3 % – 98 %), что затрудняет своевременное выявление и лечение заболевания у данной категории больных [80, 141, 154].

Используемые в настоящее время в лабораторных тестах антигены не имеют 100 % чувствительности и специфичности для всех форм сифилиса, а также не позволяют дифференцировать различные формы сифилиса, что важно для определения назначаемой схемы лечения. Накопленные экспериментальные данные [36, 108] указывают на различный уровень экспрессии определенных антигенов *T. pallidum* и их различную доступность для иммунной системы больного на отдельных стадиях заболевания. Исходя из этого можно предположить, что серологическая диагностика сифилиса может быть усовершенствована путем расширения набора диагностических антигенов с последующим выявлением антител определенной специфичности, характерных для разных форм данного заболевания и позволяющих с высокой достоверностью устанавливать диагноз сифилиса при разных, в том числе ранних, формах инфекции.

### 1.5.3 Изучение протеома *T. pallidum* и поиск новых иммуногенных белков

Одним из наиболее значимых направлений совершенствования серодиагностики сифилиса является изучение белков протеома *T. pallidum* и расширение спектра применяемых антигенов с выраженной иммуногенностью и специфичностью для разработки высокоэффективных методов диагностики различных форм сифилитической инфекции.

Разработка технологии получения рекомбинантных белков, а также методов функциональной геномики и протеомики, открыли широкие перспективы в изучении функций протеома возбудителя сифилиса и заложили основу для широкого поиска новых потенциальных антигенов для диагностики сифилитической инфекции [22, 24]. После расшифровки генома *T. pallidum* появилась серия работ по изучению протеома возбудителя сифилиса с целью выявления новых белков, представляющих интерес для создания диагностикумов или вакцин на их основе [165, 65, 120, 99]. В структуре клетки *T. pallidum* обнаружено более сотни различных веществ, обладающих антигенными свойствами, при этом значительная их часть по своему составу гомологична антигенам непатогенных трепонем, боррелий, лептоспир и других микроорганизмов, антитела к которым могут присутствовать в организме человека. Однако для лабораторной диагностики сифилиса необходимы антигены, видоспецифичные для *T. pallidum* [120, 3].

Поиск новых антигенов *T. pallidum* в настоящее время ведется методами протеомики и функциональной геномики. Данные методы включают серологический скрининг нативных белков *T. pallidum*, разделенных с помощью двумерного гель-электрофореза [108], серологический скрининг рекомбинантных экспрессионных библиотек *T. pallidum* [109, 110, 36], изучение набора белков, полученных из отдельных частей клетки возбудителя, например редкие белки наружной мембраны (*Treponema rare outer membrane proteins, TROMPs*) [160], изучение профиля экспрессии мРНК *T. pallidum* в процессе развития инфекции [149], исследование взаимодействий белков возбудителя с помощью дрожжевой двугибридной системы [159]. Преимущества применения методов протеомики и функциональной геномики в поиске новых антигенов состоит в том, что одновременно определяется широкий набор иммуногенных белков, экспрессируемых на различных стадиях заболевания [45, 40, 181, 39].

Данные генома *T. pallidum* позволили исследователям провести широкомасштабное клонирование белков, в том числе ранее неизвестных. В своих экспериментах

McKevitt M. с соавт. создали экспрессионную библиотеку, содержащую 991 рекомбинантный белок, предсказанный по ОРС последовательности геномной ДНК *T. pallidum*. Авторами также было проведено скрининговое исследование антигенных свойств полученных рекомбинантных белков на образцах сыворотки инфицированных лабораторных животных, и из 85 экспрессированных антигенов для 12 из них наблюдалась серореактивность сыворотки крови зараженных сифилисом кроликов, при этом 5 из них были впервые описаны в качестве антигенов [110].

Для определения белков *T. pallidum*, в отношении которых у зараженных лиц выявляется иммунный ответ, Brinkman M.V. с соавт. провели серологический скрининг рекомбинантных экспрессионных библиотек *T. pallidum* с использованием образцов сыворотки крови больных сифилисом [36]. Изучение обширного набора рекомбинантных белков *T. pallidum* проводили в 2 этапа. На первом этапе для определения иммунологически активных белков был проведен скрининг 908 рекомбинантных белков *T. pallidum* в отношении образцов сыворотки крови, полученных у больных с ранним скрытым сифилисом. При этом было выявлено 34 белка, проявляющих выраженную иммунологическую активность. Для этих белков ранее уже была показана реактивность в отношении сыворотки крови зараженных сифилисом кроликов [36]. На втором этапе работы Brinkman M.V. с соавт. изучали иммунологические свойства белков возбудителя сифилиса при разных формах сифилитической инфекции: первичной, вторичной и скрытой ранней. Для этого авторами были отобраны 90 белков *T. pallidum* с ранее описанной реактивностью в отношении образцов сыворотки крови экспериментальных лабораторных животных и проведено исследование активности отдельных антигенов в отношении образцов сыворотки больных хемилюминесцентным методом. При дифференцированном исследовании было выявлено 38 белков, проявляющих антигенные свойства при разных (одной или нескольких) формах течения сифилиса, в том числе 14 из них проявляли активность с образцами крови, полученными от больных при всех изученных формах заболевания [36]. Совокупность белков возбудителя сифилиса, проявляющих иммуногенные свойства, была названа иммунопротеом *T. pallidum* [159].

Метод серологического скрининга рекомбинантных экспрессионных библиотек позволяет также оценить иммунореактивность минорных белков *T. pallidum*, так как с помощью экспрессии в клетках *E.coli* можно получить достаточные количества этих белков [108]. С другой стороны, неэффективная экспрессия и/или фолдинг рекомби-

нантных белков *T. pallidum* в клетках *E. coli* могут приводить к ложноотрицательным результатам исследования. Для верификации данных об протеоме *T. pallidum* McGill M.A. с соавт. провели изучение белков бледной трепонемы на основе двумерного электрофореза и масс-спектрометрии [108]. Клетки *T. pallidum* были выделены из ткани яичек зараженных кроликов, лизаты клеток возбудителя разделены с помощью двумерного электрофореза и обнаруженные полипептиды *T. pallidum* идентифицированы методом масс-спектрометрии с матрично-активированной десорбцией/ионизацией (*Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry, MALDI-TOF*). Для анализа иммуногенности обнаруженных белков был проведен иммуноблоттинг с образцами сыворотки крови зараженных кроликов и больных различными формами сифилиса [108]. Для этого белки лизированных клеток *T. pallidum* разделяли методом двумерного электрофореза, переносили на мембрану и инкубировали с образцами сыворотки крови. Образование иммунных комплексов выявляли с помощью моноклональных антител против IgG, конъюгированных со щелочной фосфатазой. Всего было изучено 148 белковых точек, относящихся к 88 полипептидам *T. pallidum*, 63 из которых ранее не были описаны. Среди иммуногенных полипептидов были выявлены 29 уже известных и целый ряд новых, не описанных ранее белков. Для 5 белков (бактериоферритин TrF1, мембранный белок Tr0453, гипотетический мембранный белок Tr0965, гипотетические белки Tr0584 и Tr0608) была показана иммуногенность как в отношении сыворотки зараженных кроликов, так и сыворотки больных первичным сифилисом. Указанные белки, выявленные методом двумерного электрофореза и методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, могут представлять интерес для ранней диагностики сифилитической инфекции [108]. Данные анализа белковых продуктов *T. pallidum* согласовывались с результатами изучения профиля экспрессии мРНК на экспериментальной модели сифилиса [149]. В ходе двумерного гель-электрофореза были выявлены практически все белки, высокая экспрессия мРНК которых была показана в анализе транскриптома *T. pallidum* [108].

#### **1.5.4 Биоинформатический анализ кандидатных антигенов *T. pallidum***

Анализ результатов протеомных скринингов привел к детальному рассмотрению групп белков, проявляющих иммуногенные свойства в течение сифилитической инфек-

ции. В описанных выше исследованиях McGill M. A. с соавт. и Brinkman M. B. с соавт. в сыворотке крови зараженных кроликов и пациентов с сифилитической инфекцией были выявлены антитела только к 34–38 белкам. Кроме этого, не все из них совпадали в двух описанных исследованиях [36, 108].

**Поверхностные белки *T. pallidum*.** Особый интерес для изучения патогенеза и разработки новых методов диагностики сифилиса представляет протеом наружной мембраны *T. pallidum*. Бледная трепонема характеризуется малым количеством интегральных мембранных белков на внешней мембране, и вследствие этого, ограниченным количеством мишеней для иммунной системы организма хозяина [134, 180, 75, 49]. Среди них выделяют группу редких белков наружной мембраны (*TROMPs*), участвующих в пермиабиллизации внешней мембраны, адгезии и антигенной вариабельности *T. pallidum*.

**Мембранные липопротеины *T. pallidum*.** Отдельно стоит выделить группу мембранных липопротеинов, которые чаще других реагировали с образцами сыворотки инфицированных животных или пациентов. Антитела к липопротеинам выявлялись у пациентов при всех формах сифилиса. Несмотря на тот факт, что мембранные липопротеины не экспонированы на поверхности клетки патогена и расположены преимущественно на внутренней мембране и частично в периплазме, они способны вызывать сильный иммунный ответ и поэтому могут рассматриваться как кандидатные антигены для расширения диагностической панели сифилиса [65].

Определение последовательности генома *T. pallidum* дало возможность использовать методы биоинформатики для поиска белков с определенной клеточной локализацией [50, 108, 34]. Для определения локализации белков бледной трепонемы Cox D. L. с соавт. использовали метод перекрестной проверки с помощью нескольких биоинформатических алгоритмов [49]. Авторы использовали различные биоинформатические программы для предсказания структуры белков по последовательности кодирующих их генов. При скрининге потенциальных диагностических антигенов использовалось определение субклеточной локализации с помощью программ предсказания конфигурации белков (*CELLO*, *PSORTb3.0*, *TMBETADISC*, *Position-Specific Scoring Matrix (PSSM)*, *TMBETADISC*, *amino acid composition (AAC)*, *BOMP*, *Hhomp*, *PRED-TMBB*). Проводился поиск образования  $\beta$ -складчатых структур с фильтрацией по происхождению немембранных белков, липопротеинов и белков с предсказанными трансмембранными  $\alpha$ -спиральными участками, отличными от сигнальных, и дополнительный поиск отщеп-



ляемых сигнальных последовательностей с использованием серверов ТМНММ и РНОВИУС. Применение многоуровневой фильтрации полученных результатов позволило составить список потенциальных белков внешней мембраны, причем для части белков уже получено экспериментальное подтверждение их локализации.

В статье Нааке D.A. с соавт. в дополнение к результатам биоинформатического анализа обращается внимание на необходимость экспериментального подтверждения локализации определяемых белков для установления их принадлежности к наружной мембране [65]. При исследовании локализации белков, экспонированных на поверхности возбудителя, основная проблема заключается в трудности их отделения от белков нижних слоев клеточной оболочки – периплазмы и цитоплазматической мембраны.

Для решения задачи разделения белков клеточной оболочки применяют различные молекулярно-биологические и физические методы (методы фазового разделения с помощью детергентов) [48, 49]. В качестве молекулярно-биологических методов применяется клонирование генов, кодирующих белки с сигнальной последовательностью и/или трансмембранным участком с последующей экспрессией этих белков в системе *E.coli* [28, 23]. Однако применение технологии рекомбинантных антигенов дает только косвенные данные о поверхностном расположении белков вследствие отличий в архитектуре клеточной оболочки *E. coli* и *T. pallidum*, и не всегда данные, полученные на модели кишечной палочки, можно переносить на возбудителя сифилиса. Так, например, белки TrpN47 и TrpN38 (Mg1B) исходно были определены как белки наружной мембраны *T. pallidum*, в то время как более поздние исследования показали их локализацию на поверхности цитоплазматической мембраны [90] что было наиболее убедительно подтверждено экспериментальными данными [65].

Некоторые механизмы взаимодействия бледной трепонемы с иммунной системой хозяина свойств позволило уточнить изучение и описание белков наружной мембраны *T. pallidum*. Последняя является очень хрупкой, и для предотвращения ее повреждения при иммунофлуоресцентном окрашивании была разработана техника инкапсулирования, т.е. заключения клеток возбудителя в микрокапсулы из легкоплавкой агарозы [48] и фазового разделения мембран микроорганизма обработкой детергентами. Для контроля целостности внешней мембраны использовали технологию двойного окрашивания антителами против белков филаментов FlaA. Данная техника позволила экспериментально проверить клеточную локализацию некоторых белков *T. pallidum*. Было показано, что

широко используемые в клинической лабораторной диагностике белки *T. pallidum* с молекулярной массой 15, 17 и 47 кДа взаимодействовали с сывороткой иммунизированных кроликов только при обработке клеток *T. pallidum* детергентом, который растворяет внешнюю мембрану клетки. Проведенные исследования позволили экспериментально подтвердить локализацию этих белков на цитоплазматической мембране [48, 49].

### 1.5.5 Белки наружной мембраны *T. pallidum*

Белки наружной мембраны ввиду своей локализации представляют наибольший интерес, так как именно они в первую очередь являются мишенями для иммунной системы организма хозяина [120]. На экспериментальных животных моделях было показано, что выработка антител к белкам наружной мембраны *T. pallidum* играет важную роль в элиминации возбудителя из организма хозяина [49]. Наружная мембрана бледной трепонемы содержит мало белковых молекул, однако именно они являются наиболее доступными мишенями живых клеток *T. pallidum* для иммунной системы в организме хозяина. К белкам наружной мембраны относятся 7 белков семейства *Trp*, 9 гипотетических протеинов и белок Trp0326 (Trp92) [89].

**Белки семейства Trp** объединяют на основании наличия в них характерного повтора, специфического для *T. pallidum*. Семейство насчитывает 12 белков: TrpC, TrpD, TrpI и TrpF относятся к подсемейству I; TrpE, TrpG и TrpJ содержат гомологичные N- и C-концевые регионы и относятся к подсемейству II; TrpA, TrpB, TrpH, TrpK и TrpL относятся к более неоднородному по гомологии подсемейству III [63]. Подсемейство I содержит множественные консервативные регионы; предполагается, что они участвуют в пермеабиллизации мембраны [156]. Белки TrpC/D (Trp0117/0131) и TrpI образуют тримерные комплексы-поры, содержат идентичные участки  $\beta$ -складок, и связываются с пептидогликаном в периплазматическом пространстве N-концевыми доменами [16]. Хорошо изученный белок TrpK (*tp0897*), относящийся к подсемейству III, содержит семь переменных регионов и множество сайтов встраивания, в результате чего имеет мозаичную структуру [43]. Так как указанные переменные регионы распознаются в ходе гуморального иммунного ответа, можно предположить, что новые комбинации данного белка являются путем ухода от узнавания иммунной системой человека [137].

Примечательно, что белки Trg не были отмечены как серореактивные в исследованиях иммунопротеома McGill M. A. с соавт. и Brinkman M. B. с соавт. несмотря на выраженный иммунный ответ против N-концевых доменов подсемейства I и белка TrgK [36, 108]. Возможное объяснение данному феномену – вариабельность структуры, как, например, описанный выше для белка TrgK, который отличается у разных штаммов *T. pallidum*, в результате чего у пациентов обнаруживаются множественные клоны с различными вариантами гена *tprK* [73]. Таким образом, семейство белков Trg предположительно является необходимым для патогенеза и ускользания *T. pallidum* от иммунной системы человека, что делает его перспективным кандидатом для разработки вакцин, но сомнительным в качестве диагностических антигенов.

**Редкие белки наружной мембраны (*Treponema rare outer membrane proteins, TROMPs*).** Кроме семейства Trg к поверхностным белкам *T. pallidum* относится также и группа редких белков наружной мембраны TROMP (TROMP1, TROMP2, TROMP3). Опубликованные данные свидетельствуют о серореактивности белков TROMP против образцов сыворотки зараженных кроликов и больных сифилисом [29], однако в исследовании Brinkman M. B. с соавт. для белка TROMP2 (гомолог FlaA, продукт гена *tp0663*) было показано содержание соответствующих антител только в образцах сыворотки больных первичным сифилисом. В исследовании McGill M.A. с соавт. этот белок был идентифицирован на двумерном фореже, но не был охарактеризован как серореактивный. В недавнем исследовании Xu M. с соавт. показали, что Trp0663 может считаться кандидатным диагностическим антигеном с экспериментально установленной чувствительностью 98,83 % и специфичностью 100 % при всех формах сифилиса [166].

**Trp0326 (Trp92)** описан как поверхностный белок *T. pallidum* в экспериментах Cameron C.E. с соавт. по характеристике белков возбудителя сифилиса, являющихся мишенями для опсоинов (факторов комплемента, усиливающих фагоцитоз) [40]. Trp0326 является ортологом белка BamA ( *$\beta$ -barrel assembly machinery A*) и имеет гомологию с консервативными участками  $\beta$ -складок, которые характерны для семейства белков, участвующих в биогенезе наружной мембраны грам-отрицательных бактерий [58]. С помощью структурного моделирования выявлено, что N-конец Trp0326 имеет 5 доменов, ассоциированных с транспортом полипептидов (*Polypeptide transport-associated domains, POTRA*), в то время как C-конец формирует амфифильный домен из 18  $\beta$ -листов [102]. Близкий по структуре с Trp0326 белок BB0795 *Borrelia burgdorferi* (спиро-

хеты, возбудителя болезни Лайма) описан как необходимый участник сборки белков наружной мембраны [85].

В исследовании Brinkman M. В. с соавт. уровень антител к Tr0326 превышал соответствующие значения в группе здоровых более чем в два раза только в образцах сыворотки больных первичным сифилисом, в остальных группах был ниже указанного показателя [36]. В исследовании McGill M.A. с соавт. белок Tr0326 не был определен на двумерном фореze с последующим иммуноблоттингом, соответственно, не было предоставлено данных о его серореактивности [108]. По данным Smith В. С. с соавт. общая чувствительность и специфичность рекомбинантного белка Tr0326 в ИФА (IgG) составила 86 % и 99 % соответственно. В группах пациентов с первичным, вторичным и ранним скрытым сифилисом были получены значения чувствительности 69 %, 98 % и 94 % соответственно [150]. Общая чувствительность и специфичность в ИФА химерного комплекса белков Tr0453-Tr0326, описанного Smith В.С. с соавт., составила 98 % и 99 % соответственно. Чувствительность для групп первичного, вторичного и раннего скрытого сифилиса составила 94 %, 100 % и 100 % соответственно [150].

**Tr0453** – липопроtein наружной мембраны *T. pallidum* с молекулярной массой 31,9 кДа, высокоиммуногенный и не имеющий гомологов среди бактерий других родов [70]. Предполагается, что белок Tr0453 имеет транспортную функцию, осуществляет перенос липидов и гликолипидов через наружную мембрану бактерии. Модификация Tr0453 без липидного фрагмента охарактеризована наличием  $\beta$ -складчатых участков и  $\alpha$ -спиралей, и при добавлении к искусственным билипидным мембранам связывается с ними и изменяет их проницаемость. Вследствие этого для белка Tr0453 *T. pallidum* была предположена функция порина [70]. Позднее Luthra A. с соавт. описали трехмерную кристаллическую структуру Tr0453, которая характеризовалась чередованием  $\alpha$ -цилиндров и  $\beta$ -складок ( $\alpha/\beta/\alpha$ ) и регионом из 5 стабильных  $\alpha$ -цилиндров, необходимых для связывания Tr0453 с внешней мембраной бледной трепонемы [103].

Серореактивность данного белка была подтверждена сразу несколькими исследовательскими группами [161, 108, 150]. В исследовании Smith В.С. с соавт. общая чувствительность и специфичность рекомбинантного Tr0453 в исследовании ИФА составила 98 % и 100 % соответственно. Чувствительность в группах пациентов с первичным, вторичным и ранним скрытым сифилисом составила 96 %, 100 % и 100 % соответственно [150]. Эти данные хорошо согласовывались с результатами более раннего исследования

Van Voorhis W.C. с соавт., показавшими 100%-ую чувствительность и специфичность для групп больных сифилисом и отсутствие реакции с образцами сыворотки пациентов с болезнью Лайма или лептоспирозом [161]. В скрининге иммунопротеома McGill M.A. с соавт. для Tr0453 была показана средняя серореактивность, преимущественно в группе больных первичным сифилисом, тогда как антитела к данному белку в группе больных поздним скрытым сифилисом не были детектированы [108]. При этом Tr0453 не был описан как серореактивный в скрининге рекомбинантных антигенов [36]. В настоящее время белок Tr0453 включен в диагностическую панель набора *WB kit Recom Blot Treponema IgG/IgM 2.0* (Mikrogen GmbH, Германия) вместе с классическими Tr15, Tr17, Tr47, TmpA и новым Tr0257 (Gpd) антигенами *T. pallidum*.

**Tr0769 (TmpB)** – мембранный белок В, расположенный на внешней мембране. В работе Brinkman M.B. с соавт. показано 3-кратное превышение фоновых значений уровня антител к данному антигену в группе больных первичным сифилисом по сравнению с контрольными образцами здоровых индивидов [36]. В этом же исследовании уровень соответствующих антител превышал референсные значения в два раза в группе раннего скрытого сифилиса. При этом в скрининге McGill M.A. с соавт. были получены значения серореактивности 3+ для образцов сыворотки больных первичного, вторичного, раннего и позднего скрытого сифилиса [108].

### ***1.5.6 Мембранные и периплазматические белки *T. pallidum****

Белки, локализованные на цитоплазматической мембране со стороны периплазматического пространства, обладают наибольшей иммуногенностью среди других антигенов *T. pallidum*, как было показано в работах по изучению ее протеома. Высокая иммуногенность объясняется содержанием в структуре радикалов жирных кислот [36, 108].

**Tr0136** – локализованный на наружной мембране белок *T. pallidum*, способный связывать компоненты внеклеточного матрикса – фибронектин и ламинин организма хозяина [82, 84]. Белок отличается по нескольким полиморфизмам на нуклеотидном и аминокислотном уровне как среди подвидов *T. pallidum*, так и среди отдельных штаммов. По данным Brinkman с соавт., в условиях экспериментальной инфекции на кроликах уровень антител к белку Tr0136 был выше на ранних стадиях. При выполнении ИФА с Tr0136 в качестве антигена с образцами сыворотки крови пациентов с первич-

ным, вторичным и ранним скрытым сифилисом, все образцы были реактивными [82], однако наибольшая серореактивность была зарегистрирована среди образцов сыворотки пациентов с первичным сифилисом [36]. В исследовании Lei-yang с соавт. было выявлено, что чувствительность иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного Tr0136 при первичном сифилисе составляет 75,1 % [94].

**Tr163 (TroA)** – белок в составе АТФ-связывающего транспортного комплекса (*ABC transporter*), периплазматический связывающий белок. В работе Brinkman M.V. с соавт. показано двукратное превышение фоновых значений при исследовании антител к данному антигену в сыворотке крови больных ранним скрытым сифилисом, тогда как при манифестных формах значительного превышения не описано [36]. При этом в скрининге McGill M.A. с соавт. были получены значения серореактивности 3+ для образцов сыворотки больных первичного, вторичного, раннего и позднего скрытого сифилиса [108].

**Tr0249 (FlaA1)** – белок с молекулярной массой 37 кДа, формирующий внешнюю оболочку флагеллярного филамента [46]. Li с соавт. показали, что белок FlaA, взаимодействуя с коровыми белками FlaB, способствует поддержанию спиральной формы периплазматических фибрилл [97]. Молекулярное клонирование гена белка *T. pallidum* с молекулярной массой 37кДа было впервые описано Isaacs с соавт. в 1989 г., экспрессия белка в *E. coli* была выполнена в 1990 г. [81, 82]. Было показано, что N-конец молекулы FlaA не имеет гомологов среди других периплазматических флагеллярных белков *T. pallidum* [118]. По данным исследований McGill M.A. с соавт. белок является серореактивным при всех формах сифилиса [108].

**Tr0259 (TrE)** – белок *T. pallidum* с молекулярной массой 22 кДа, обладающий способностью связывать пептидогликаны, серореактивный при всех формах сифилиса [108]. Анализ генов, кодирующих белки Tr0259 у *T. pallidum* subsp. *pallidum* и *T. pallidum* subsp. *pertenue* показал, что белки Tr0259 имеют сходную структуру у данных подвидов [74].

**Tr0277** – С-терминальная периплазматическая протеаза S41A с рассчитанной молекулярной массой 50,3 кДа. В исследовании Brinkman M. V. с соавт. антитела против Tr0277 в 4,3 раза превышали уровень соответствующих антител в группе позднего скрытого сифилиса по сравнению с группой здоровых индивидов [36].

**Тр0319 (ТmpС, PnrA)** – мембранный липопротеин *T. pallidum*, рецептор пуриновых нуклеозидов, транспортный белок в составе АТФ-связывающего комплекса (сходного с АВС-транспортными белками) с молекулярной массой около 37,7 кДа. Предположительно, данный липопротеин является заякоренным во внутренней мембране посредством липидной части молекулы [56]. В исследовании Brinkman M. В. антитела против Тр0319 определялись при первичном, вторичном и раннем скрытом сифилисе [36], а в исследовании М. А. McGill также показывал средний уровень серореактивности при всех исследуемых формах данного заболевания [108].

**Тр0684 (MgIB-2)** – белок с молекулярной массой 43 кДа, обладающий транспортной АТФ-зависимой функцией и серореактивный при всех формах сифилиса [109, 36, 108]. Becker P.S. с соавт. предположили, что белок Тр0684 является периплазматическим, обладает способностью связывать сахара, так как было обнаружено сходство между антигеном Тр0684 *T. pallidum* и глюкозо/галактозо-связывающим (MgIB) белком *E. coli* [24]. Дека с соавт. считают, что белок Тр0684 в том числе является рецептором для связывания глюкозы [55].

**Тр0965** – белок цитоплазматической мембраны *T. pallidum* с молекулярной массой 35,4 кДа, серореактивный на всех стадиях сифилиса [108, 100]. Структура белка представлена 320 аминокислотными остатками и включает один  $\alpha$ -спиральный трансмембранный участок. Тр0965 характеризуется как белок с транспортной функцией. Описана его роль в активации клеток эндотелия путём повышения экспрессии молекул адгезии ICAM-1, E-селектина и в изменении проницаемости эндотелиального барьера. Тр0965 также индуцирует реорганизацию F-актина в эндотелиальных клетках, что приводит к привлечению и миграции через эндотелий моноцитов и дальнейшему нарушению функций эндотелиального барьера [172]. По данным Long F. Q. с соавт. использование иммуноблотинга с рекомбинантным белком Тр0965 позволяет выявить наличие сифилиса при всех исследованных формах заболевания. Из 74 исследуемых образцов сыворотки крови больных сифилисом только 4 были ложноотрицательными при использовании Тр0965 в качестве антигена в ИФА. В группе здоровых индивидов ложноположительные результаты отсутствовали [100].

**Тр0971 (Тр34, ТрD)** – лактоферрин-связывающий,  $Zn^{2+}$  связывающий периплазматический белок. Содержит трансмембранный участок (альфа-спираль II типа), предсказанное расположение – на цитоплазматической мембране со стороны периплазмы. В

работе Brinkman M.B. с соавт. [36] показано 4-кратное превышение фоновых значений уровня антител к данному антигену в группе больных первичным сифилисом и 8-кратное в группе раннего скрытого сифилиса по сравнению с контрольными образцами здоровых индивидов. В скрининге McGill M.A. с соавт. [108] были получены значения серореактивности 2+ для образцов сыворотки больных первичного, вторичного, раннего сифилиса и 1+ для позднего скрытого сифилиса.

### 1.5.7 Цитоплазматические белки *T. pallidum*

**Тр0608** – гипотетический белок *T. pallidum* с рассчитанной молекулярной массой 31,9 кД, предположительно имеющий цитоплазматическую локализацию [108]. На основании анализа первичной структуры белка Тр0608 он был оценен как специфический для рода *Treponema*. Серореактивность белка на стадии первичного, вторичного, раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса описана в работе McGill M.A. с соавт. [108].

**Тр1038** – цитоплазматический олигомерный белок, состоящий из 12 идентичных субъединиц, за счёт дисульфидных мостиков, формирующих шаровидную структуру. Молекулярная масса каждого мономера составляет 20,8 кДа [158]. Белок Тр1038 является бактериоферритином, обладает ферроксидазной активностью. Кристаллическая структура данного белка сходна с другими миниферритинами семейства Dps (DNA protection complex), например Dlp2 *Bacillus anthracis* и HP-NAP (*Neutrophil-activating protein*) *Helicobacter pylori*. Обращенные внутрь сферы заряженные аминокислотные остатки каждого из мономеров способны связывать один ион железа, однако его точное расположение относительно структуры ферритина в настоящий момент не определено [158]. Vabolin C. с соавт. была описана роль белка Тр1038 в формировании иммунного ответа при сифилитической инфекции [17]. Тр1038 стимулирует высвобождение моноцитами IL-10 и TGF- $\beta$  – цитокинов, играющих ключевую роль в дифференцировке регуляторных Т-лимфоцитов. Также было обнаружено, что Тр1038 стимулирует синтез и выделение моноцитами провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1b, что в дальнейшем приводит к активации сложного белкового комплекса инфламмосомы [17]. Иммуногенность белка Тр1038 была показана как в работах с рекомбинантным вариантом этого антигена, так и в скрининге нативных белков бледной трепонемы [36, 108, 83]. Высказывается предположение, что иммунный ответ определяется N-концевой



частью мономера, которая выступает на поверхности 12-мерного комплекса Trp1038 [158]. Кроме того, есть данные, свидетельствующие о высокой иммуногенности Trp1038 в олигомерной форме [108]. В исследовании Jiang с соавт. оценка диагностической значимости Trp1038 была выполнена с помощью твёрдофазного ИФА и метода иммуноблоттинга [83]. Чувствительность и специфичность в иммуноблоттинге составили 100 % и 100 %. Чувствительность ИФА с Trp1038 в качестве антигена составляла 93,3 %, 100 %, 100 % и 100 % для первичного, вторичного, скрытого и врождённого сифилиса соответственно. Специфичность ИФА с Trp1038 составила 100 % как в контрольной группе, так и группах с болезнью Лайма и лептоспирозом [83].

Таким образом, на каждом последующем этапе развития методов исследования постепенно происходило пополнение и уточнение комплекса научных представлений о составе, локализации, функциональном предназначении и иммунологической реактивности белков, входящих в состав протеома возбудителя сифилитической инфекции *T. pallidum*. Доступные на соответствующем этапе знания об антигенных свойствах компонентов лизатного материала культуры возбудителя сифилиса использовались в клинической лабораторной диагностике для непрямой диагностики сифилиса, дифференциальной диагностики его с другими заболеваниями человека или оценки эффективности проведенного специфического лечения. Наиболее изученными к настоящему времени и широко используемыми в тест-системах для диагностики сифилиса белковыми детерминантами возбудителя являются рекомбинантные аналоги антигенов *Treponema pallidum*: TrpN15 (Trp0171), TrpN17 (Trp0435), TrpN47 (Trp0574), TrpN44,5 (TmprA, Trp0768). Однако созданные на их основе наборы реагентов не всегда обладают высокой чувствительностью и специфичностью, что приводит к ложноотрицательным и ложноположительным результатам и неполному выявлению больных сифилисом. В этой связи создание новых, более чувствительных и специфичных методов лабораторного исследования для выявления сифилиса и соответствующих диагностических наборов реагентов должно базироваться на отборе и изучении свойств отдельных, в том числе мало изученных белков из состава иммунопротеома *T. pallidum*.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе в качестве материала исследования были использованы биообразцы возбудителя сифилиса *T. pallidum*, генетические экспрессионные системы на основе синтетического вектора рЕТ28a(+), содержащие кодирующие последовательности целевых генов *T. pallidum*, а также полученные с их помощью штаммы продуценты целевых рекомбинантных белков *T. pallidum*. В работе были использованы методы биоинформатического анализа аминокислотных последовательностей, и также молекулярно-генетические методы, позволяющие осуществить клонирование кодирующих последовательностей целевых генов в экспрессионные системы, провести гетерологическую экспрессию и хроматографическую очистку фракций рекомбинантных белков, а также выполнить серологические исследования на выборке образцов сыворотки крови больных сифилисом, боррелиозом и здоровых индивидов с применением полученных рекомбинантных белков *T. pallidum*. Также в настоящей работе были использованы методы статистической обработки результатов исследований.

### 2.1 Материалы исследования

**ДНК *Treponema pallidum*.** Материалом для получения ДНК *T. pallidum* являлась взвесь бледных трепонем в физрастворе с белковыми компонентами ткани яичек кроликов, зараженных штаммом *Treponema pallidum Nichols*, культивируемого на тестикулярной модели у кроликов в виварии Сергиево-Посадского филиала ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России. Для выделения ДНК *T. pallidum* из взвеси бледных трепонем в физрастворе использовали набор «ДНК-экспресс» (Литех, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

**Вектор для конструирования экспрессионных систем.** Для получения экспрессионных систем рекомбинантных белков *T. pallidum* использовали вектор рЕТ28a(+) (*Novagen*, Германия). Вектор содержал следующие структурные элементы:

- Т7 промотер 370-386;
- Т7 сайт начала транскрипции 369;
- кодирующая последовательность *His*-тэга 270-287;
- кодирующая последовательность Т7-тэга 207-239;

- мультиклональный сайт (*Nco*I (296), *Nde*I (238), *Nhe*I (231), *Bam*HI (198), *Eco*RI (192), *Sac*I (190), *Sal*I (179), *Hind*III (173), *Eag*I (166), *Not*I (166), *Xho*I (158));
- кодирующая последовательность His-тэга 140-157;
- T7 терминатор – сайт окончания транскрипции 26-72;
- кодирующая последовательность гена *lacI* 773-1852;
- pBR322 сайт начала репликации 3286;
- ген устойчивости к канамицину *Kan* 3995-4807;
- *f1* сайт начала репликации 4903-5358.

Для амплифицирования вектора использовали штамм *E.coli* TOP10.

**Штаммы *E.coli* и реагенты для культивирования.** Для получения генетических экспрессионных систем и штаммов-продуцентов рекомбинантных белков использовали компетентные клетки следующих штаммов *E.coli* (*Sigma Aldrich*, США):

- BL21 (DE3) [F<sup>-</sup>, ompT, gal, dcm, lon, hsdSB(rB- mB-), λ(DE3): *lacI*, *lacUV5-T7 gene1*, *ind1*, *sam7*, *nin5*];
- BL21 (DE3) PlyS [F<sup>-</sup>, ompT, gal, dcm, lon, hsdSB(rB- mB-), pLysS (CamR), λ(DE3): *lacI*, *lacUV5-T7 gene1*, *ind1*, *sam7*, *nin5*];
- TOP10 [F<sup>-</sup>, mcrA, Δ(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *nupG*, *recA1*, *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, λ- ].

Для культуральных работ с клетками *E. coli* использовали:

- среду 2xTY: 1,6% бактотриптон (*Amresco*, США);
- 1% дрожжевой экстракт (*Helicon*, Россия);
- 0,5% раствор NaCl (*Panreac*, Испания).

Для заливки чашек использовали среду 2xTY с 1,5% агаром (*Helicon*, Россия). Для отбора трансформированных колоний и дальнейшего выращивания штаммов-продуцентов добавляли канамицин (*AmpliChem*, Германия) до финальной концентрации в среде 50 мкг/мл.

Для получения компетентных клеток *E.coli* использовали:

- стерильный 0,1М раствор CaCl<sub>2</sub> (*AmpliChem*, Германия) для получения компетентных клеток штаммов *E.coli*.
- стерильный 0,1 М раствор CaCl<sub>2</sub> с 15 % глицерина (по массе) (*Panreac*, Испания) для хранения компетентных клеток штаммов *E. coli*.

Все среды и растворы для работы с клетками *E. coli* стерилизовались автоклавированием в паровом автоклаве 15 мин при 121 °С и давлении 2 атм.

**Реагенты для ПЦР.** Для амплификации кодирующих последовательностей генов целевых белков использовался набор для проведения высокоточной ПЦР *Thersus Plus PCR kit* (Евроген, Россия), содержащий 50x смесь полимераз *Thersus*, 10x *Thersus Plus* буфер, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (10 мМ каждый), деионизированную воду.

Для проверки рекомбинантных клонов использовался набор для ПЦР с *taq* полимеразой (Евроген, Россия), содержащий *taq* полимеразу (5 ед./мкл), 10x *taq* буфер, 50x смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (10 мМ каждый), деионизированную воду.

**Реагенты для проведения электрофореза в агарозном геле.** Для анализа продуктов ПЦР в агарозном геле использовали:

- 50x (в конечной концентрации 1x) буфер TAE (*Thermo*, США),
- агароза (*Helicon*, Россия),
- бромистый этидий (в конечной концентрации 300мМ) (*Thermo*, США),
- 6x (в конечной концентрации 1x) буфер для нанесения проб в агарозный гель (*Thermo*, США),
- маркер молекулярного веса GeneRuler 100bp DNA Ladder (*Thermo*, США).

**Реагенты для клонирования генов целевых белков *T. pallidum*.** Для клонирования кодирующих последовательностей белков в вектор pET28a(+) использовали:

- рестрикционные эндонуклеазы *NdeI*, *BamHI*, *HindIII*, *XhoI*, *NheI*, *NotI* (*Thermo*, США) с соответствующими буферными растворами согласно рекомендации производителя,
- лигаза фага T4 (*Thermo*, США) с буфером в соответствии с протоколом производителя.

Для очистки плазмидной ДНК из клеток *E. coli* использовали набор *Plasmid MiniPrep* (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Для очистки продуктов ПЦР и рестрикции использовали набор для очистки ДНК-фрагментов *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (*Promega*, США) в соответствии с протоколом производителя.

**Реагенты для секвенирования по Сенгеру.** Для проведения секвенирования использовали:

- набор *Big Dye Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*, США);

- щелочная фосфатаза (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*) (*Thermo*, США);
- экзонуклеаза *ExoI* (*Thermo*, США);
- этанол высокой очистки (*Sigma Aldrich*, США);
- 0,5 М раствор ЭДТА (*Ambion*, США);
- 3 М раствор ацетата натрия (*Thermo*, США);
- формамид высокой очистки (*Thermo*, США).

**Реагенты для экспрессии рекомбинантных белков *T. pallidum*.** Для индукции экспрессии рекомбинантных белков в клетках штаммов-продуцентов использовали изо-пропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (*Helicon*, Россия). Для лизирования клеток использовали 50мМ фосфатный буфер pH 7,4 (*Sigma Aldrich*, США) с добавлением лизоцима (*Applichem*, Германия) до концентрации 1 мг/мл и коктейля ингибиторов протеиназ (*Sigma Aldrich*, США) согласно рекомендациям производителя.

**Реагенты для металл-хелатной хроматографии.** Для очистки целевых белков из бесклеточного лизата культуры штаммов-продуцентов использовали:

- сорбент Ni-NTA Fast Flow сефароза (*GE Life Sciences*, США);
- буфер для регенерации сорбента – 50 мМ раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (*Helicon*, Россия); 0,5 М раствор  $\text{NaCl}$  (*Applichem*, Германия), 0,05 М раствор ЭДТА (*Helicon*, Россия), pH 7,4;
- буфер для нанесения образца и промывки хроматографической колонки: 50 мМ раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 М раствор  $\text{NaCl}$  (*Applichem*, Германия), pH 7,4;
- буфер для элюирования с имидазолом: 50 мМ раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 М раствор  $\text{NaCl}$  (*Applichem*, Германия), 500 мМ раствор имидазола (Диаэм, Россия), pH 7,4;
- 0,1 М раствор  $\text{NiSO}_4$  (*Applichem*, Германия);
- 1,5 М раствор  $\text{NaCl}$  (*Applichem*, Германия) для очистки хроматографической колонки;
- 0,5 М раствор  $\text{NaOH}$  (*Applichem*, Германия) для очистки хроматографической колонки.

Для очистки целевых белков из телец включения использовали:

- буфер с мочевиной для нанесения образца и промывки хроматографической колонки: 100 мМ раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ раствор  $\text{Tris-HCl}$  (*Helicon*, Россия), 8 М раствор мочевины (*Applichem*, Германия), pH 8,0;

– буфер с мочевиной для элюирования: 100 мМ раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ раствор Tris-HCl, 8 М раствор мочевины, 500 мМ раствор имидазола, pH 8,0.

**Реагенты для денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.**

Для проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле использовали следующие растворы:

- 30% водный раствор акриламида: (37,5/1) акриламид (*Helicon*, Россия) / бисакриламид (*Amresco*, США);
- 4x буфер для концентрирующего геля, содержащий 0,5 М раствор Tris-HCl, 0,4% раствор додецилсульфата натрия (SDS) (*AmpliChem*, Германия), pH 6,8;
- 4x буфер для разделяющего геля, содержащий 1,5 М раствор Tris-HCl, 0,4% раствор SDS, pH 8,8;
- 25 % водный раствор персульфата аммония (*Amresco*, США),
- Раствор для окрашивания геля, содержащий 0,1 % Кумасси G-250 (по массе) (*Serva*, Германия);
- 10x электродный буфер, содержащий 250 мМ раствор Tris-HCl, 1% раствор SDS, 2 М раствор глицина (Диаэм, Россия), pH 8,5;
- 2x буфер для нанесения образцов, содержащий 0,2 М раствор Tris-HCl, 4% раствор SDS, 20% глицерина (по массе), 0,5 мМ раствор ЭДТА, 3% β-меркаптоэтанола (по массе) (*Helicon*, Россия), 0,8 % бромфеноловый синий (по массе) (*Helicon*, Россия), pH 8,9.

**Коллекция образцов сыворотки крови больных сифилисом, больных боррелиозом и здоровых индивидов.** Для исследования уровня антител к целевым белкам *T. pallidum* была собрана коллекция образцов сыворотки крови, полученных от пациентов консультативно-диагностического центра ФГБУ «ГНЦДК» с предварительно верифицированным лечащим врачом-дерматовенерологом диагнозом «сифилис» (первичный, вторичный, ранний скрытый и поздний скрытый сифилис) и «боррелиоз», а также от здоровых пациентов. Подбор групп проведен с участием клинического врача-дерматовенеролога, к.м.н. Г.Л. Катунина в соответствии с поставленным диагнозом на основании данных истории болезни и комплекса лабораторных тестов. Всего в исследование взяты 196 образцов сыворотки крови, соответствие которым определенным группам сравнения представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Количество образцов сыворотки крови больных сифилисом, боррелиозом и здоровых индивидов, используемых при выполнении исследования

Диагноз	Всего в коллекции
Первичный сифилис	19
Вторичный сифилис	27
Ранний сифилис скрытый	36
Поздний сифилис скрытый	52
Боррелиоз	10
Здоровые	61
Всего:	196

Анализируемые образцы были получены путем забора крови в вакуумные пробирки с коагулянтом, которые затем центрифугировали для отделения сыворотки от форменных элементов крови при скорости 3000 об/мин. Сыворотки были пронумерованы и помещены на хранение в холодильник при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Группа сравнения была сформирована из образцов сыворотки крови здоровых индивидов.

Для всех образцов сыворотки крови были проведены регламентированные лабораторные тесты для диагностики сифилиса. Нетрепонемный флукуляционный тест, направленный на выявление антикардиолипиновых антител, выполнен в варианте RPR-теста с использованием набора реактивов производства ЗАО «Эколаб» (Электрогорск, Россия). В свою очередь трепонемные тесты, идентифицирующие специфические антитела к иммунодоминантным антигенам *T. pallidum*, были выполнены в вариантах реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с использованием комплекта реагентов «Сифилис-РПГА-тест» (ЗАО «Эколаб», Электрогорск, Россия), а также набора реагентов «РекомбиБест антипаллидум – суммарные антитела» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия), основанного на технологии иммуноферментного анализа (ИФА).

**Реагенты для определения концентрации белка.** Для определения концентрации растворов белков по методу Бредфорд использовали:

- 5х раствор Кумасси для измерения концентрации растворов белков *Protein Assay* (BioRad, США);
- набор стандартных разведений *Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set* (BioRad, США), содержащий растворы бычий сывороточный альбумин (БСА) в концентрациях от 0,125 мг/мл до 2 мг/мл.

**Реагенты для иммуноферментного анализа (ИФА).** Для проведения ИФА использовали следующие реагенты и расходные материалы:

- новые рекомбинантные белки *T. pallidum* Тр0453, Тр0319, Тр1038, Тр0965, Тр0277 и Тр0684, полученные путем клонирования и экспрессии в штаммах-продуцентах;
- коммерческий антиген *T. pallidum* Тр17 (ИМТЕК, Россия);
- плашки для ИФА высокой сорбции (*Greiner Bio-One*, Германия);
- буфер для нанесения целевого белка на плашки высокой сорбции, содержащий фосфатный буфер 1хPBS (10 мМ раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,137 М раствор  $\text{NaCl}$ , 0,0027 М раствор  $\text{KCl}$ ) (ЭкоСервис, Россия);
- буфер для отмывки 1хPBS и 0,05% Tween 20 (по объему) (*Panreac*, Испания);
- буфер для блокирования 1хPBS и 1% БСА (по массе) (Диаэм, Россия);
- буфер с конъюгатом антител (*Sigma Aldrich*, США) против IgG человека с пероксидазой хрена (1:60 000) в 1хPBS с 0,05% Tween 20 и 0,1% БСА (по массе);
- раствор хромогена *o*-фенилендиамина (ОФД) с концентрацией 0,5 мг/мл в 50 мМ цитратном буфере (*Panreac*, Испания), содержащем 0,03% пероксида водорода (по объему) (*Panreac*, Испания);
- 0,2 М раствор серной кислоты (ЛабТех, Россия).

**Реагенты для проведения реакции непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ) на иммуночипах.** Для проведения нРИФ использовали следующие реагенты и расходные материалы:

- новые рекомбинантные белки *T. pallidum* Тр0453, Тр0319, Тр1038, Тр0965, Тр0277 и Тр0684, полученные путем клонирования и экспрессии в штаммах-продуцентах;
- коммерческие антигены *T. pallidum* Тр15, Тр17, Тр47 и ТmpA (ИМТЕК, Россия);
- коммерческие рекомбинантные белки Тр0163 и Тр0971 (*Cusabio*, Китай);
- 2% водный раствор БСА для нанесения контроля неспецифического связывания;
- IgG и IgM человека (*Thermo*, США) для контроля связывания вторичных антител;
- антитела козы против иммуноглобулинов IgG и IgM человека (*KPL*, США) для контроля внесения образца сыворотки;



- конъюгат антител козы против IgG человека с флуорофором Cy5 и конъюгат антител козы против IgM человека с флуорофором Cy3 (*KPL*, США) в качестве вторичных антител;
- буфер 1xPBS с 0,05% Tween 20 (по массе) для нанесения образцов сыворотки крови и вторичных антител;
- флуорофоры Cy5 и Cy3 для маркировки границ печати (*Thermo*, США).

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Выполнение биоинформатического анализа

Поиск новых антигенов *T. pallidum* был проведен на основе сравнительного анализа результатов серологического скрининга с целью определения иммунной активности компонентов рекомбинантных экспрессионных библиотек [36] и нативных белков *T. pallidum*, разделенных методом двумерного электрофореза [108].

Выбранные на основании опубликованных данных антигены *T. pallidum* были исследованы и охарактеризованы с использованием методов биоинформатики, включая этапы:

- определения гомологии аминокислотной последовательности белков и анализ их структурных элементов;
- выявления сайтов липидирования;
- определения клеточной локализации отобранных белков;
- установления специфичности белков для рода *Treponema*.

Для определения сходства аминокислотной последовательности отобранных белков с белками других микроорганизмов проводили поиск гомологии их первичной структуры с помощью базы белковых последовательностей *NCBI* и сервисов *blastp* и *PSI-BLAST* [15].

Для установления клеточной локализации отобранных белков использовали серверы *PSORTb 3.0.2* [170] и *Cello* [169], представляющие собой программы для предсказания локализации белков с использованием математических расчетов, основанных на байесовских сетях и методе опорных векторов. В данных серверах реализован конвейерный подход анализа последовательностей белков с поиском гомологии с другими бак-

териальными белками, обнаружением специфических аминокислотных мотивов, профиля гидрофобности, сайтов распознавания сигнальными пептидазами.

Важным элементом определения локализации белков являлся анализ наличия в их структуре трансмембранных  $\alpha$ -спиральных областей, сигнальной последовательности (сигнального пептида) и  $\beta$ -складчатых участков.

Трансмембранные  $\alpha$ -спиральные регионы в структуре белков исследовали с помощью программы *TMHMM Server v. 2.0*. В данной программе  $\alpha$ -спиральная топология участков белка предсказывается путем расчетов, проводимых на основе скрытых моделей Маркова, исходя из вероятностей нахождения аминокислотных остатков в различных сегментах белка (в трансмембранных, в цитоплазматической части и т. д.) и длины известных трансмембранных областей белков [111].

Выявление  $\beta$ -складчатых участков проводили с помощью серверов *BOMP* [25] и *TMBETADISC-PSSM* [122].

Наличие сигнального пептида у предшественников белков устанавливали с помощью сервера *SignalP 4.0* [128], структура сигнального пептида и сайт его расщепления предсказывается на основании оценки аминокислотной последовательности белка с использованием нейронных сетей.

Для выявления липопротеинов в геноме *T. pallidum* проводился анализ последовательностей соответствующих генов с помощью серверов *UiB Lipo* [72] и *LipoP* [74]. Принцип работы указанных программ основан на распознавании так называемых «липо-боксов» - участков в последовательности полипептида, узнаваемых сигнальной пептидазой II типа.

Для идентификации специфичности белков для рода *Treponema* применяли поиск геномной информации о возбудителях инфекций, передаваемых половым путем, по базе данных Национальной лаборатории Лос-Аламоса (США), которая содержит информацию о белках *T. pallidum* с Tr0001 по Tr1041 [192].

Для повышения точности предсказания свойств антигенов применяли комбинированное исследование последовательности белков с применением нескольких программ.

### 2.2.2 Получение генетических экспрессионных систем

Получение генетических экспрессионных систем методом клонирования включало в себя встраивание последовательностей ДНК, кодирующих целевые белки

*T. pallidum* (полученных методом ПЦР), в структуру экспрессионного вектора, способного амплифицироваться в клетках *E. coli* и передаваться вместе со встроенным в нее фрагментом ДНК при делении клеток. Выбранный для создания экспрессионных систем, кодирующих целевые белки *T. pallidum*, вектор pET28a(+) (Invitrogen, США) отвечает всем необходимым критериям функциональных экспрессионных систем (Рисунок 10).

Вектор pET28a(+) может длительное время существовать в популяции штаммов *E. coli*, т.е. реплицироваться автономно или вместе с хромосомами клеток. Указанный вектор содержит ген устойчивости к канамицину, позволяющий дифференцировать колонии, содержащие экспрессионные системы на основе данного вектора. Также структура вектора дает возможность встраивать в последовательность фрагмент ДНК без нарушения функциональной целостности вектора и присоединять к синтезируемым белкам дополнительные аминокислотные последовательности для очистки рекомбинантных белковых продуктов. Вектор pET28a(+) позволяет осуществить присоединение последовательности *His*-тега, состоящей из 6 гистодинов и позволяющей выполнить очистку целевого белка с помощью металл-хелатной хроматографии.

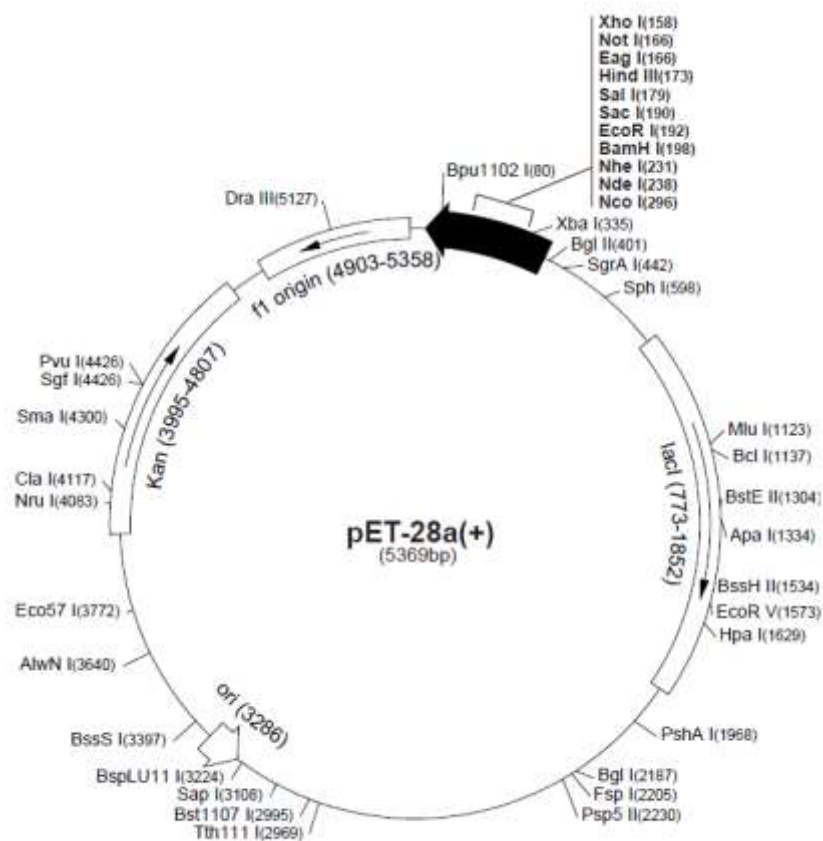


Рисунок 10 – Схема вектора pET28a с функциональными элементами

Получение экспрессионных систем для очистки целевых белков *T. pallidum* включало в себя следующие этапы исследования:

- дизайн праймеров и амплификация кодирующих последовательностей генов целевых белков *T. pallidum*;
- рестрикция и лигирование кодирующих последовательностей белков в вектор;
- получение компетентных клеток *E. coli*;
- трансформация компетентных клеток *E. coli* полученными экспрессионными системами;
- селекция штаммов-продуцентов, содержащих гены целевых белков и проверка последовательности полученных экспрессионных систем.

**Дизайн праймеров и амплификация кодирующих последовательностей генов целевых белков *T. pallidum*.** Для получения генетических экспрессионных систем кодирующую последовательность ДНК соответствующего гена встраивали в мультиклональный сайт вектора рЕТ28a(+) с учетом присоединения *His*-тэга (6 аминокислотных остатков гистидина) с N-конца синтезируемого пептида и остановкой синтеза в конце последовательности целевого белка.

При подборе праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК *T. pallidum* использовались базы данных *NCBI* и *UniProt*, а также программы *NCBI Blast* и *OLIGO* 6.0. Критериями для подбора праймеров служили:

- длина (20–30 нуклеотидов специфической последовательности без учета сайтов рестрикции);
- температура плавления олигонуклеотида (около 60 °С, максимально близкая для двух парных праймеров);
- состав G/C нуклеозидов (40–60 %),
- отсутствие регионов для образования вторичных структур внутри каждого праймера (контроль образования шпилек);
- отсутствие регионов комплементарности между одноименными и парными праймерами (контроль образования димеров).

Также учитывались дополнительные условия с учетом последующего клонирования:

- праймеры фланкируют полную транслируемую последовательность гена целевого белка или его часть (например, белок без его сигнальной последовательности);

- с 5'-конца каждый праймер содержит три дополнительных нуклеотида, после которых вставлен сайт расщепления рестрикционной эндонуклеазы в соответствии с конструкцией вектора;
- праймер согласует встраиваемый фрагмент с рамкой считывания используемого вектора;
- праймер задает положение последовательности целевого белка в векторе, определяющее присоединение *His*-тэга (6 аминокислотных остатков гистидина) с N-конца синтезируемого пептида для очистки и выделения наработанного белка;
- праймер задает прерывание синтеза белка сразу после окончания последовательности встраиваемого фрагмента (стоп-кодон).

В качестве матричной ДНК для амплификации кодирующих последовательностей целевых генов использовали ДНК *T. pallidum*, выделенную с использованием набора «ДНК-экспресс» (Литех, Россия) из биологического материала кроликов, зараженных штаммом *Treponema pallidum Nichols*.

Амплификация фрагментов ДНК для клонирования требовала использования высокоточной ДНК-полимеразы, обладающей корректирующей 3'-5' экзонуклеазной активностью, без 5'-3' экзонуклеазной активности, с высокой процессивностью синтеза ДНК-цепи. Для амплификации кодирующих последовательностей использовали смесь высокоточных полимераз *Thersus* (Евроген, Россия).

Реакция ПЦР содержала в финальной концентрации 1x *Thersus Plus* буфер с оптимальной концентрацией  $Mg^{2+}$  согласно рекомендациям производителя полимеразы, 1x смесь полимераз *Thersus*, 0,2 мМ дезоксирибонуктеозидтрифосфаты (каждый), 0,5 мкМ праймеры (каждый), 2-10 нг ДНК *T. pallidum Nichols*.

Реакция амплификации проводилась по следующей программе:

1.	Денатурация	95 °С	3 мин	} 35 циклов
2.	Денатурация	95 °С	20 сек	
3.	Отжиг праймеров	60 °С	20 сек	
4.	Синтез цепи	72 °С	3 мин	

Результаты ПЦР проверяли с помощью электрофореза в 2%-ом агарозном геле с использованием 1xТАЕ буфера и бромистого этидия в качестве интеркалирующего флуоресцентного красителя для визуализации фрагментов ДНК.

**Рестрикция и лигирование кодирующих последовательностей целевых белков в вектор pET28a(+).** Перед встраиванием кодирующих целевые гены фрагментов в

вектор pET28a(+) проводили очистку ПЦР-продукта из агарозного геля с использованием соответствующего набора (см. р-л. 2.1). Далее очищенный ПЦР-продукт обрабатывали смесью двух рестрикционных эндонуклеаз, которые соответствовали заложенным в праймерах сайтам рестрикции. Выбранные эндонуклеазы относились к рестрикционным системам II типа с образованием выступающих одноцепочных фрагментов в сайте рестрикции («липкие концы»). Для определения оптимальных условий рестрикции с двумя ферментами учитывались рекомендации производителя рестрикционных эндонуклеаз *Thermo* (интернет-ресурс *Thermo Double Digest Calculator*). Соответствующими эндонуклеазами обрабатывали также вектор pET28a(+), и параллельно проводили контрольную рестрикцию с ДНК фага лямбда.

После очистки линейного вектора и ПЦР-продукта от компонентов рестрикционной смеси с использованием указанного набора (*Promega*, США) полученные фрагменты оценивали в 2%-ом агарозном геле (продукты рестрикции ДНК фага лямбда проверяли в качестве контроля эффективности рестрикции в 1%-ом агарозном геле). По результатам гель-электрофореза рассчитывали количество копий линейных фрагментов вектора и ПЦР-продукта исходя из длины фрагментов и интенсивности свечения маркера веса ДНК-фрагментов.

После обработки рестрикционными эндонуклеазами очищенные фрагменты ДНК смешивали в пропорции 1:5 (вектор : ПЦР-продукт) в реакции лигирования, содержащей также лигазу бактериофага T4 и соответствующий буфер. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 12 ч (ночи).

**Получение компетентных клеток *E. coli* и дальнейшая трансформация полученными экспрессионными системами.** Клетки *E. coli* (каждый из штаммов TOP10, BL-21 (DE3) и BL-21 (DE3) PlyS) из стокового раствора ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в стерильных условиях рассеивали на чашку с агаризованной средой 2xTY. На следующий день одиночную колонию переносили в 3–5 мл жидкой среды 2xTY и культивировали в течение 18 час в ротационном инкубаторе *Excella E24* (*New Brunswick Scientific*, США) при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и интенсивной аэрации (150 об/мин). Затем 500 мкл подросшей культуры *E. coli* добавляли к 50 мл свежей среды 2xTY и культивировали при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  до достижения середины логарифмической фазы роста, что соответствует оптической плотности  $\text{ОП}_{600} = 0,3 - 0,4$ . Далее подросшую культуру переносили в стерильную пробирку и помещали в лед на 10 мин. Далее все манипуляции проводились на льду. Клетки осаждали центрифугированием

при 1000–1200 g в течение 10 мин при 4 °С. Затем осадок ресуспендировали в 10 мл стерильного 0,1 М раствора CaCl<sub>2</sub>, охлажденного до 4 °С, и помещали на лед на 20 мин. Осаждали клетки центрифугированием при 1000–1200 g в течение 10 мин при 4 °С. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 4 мл 0,1 М раствора CaCl<sub>2</sub> с добавлением глицерина до 10 % (по объему). Клеточную суспензию аликвотировали приблизительно по 0,1 мл, замораживали и далее хранили при –80 °С.

Для трансформации полученными в ходе лигирования экспрессионными системами необходимое количество аликвот компетентных клеткок *E. coli* TOP10 размораживали во льду. К размороженным клеткам добавляли 5 мкл продуктов реакции лигирования (или 1 мкл раствора нерестрицированного вектора pET28a(+)) для контроля трансформации) и инкубировали в течение 30 мин во льду. Далее клеточную суспензию помещали на 2 мин в твердотельный термостат CH100 (*BioSan*, Латвия), нагретый до 42 °С. Затем клетки охлаждали во льду в течение 2 мин, после чего в пробирку с клетками добавляли 500 мкл среды 2xTY и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 30 мин. После подрачивания клетки *E. coli* рассеивали на чашки с агаризованной средой 2xTY, содержащей селективный антибиотик (канамицин в конечной концентрации 50 мкг/мл) и инкубировали 12 ч (ночь) при 37 °С. Далее проводили селекцию выросших клонов на наличие целевых генетических систем.

**Селекция штаммов-продуцентов, содержащих гены целевых белков.** Отдельные колонии *E. coli*, выросшие после трансформации на селективной (с добавлением канамицина) агаризованной среде 2xTY, нумеровали и переносили в отдельные пробирки, содержащие 20 мкл стерильной воды. Биоматериал колонии ресуспендировали и использовали в ПЦР для подтверждения наличия целевой экспрессионной системы. Смесь ПЦР содержала *taq*-полимеразу с соответствующим буфером по рекомендации производителя, а также праймеры к встроенному фрагменту ДНК, кодирующему целевой рекомбинантный белок. Кроме ПЦР с праймерами к встроенному фрагменту ДНК для каждого клона также проводили ПЦР с праймерами к регионам T7–промотора и T7–терминатора, фланкирующим локусы встраивания кодирующего фрагмента в вектор pET28a(+):

T7\_F            5'-ATTAAATACGACTCACTATAGGGGAATTG-3'  
T7\_R            5'-GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'

ПЦР программа соответствовала следующему температурному режиму:

1.	Денатурация	95 °С	3 мин	} 35 циклов
2.	Денатурация	95 °С	20 сек	
3.	Отжиг праймеров	56 °С	20 сек	
4.	Синтез цепи	72 °С	1 мин	

Результаты ПЦР проверяли с помощью электрофореза в 2%-ом агарозном геле с использованием 1xTAE буфера и бромистого этидия в качестве интеркалирующего флуоресцентного красителя для визуализации фрагментов ДНК. Таким образом, два ПЦР-продукта соответствующей длины (с применением специфических и T7-праймеров) характеризовали наличие экспрессионной системы с целевой кодирующей последовательностью в клетках соответствующего клона.

**Проверка последовательности и наращивание целевых экспрессионных плазмид.** Фрагменты ПЦР с использованием T7-праймеров далее секвенировали по Сенгеру для характеристики точной последовательности экспрессионной системы. Полученный ПЦР-продукт очищали с помощью набора для очистки фрагментов ДНК (см. р-л 2.1), обрабатывали экзонуклеазой *EcoI* и щелочной фосфатазой *SAP* в течение 30 мин при 37 °С с последующей инактивацией ферментов при 85 °С в течение 3 мин. Далее готовили отдельные реакции амплификации с каждым из T7-праймеров для каждого фрагмента по протоколу набора *Big Dye Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*, США) и проводили ПЦР по следующей программе:

1.	Денатурация	95°С	1 мин	} 25 циклов
2.	Денатурация	95 °С	10 сек	
3.	Отжиг праймеров и синтез цепи	60°С	4 мин	

Полученные ПЦР-продукты очищали переосаждением этанолом с 0,125 М раствором ЭДТА и 3 М раствором ацетатом натрия, после этого добавляли 100 мкл формамида высокой очистки и проводили секвенирование полученных фрагментов с помощью прибора *ABI 3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*, США).

Прочтение сиквенсов характеризовало локусы встраивания целевой кодирующей последовательности в вектор рЕТ28a(+) и наличие целевого фрагмента ДНК в соответствии с рамкой считывания данной экспрессионной системы. При подтверждении правильного встраивания генов целевых белков соответствующую колонию с чашки Петри пересеивали для наращивания и выделения плазмидной ДНК.



Единичную колонию штамма *E. coli* TOP10 с подтвержденной секвенированием экспрессионной системой выращивали в 5 мл среды 2xTY с добавлением канамицина до концентрации 50 мкг/мл при 37 °С и постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин, и затем из полученной клеточной культуры выделяли плазмидную ДНК соответствующим набором реагентов (см. р-л 2.1) в соответствии с рекомендациями производителя. Плазмидную ДНК далее использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL-21(DE3) и BL-21(DE3)PlysS по описанной выше методике для клеток *E. coli* TOP10.

### 2.2.3 Получение и очистка рекомбинантных белков *T. pallidum*

**Гетерологическая экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli*.** После трансформации компетентных клеток *E. coli* BL-21(DE3) (или компетентных клеток BL-21(DE3)PlysS по описанной выше методике в случае экспрессионных систем рекомбинантных белков Tr0277 и Tr0684) единичную колонию каждого штамма-продуцента переносили в пробирку с 5 мл жидкой среды 2xTY, содержащей канамицин в концентрации 50 мкг/мл. Инкубировали при 37 °С в течение ночи при интенсивной аэрации. Часть культуры использовали для формирования архивных аликвот штаммов-продуцентов, отобрав из каждой пробирки 800 мкл культуры клеток и добавив к ним 200 мкл 70 % (по объему) стерильного раствора глицерина. Полученные архивные образцы клеток хранили при –80 °С. Остальной объем ночной культуры инокулировали в 500 мл среды 2xTY с канамицином в концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 37 °С до достижения плотности клеточной культуры  $OP_{600} = 0,6 - 0,7$  (соответствующей концу логарифмической стадии роста). Далее отбирали 1 мл культуры для контрольного образца до индукции синтеза рекомбинантного белка, и затем добавляли индуктор синтеза ИПТГ до конечной концентрации в культуре 1 мкг/мл. Инкубировали при 37 °С и интенсивной аэрации перемешиванием при 150 об/мин в течении 3 ч. В случае культур BL-21(DE3)PlysS использовали протокол «холодной индукции» – после достижения культурой логарифмической стадии роста и добавления ИПТГ проводили инкубацию при 18 °С в течение 12 ч (ночи). После синтеза рекомбинантного белка клетки *E. coli* осаждали с помощью центрифугирования при 3000g в течение 20 мин, сливали суперна-

тант и полученный клеточный осадок хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до последующего выделения целевого белка.

Эффективность экспрессии целевых белков проверяли методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Контрольные аликвоты клеток до и после индукции синтеза белка (по 1 мл) центрифугировали при 13000 об/мин, супернатант удаляли и к полученному клеточному осадку добавляли 40 мкл буфера для нанесения образцов в денатурирующем гель-электрофорезе с окраской Кумасси G-250. По результатам ПААГ электрофореза оценивали наличие белка соответствующей молекулярной массы относительно маркера молекулярных масс.

Для подтверждения идентичности полученных белков заявленным целевым белкам протеома *T. pallidum* была изучена их масс-спектрометрическая характеристика методом прямого профилирования с использованием времяпролетного масс-спектрометра *MALDI Ultraflex (Bruker Daltonics GmbH, Германия)* в ЦКП «Протеом человека» на базе ФГБНУ «Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». При проведении данного исследования был использован метод идентификации *Peptide Mass Fingerprint*, основанный на анализе масс-спектрометрических пептидных карт специфического протеолитического гидролиза исследуемых белков.

После проведения денатурирующего гель-электрофореза с окрашиванием Кумасси G250 из полиакриламидного геля выделяли целевую полосу (блок геля), из которого проводили очистку рекомбинантного белка. В дальнейшем проводили расщепление белка трипсином, обеспечивающим фрагментацию пептидов по остаткам аминокислот аргинина и лизина. Полученные образцы наносили на мишень и смешивали с матрицей (3-фторуксусной кислотой), одновременно являющейся источником протонов), необходимой для прохождения процесса со-кристаллизации и последующего снижения деструктивных свойств лазерного излучения на образец при его ионизации. После высыхания матрицы мишень загружали в прибор и проводили ионизацию с использованием источника с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI*).

В результате проведенного анализа для каждого образца был получен набор масс-спектров, которые сравнивали с эталонными масс-спектрами базы данных *SwissProt* в программном обеспечении *Mascot*. На основании подобного сравнения были получены

значения «Score» для каждого анализируемого образца, который позволил провести идентификацию белков.

**Очистка рекомбинантных белков.** Очистку полученных рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной хроматографии на сорбенте *Sepharose Ni-NTA* (*GE HealthCare*, Великобритания). Клеточный осадок штамма-продуцента рекомбинантного белка лизировали в буфере, содержащем 50 мМ раствора фосфатного буфера и 0,5 М раствор NaCl, с добавлением лизоцима до концентрации 1 мг/мл и ингибиторов протеиназ (*Sigma Aldrich*, США) согласно рекомендациям производителя. Полученную смесь инкубировали при постоянном встряхивании и перемешивании с помощью настольного ротатора *Rotamix RM1* (*Elmi*, Латвия) в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее проводили разрушение клеток ультразвуковой обработкой раствора на приборе *Vibra Cell* (*Sonics*, США) до получения гомогенной смеси, которую аликвотировали в микроцентрифужные пробирки по 1,5 мл и центрифугировали при 13000g и 4 °C в течение 30 мин. Супернатант отбирали и фильтровали через фильтры *Millex* с размером ячейки 0,22 мкм (*Merk Millipore*, Ирландия). Наличие растворимого белка в лизате определяли в денатурирующем ПААГ электрофорезе с окраской Кумасси G250.

Далее с помощью металл-хелатной хроматографии проводили очистку рекомбинантного белка из полученного бесклеточного лизата с помощью автоматической станции *EconoPump* (*BioRad*, США). Колонку уравнивали 50 мМ раствором фосфатного буфера с 0,5 М раствором NaCl, pH 7,4. После нанесения лизата хроматографическую колонку промывали тем же буфером с 20 мМ раствором имидазола, а затем элюировали целевой белок указанным буфером с линейным градиентом концентрации имидазола от 50 до 500 мМ. Наличие целевого белка в хроматографических фракциях определяли с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза в 14%-ом полиакриламидном геле с окраской Кумасси G250.

Для хроматографической очистки рекомбинантных белков Tr1038 и Tr0684 использовали буфер с добавлением 8 М раствора мочевины (100 мМ раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ раствора Tris-HCl, 8 М раствора мочевины, 500 мМ раствора имидазола, pH 8,0). После нанесения лизата хроматографическую колонку промывали тем же буфером с 50 мМ раствора имидазола, а затем элюировали целевой белок, повышая концентрацию раствора имидазола от 100 до 500 мМ.

Фракции, содержащие целевой белок в гомогенном состоянии, объединяли, диализовали против соответствующего буфера без имидазола, концентрировали в фильтрационных колонках *Amicon Ultracel* с пределом отсечения 10 кДа.

**Измерение концентрации белка по методу Бредфорд.** Для определения концентрации белка в растворе использовали набор стандартных разведений БСА от 0,125 мг/мл до 2 мг/мл (см. р-л 2.1) и 5х раствор Кумасси набора *Protein Assay* (*BioRad*, США). Раствор Кумасси из набора *Protein Assay* разводили в 5 раз, после чего использовали для приготовления калибровочных растворов по следующей схеме (Таблица 5):

Таблица 5 – Схема стандартных разведений для калибровочной прямой и результаты измерения

Исходная концентрация БСА (мг/мл)	Приготовление калибровочных растворов		Результат измерения ОП <sub>595</sub>
	Раствора БСА (мкл)	1х раствор Кумасси ( <i>Protein Assay</i> ) (мкл)	
2	10	990	0,952
1,5	10	990	0,711
1	10	990	0,536
0,75	10	990	0,434
0,5	10	990	0,272
0,25	10	990	0,115
0,125	10	990	0,037

Полученные растворы перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм против контрольного образца, не содержащего белка. Полученную калибровочную прямую далее применяли для подсчета концентрации исследуемых растворов рекомбинантных белков (Рисунок 11).

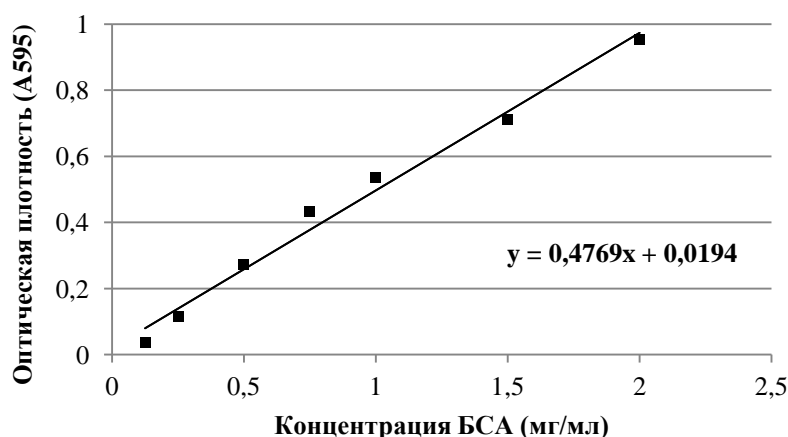


Рисунок 11 – Калибровочная прямая для расчета концентрации раствора белка на основе стандартных разведений БСА (0,125-2 мг/мл)

Для нахождения концентрации 10 мкл исследуемого раствора белка смешивали с 990 мкл 1-кратного разведения реагента *Protein Assay* и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 595 нм. Концентрацию вычисляли по уравнению полученной калибровочной прямой.

#### **2.2.4 Проведение серологических исследований с полученными рекомбинантными белками *T. pallidum***

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** В качестве антигенов для проведения ИФА использовали очищенные фракции целевых рекомбинантных белков после концентрирования и удаления имидазола из раствора белка. Для верификации исследования проводили анализ с принятым для клинической диагностики сифилитической инфекции антигеном Trp17.

Целевые белки диализировали против 1xPBS, измеряли концентрацию в полученном растворе по методу Бредфорд и готовили разведение для каждого белка в 1xPBS буфере до концентрации 2 мкг/мл. Далее полученные растворы наносили на плашки для ИФА высокой сорбции по 100 мкл в лунку и инкубировали 12 ч при 4 °С. После иммобилизации целевых белков плашки ополаскивали промывочным буфером PBS-T на станции *PW40 (BioRad, США)*. После нанесения целевого белка поверхность лунок обрабатывали для блокирования буфером с 1%-ым раствором БСА и инкубировали при 37 °С в течение 3 ч. После блокирования планшеты отмывали раствором PBS-T, планшеты высушивали при комнатной температуре, заклеивали плёнкой и хранили до проведения анализа при 4 °С.

Образцы сыворотки крови разводили в соотношении 1:50 в буфере, содержащем в конечной концентрации 100 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% БСА (по массе) и 0,05% Tween-20 (по объему). Полученные разведения сыворотки наносили по 100 мкл в лунку. Каждый образец анализировался в двух повторах. Нанесенные на планшет разведения инкубировали 1 ч при 37 °С на орбитальном шейкере *SkyLine Shaker ST-3L (Elmi, Латвия)* при 250 об/мин, после чего отмывали раствором PBS-T, а затем наносили раствор конъюгата антител против человеческих IgG с пероксидазой хрена (*Sigma Aldrich, США*) с разведением в соотношении 1:60 000 в 1xPBS с 0,05 % Tween (по объему) и 0,1 % БСА (по массе). Далее планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С на орбитальном шейкере (250 об/мин). По-

сле этого производили отмывание планшет и нанесение раствора хромогена - в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора *o*-фенилендиамина (*Thermo*, США) в цитратном буфере с 0,03%-ым раствором перексида водорода и инкубировали в темноте на орбитальном шейкере при 250 об/мин в течение 15 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,2 М раствора серной кислоты в каждую лунку и считывали оптическую плотность на ИФА-анализаторе *Multiscan Ascent* (*Thermo*, США) при длине волны 492 нм.

**Изготовление и применение иммуночипов, содержащих полученные рекомбинантные белки *T. pallidum*.** Гидрогелевые иммуночипы изготавливали по запатентованной технологии полимеризационной иммобилизации [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**], разработанной в ИМБ РАН [140]. Первый вариант чипов содержал применяемые в современной клинико-лабораторной диагностике (Tr15, Tr17, Tr47, TmpA) и новые (Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0965, Tr0277 и Tr0684) рекомбинантные белки *T. pallidum*, нанесенные на стеклянную подложку. Второй вариант чипов содержал те же рекомбинантные белки, а также два дополнительных рекомбинантных белка Tr0971 и Tr0163 *T. pallidum* (Рисунок 12).

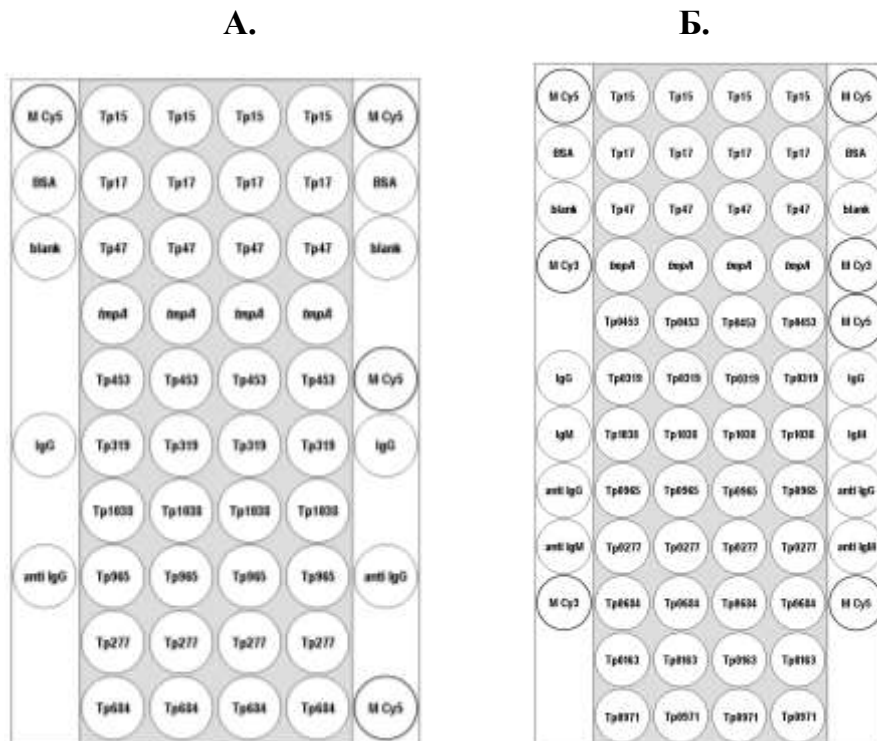


Рисунок 12 – Схемы нанесения рекомбинантных белков на иммуночип. А – первый вариант нанесения, содержащий 10 рекомбинантных белков *T. pallidum*; Б – второй вариант нанесения, содержащий 12 рекомбинантных белков *T. pallidum*

Все рекомбинантные белки *T. pallidum* были нанесены по 4 повтора каждый. Кроме того, схема печати иммуночипа включала контрольные ячейки: с БСА для исключения неспецифического связывания; с антителами козы к IgG и IgM человека для подтверждения внесения исследуемого образца сыворотки крови; с IgG и IgM человека для подтверждения внесения конъюгата с флуорофором; а также ячейки с красителем Cy5 и Cy3, маркирующие границы анализируемой области.

Стеклянные слайды для изготовления иммуночипов обрабатывали концентрированной  $H_2SO_4$  и 10 М раствором NaOH, далее промывали водой, затем погружали в 1% раствор *Bind-silane* в этиловом спирте, отмывали в этиловом спирте, воде и высушивали. Полимеризационную смесь, содержащую гелеобразующие мономеры на основе метакриламида, а также подлежащие иммобилизации белки в концентрации 0,75 мг/мл, наносили с помощью робота *QArray* (*Genetix*, Великобритания) в виде микрокапель объемом 0,1 нл на поверхность активированной стеклянного слайда. Полимеризацию гелевых ячеек проводили под лампой ультрафиолетового света с длиной волны 350 нм (*Sylvania GTE lamp*, F15T8/350B1, Великобритания) на расстоянии 8 см от лампы, в течение 50 мин при 20 °С в токе азота. Иммуночипы после полимеризации отмывали в течение 40 мин раствором PBS-T (0,1 М фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1 % Tween 20 (по объему), pH 7,2), затем ополаскивали дистиллированной водой. Для уменьшения неспецифических взаимодействий иммуночипы обрабатывали блокирующим буфером – 1%-ым раствором поливинилового спирта в фосфатно-солевом буфере в течение 1 ч, а затем промывали дистиллированной водой.

Качество полученных иммуночипов проверяли в проходящем свете с помощью биочип-анализатора (ИМБ РАН), снабженного специальным программным обеспечением *TestChip* и *QualityControl* (ИМБ РАН, Россия). После этих процедур иммуночип закрывали пластиковой инкубационной камерой (Рисунок 13).

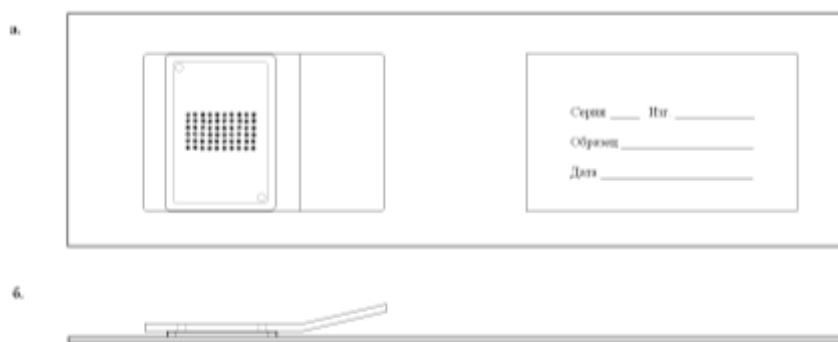


Рисунок 13 – Схема иммуночипа: а – вид сверху; б – вид сбоку

После печати полученная партия была протестирована на образцах сыворотки больных первичным, вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом. Исследуемые сыворотки разводили в соотношении 1:10 в 50 мМ фосфатном буфере с 0,1% БСА (по массе) и 0,05% Tween-20 (по объему) и вносили в камеру иммуночипа в объеме 60 мкл. После 12 ч инкубации (в течение ночи) при 37 °С иммуночипы промывали деионизированной водой, наносили разведение 1:2000 антител против иммуноглобулинов IgG и IgM человека, конъюгированных с флуоресцентными красителями Cy5 и Cy3, соответственно, в том же буфере, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После этого иммуночипы промывали деионизированной водой и высушивали в потоке воздуха. Визуализацию результатов исследования проводили на аппаратно-программном комплексе для анализа биочипов (ООО «Биочип ИМБ», Россия), регистрирующего интенсивность флуоресцентного сигнала флуорофоров Cy5 и Cy3.

### 2.2.5 Интерпретация результатов

Анализ диагностической ценности отдельных рекомбинантных антигенов *T. pallidum* проведен в соответствии с ГОСТ Р 53022.3—2008 «Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». Для интерпретации результатов определяли пороговый уровень оптического поглощения при длине волны 492 нм (в случае ИФА) или флуоресцентного сигнала при длине волны 670 нм (в случае иммуночипа), экспериментально рассчитанный на основе среднего значения для образцов сыворотки крови здоровых индивидов с поправкой  $+3\sigma$  (квадратичное отклонение для данной выборки). В дальнейшем «положительными» считали значения, превышающие указанные пороговые уровни более чем на 10 %; «отрицательными» – значения, составляющие менее 90 % от порогового значения оптической плотности. Случаи со значениями  $\pm 10$  % расценивали как сомнительные (серая зона диагностического исследования). Диагностические показатели вычисляли по формулам:

- чувствительность =  $\text{ИП}/(\text{ИП} + \text{ЛО}) * 100\%$  (1);
- специфичность =  $\text{ИО}/(\text{ИО} + \text{ЛП}) * 100\%$  (2);
- положительная предсказательная ценность =  $\text{ИП}/(\text{ИП} + \text{ЛП}) * 100\%$  (3);
- отрицательная предсказательная ценность =  $\text{ИО}/(\text{ИО} + \text{ЛО}) * 100\%$  (4);



– диагностическая эффективность =  $(\text{ИП} + \text{ИО}) / (\text{ИП} + \text{ЛО} + \text{ИО} + \text{ЛП}) * 100\%$  (5);

где ИП – истинно положительные результаты, ЛО – ложноотрицательные результаты, ИО – истинно отрицательные результаты, ЛП – ложноположительные результаты.

Различия между группами больных сифилисом, боррелиозом и здоровых индивидов было рассчитано по критерию Манна-Уитни для непарных выборок в программном обеспечении *Attestat (Microsoft Excel)*.

Многопараметрическая оценка дифференцирующей эффективности расширенной панели антигенов *T. pallidum* выполнена на основе линейного дискриминантного анализа с использованием пакета программ «*Statistica 8.0*» (*StatSoft*, Россия). Для решения задачи дифференциальной диагностики различных форм сифилиса в контексте серологических лабораторных исследований была проведена интегральная оценка интенсивности иммунного ответа на всю совокупность тестируемых антигенов. Проведение работ в данном направлении включало следующие этапы:

- проверка статистической независимости результатов с использованием различных рекомбинантных антигенов;
- определение значимости каждого антигена в дифференциальном анализе;
- расчет коэффициентов классификационных уравнений для каждого антигена в каждой дифференцируемой группе (форме сифилиса);
- оценка ранее полученных положительных и отрицательных результатов (первичных данных) в контексте разработанных классификационных уравнений;
- линейный дискриминантный анализ.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Биоинформатический анализ кандидатных антигенов *T. pallidum*

#### 3.1.1 Отбор новых кандидатных антигенов среди белков иммунопротеома *T. pallidum*

Для выявления новых специфических антигенов *T. pallidum* были проанализированы результаты исследований иммунопротеома *T. pallidum*, проведенных с использованием двух протеомных платформ: при серологическом скрининге библиотеки рекомбинантных белков *T. pallidum*, осуществленном М.В. Brinkman с соавт. [36], и серологическом скрининге нативных белков, разделенных методом двумерного электрофореза, представленном в работе М.А. McGill с соавт. [108].

Из проанализированных в указанных работах полипептидов *T. pallidum* (Рисунок 14, А и Б) были отобраны белки, серологическая реактивность которых в отношении сыворотки больных сифилисом была подтверждена обоими протеомными исследованиями в соответствии с опубликованными данными (Рисунок 14, В).

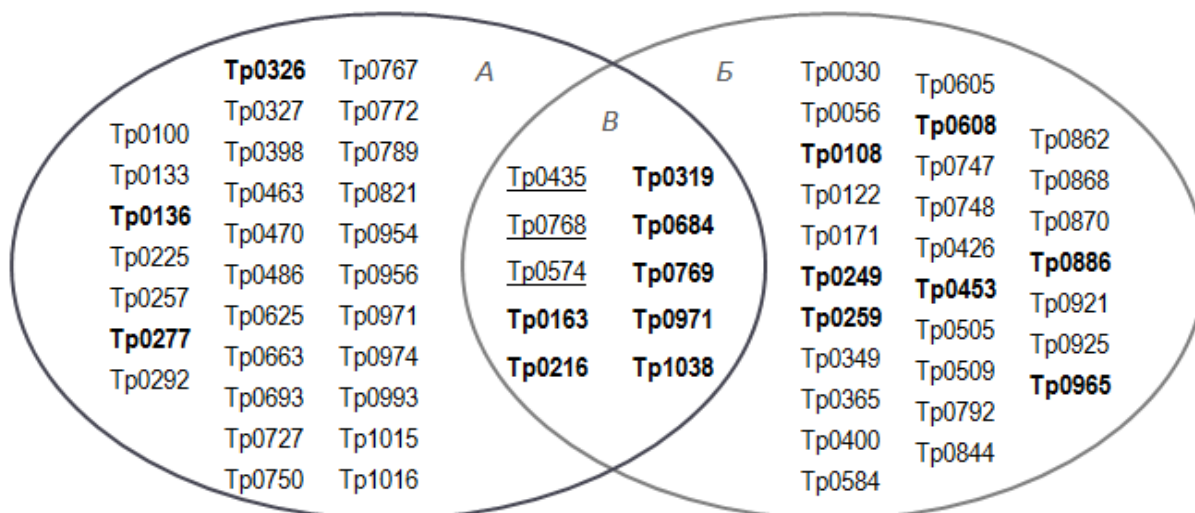


Рисунок 14 – Белки *T. pallidum*, проявляющие серореактивность с образцами сыворотки крови больных сифилисом: А – по данным серологического скрининга рекомбинантных экспрессионных библиотек *T. pallidum* [36]; Б – по данным серологического скрининга нативных белков *T. pallidum* [108]; В – белки, серореактивные в обоих протеомных исследованиях. Примечание: полужирным выделены белки, отобранные для дальнейшего изучения; подчеркнуты – белки, применяемые в клинической лабораторной диагностике сифилиса)

Среди 10 общих белков выявлено 3 белковых антигена *T. pallidum*, которые уже широко используются в составе иммуносорбентов в современных наборах реагентов для иммуноферментных исследований: Tr0435 (TrN17), Tr0574 (TrN47), Tr0768 (TrpA, TrN44,5), в связи с чем они были исключены из исследования. Оставшиеся 7 белков были включены в дальнейший анализ.

Кроме этого в число потенциальных антигенов *T. pallidum*, отобранных для исследования, были включены 10 белков, среди которых было 7 белков с описанной экспрессией в клетках *T. pallidum* и выявленной серореактивностью в отношении сыворотки крови больных сифилисом на различных стадиях инфекционного процесса (Tr0108, Tr0249, Tr0259, Tr0453, Tr0608, Tr0886 и Tr0965) (Рисунок 14, Б), а также еще 3 белка: Tr0136, Tr0277 и Tr0326 (Рисунок 14, В).

Белок Tr0326 был выбран как единственный белок *T. palladium*, гомологичный известным белкам наружной мембраны других грамотрицательных микроорганизмов. Белок Tr0136 характеризуется способностью к связыванию с человеческим фибронектином, что свидетельствует о его потенциальном участии во взаимодействии микроорганизма с внеклеточным матриксом человека и важной роли в патогенезе сифилиса. Tr0277 описан как С-терминальная пептидаза и для него показана высокая серореактивность в случае поздних скрытых форм сифилиса [37, 38, 39].

В итоге на основании результатов серологического скрининга для дальнейшего исследования было отобрано 17 белков *T. pallidum* (Таблица 6).

Таблица 6 – Список белков *T. pallidum*, отобранных для биоинформатического анализа

ОРС	№ GenBank	Предполагаемая функция и/или локализация белка
Tr0108**	TP_RS00545	б-фосфофруктокиназа (АТФ-зависимая)
Tr0136**	TP_RS00710	Гипотетический белок
Tr0163*	TP_RS00845	АВС переносчик (TroA)
Tr0216*	TP_RS01095	Молекулярный шаперон (DnaK)
Tr0249**	TP_RS01280	Белок флагеллярных филаментов (FlaA1)
Tr0259**	TP_RS01325	Связывающий пептидоглюкан протеин (LysM)
Tr0277**	TP_RS01430	С-терминальная пептидаза S41
Tr0319*	TP_RS01595	Гипотетический белок
Tr0326**	TP_RS01625	Белок внешней мембраны

Продолжение таблицы 6.

ОРС	№ GenBank	Предполагаемая функция и/или локализация белка
Tr0453**	TP_RS02260	Мембранный белок
Tr0608**	TP_RS03070	Гипотетический белок
Tr0684*	TP_RS03470	Глюзо /галактозосвязывающий белок (MglB-2)
Tr0769*	TP_RS03880	Мембранный белок В (TmpB)
Tr0886**	TP_RS04440	Полинуклеотидфосфорилаза (Pnp)
Tr0965**	TP_RS04835	Мембранный белок
Tr0971*	TP_RS04860	Лактоферрин-связывающий белок (Tr34, TrD)
Tr1038*	TP_RS05220	Бактериоферритин (TrF1, антиген c1-5, 4D)

Примечание – \*Белки, для которых показана иммунореактивность в обоих использованных протеомных методах [36, 108]; \*\*Белки, которые выявлялись лишь в одном из методов протеомных исследований, но для которых показана иммуногенность в других работах

### 3.1.2 Характеристика субклеточной локализации исследуемых белков *T. pallidum*

По результатам предсказания локализации антигена в клетке (по алгоритмам *PSORTb* и *CELLO*) цитоплазматическое расположение было установлено обеими программами для 7 белков: Tr0108, Tr0216, Tr0259, Tr0277, Tr0608, Tr0886 и Tr1038. Белок Tr0326 был охарактеризован в качестве белка наружной мембраны, а белок Tr0136 определялся обеими программами как секретлируемый (Таблица 7).

Локализация белка Tr0277, определенная по результатам исследования как цитоплазматическая, по некоторым данным описана как периплазматическая<sup>3</sup>, однако базы данных *NCBI* и *UniProt* не уточняют клеточную локализацию данного белка.

Tr0965 был определен программами *PSORTb* и *CELLO* как цитоплазматический, для белка Tr0249 анализ структуры программой *CELLO* выявил цитоплазматическую локализацию, программой *PSORTb* - периплазматическую. При этом комплексный анализ последовательности этих белков выявил структурные особенности, которые не позволяют отнести их к цитоплазматическим белкам. В структуре белка Tr0249 было установлено наличие сигнальной последовательности, что характеризует данный белок как предшественника мембранных белков. Кроме того, аминокислотная последователь-

<sup>3</sup> [http://www.pathogenomics.sfu.ca/pathogen-associated/genomes/NC\\_000919.tab](http://www.pathogenomics.sfu.ca/pathogen-associated/genomes/NC_000919.tab)

ность белка Tr0249 имеет свыше 70 % сходства с последовательностью белка флагеллиновых филаментов FlaA родственных спирохет, для которых характерно периплазматическое расположение. Отсутствие  $\beta$ -складчатых структур по данным анализа последовательности этих белков не позволяет рассматривать их в качестве белков наружной мембраны. Результаты поиска схожих белковых последовательностей белков по базам данных при помощи программы *PSI-BLAST* показали, что последовательность белка Tr0965 обладает высоким уровнем сходства с последовательностью связанных с цитоплазматической мембраной периплазматических субъединиц бактериальных транспортеров семейства *RND* грамотрицательных микроорганизмов.

Несоответствие результатов биоинформатического анализа клеточной локализации белков Tr0249 и Tr0965 может объясняться тем, что биоинформатические программы *PSORTb* и *CELLO*, разработанные для предсказания клеточной локализации белков, создавались на основе знаний о структуре белков наиболее изученного грамотрицательного микроорганизма – *E. coli* и не учитывали особенностей системы трансмембранного переноса белков *T. pallidum*. Таким образом, комплексный анализ последовательностей белков Tr0249 и Tr0965 позволил определить их локализацию на цитоплазматической мембране, в периплазматическом пространстве клетки *T. pallidum*.

В отношении белков Tr0163, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0769 и Tr0971 предсказанные программами *PSORTb* и *CELLO* внутриклеточные локализации не совпадали между собой или идентифицировались только одной из программ. С учетом этого для повышения точности результатов анализа учитывалось также наличие сигнальных последовательностей,  $\alpha$ -спиральных участков и  $\beta$ -складчатых структур (Таблица 7). Кроме этого при установлении расположения белка в клетке применялся поиск гомологичных белков других микроорганизмов с известной локализацией.

Считается, что  $\beta$ -складчатые структуры являются универсальной характеристикой расположения бактериальных белков на наружной мембране [49], поэтому в ходе биоинформатического анализа последовательностей белков с иммуногенными свойствами и локализацией на наружной мембране для них определяли наличие  $\beta$ -складчатых структур с помощью серверов *BOMP*, *TMBETADISC*. Среди 17 антигенов возбудителя сифилитической инфекции, первично отобранных для биоинформатического анализа, присутствие  $\beta$ -складчатых структур было обнаружено только для белков Tr0326 и Tr0453.

Таблица 7 – Результаты биоинформатического анализа белков *T. pallidum*

Номер открытой рамки считывания	Клеточная локализация		Локализация на наружной мембране (наличие $\beta$ -складок)		Количество $\alpha$ -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>		
Tr0108	Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0136	Секр.	Секр.	–	–	1	+	–	+	Цитопл. мембр.	–
Tr0163	Цит. мембр.	Цитопл.	–	–	0	+	++	+	Цитопл. мембр.	–
Tr0216	Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0249	Перипл.	Цитопл.	–	–	0	+	–	–	Цитопл. мембр.	–
Tr0259	Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	+
Tr0277	Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0319	Цит. мембр.	Цитопл.	–	–	0	+	+	+	Цитопл. мембр.	–
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. мембр.	–
Tr0769	Неизв.	Цит./нар. мембр.	–	–	0	+	–	–	Наружн. м.	–
Tr0886	Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–
Tr0965	Цитопл.	Цитопл.	–	–	1	–	–	–	Цитопл. мембр.	–
Tr0971	Цитопл.	Перипл./цитопл.	–	–	0	+	++	+	Цитопл. мембр.	–
Tr1038	Цитопл.	Цитопл.	–	–	0	–	–	–	Цитоплазма	–

Вместе с этим для указанных белков было установлено присутствие множественных трансмембранных  $\alpha$ -спиральных областей. Дополнительное изучение данных научной литературы позволило выявить экспериментальные доказательства расположения белков Tr0326 и Tr0453 на наружной мембране [49], что подтвердило эффективность используемых биоинформатических подходов.

Согласно литературным данным вероятность локализации белков со значительным количеством предсказанных  $\alpha$ -спиральных участков на наружной мембране невелика [50], поэтому наличие в последовательности белка предсказанных  $\alpha$ -спиральных участков позволяет рассматривать его как белок цитоплазматической мембраны. Использование программы *TННММ* показало наличие единичных трансмембранных  $\alpha$ -спиральных участков для 5 из 17 белков *T. pallidum* (Tr0136, Tr0326, Tr0453, Tr0608 и Tr0965). Таким образом, для этих белков не исключалась вероятность локализации на наружной или цитоплазматической мембране микроорганизма, так как отсутствие в структуре белка нескольких  $\alpha$ -спиральных участков указывает на возможность их транспорта через цитоплазматическую мембрану [138].

### ***3.1.3 Наличие сигнального пептида в структуре исследуемых белков *T. pallidum****

Наличие сигнального пептида является характерной особенностью предшественников мембранных белков; при этом сигнальные пептиды специфических классов секретруемых белков распознаются различными сигнальными пептидазами. Цистеин обязательно присутствует в составе сигнальной последовательности липопротеинов и является местом присоединения жирных кислот [147]. По результатам исследований с помощью сервера *SignalP 4.0* присутствие сигнального пептида было установлено для 9 из 17 изучавшихся белков *T. pallidum* (Tr0136, Tr0163, Tr0249, Tr0319, Tr0326, Tr0453, Tr0684, Tr0769 и Tr0971), что указывало на вероятный экспорт указанных белков через цитоплазматическую мембрану.

Исследование сигнальных последовательностей и гомологии белков *T. pallidum* с известными мембранными белками показало, что подобными характерными структурными особенностями белков цитоплазматической мембраны обладали 8 белков: белки Tr0136, Tr0163, Tr0249, Tr0319, Tr0769, Tr0684, Tr0965 и Tr0971. Для 5 из 9 предсказанных белков цитоплазматической мембраны (Tr0136, Tr0163, Tr0319, Tr0684,

Tr0971) также были обнаружены сайты липидирования, что позволяет предположить липопротеиновую природу этих антигенов.

Для белков, которые были определены как цитоплазматические (Tr0108, Tr0216, Tr0259, Tr0277, Tr0608, Tr0886 и Tr1038), сигнальные последовательности не были выявлены, что вместе с отсутствием сайтов липидирования (Таблица 8) служит подтверждением их цитоплазматической локализации.

### 3.1.4 Выявление остатков жирных кислот в структуре белка

Наличие в составе молекулы остатков жирных кислот является одной из важных особенностей бактериальных антигенов, поскольку липидные остатки в составе липопротеинов значительно усиливают иммунный ответ организма хозяина [65]. Для предсказания сайтов липидирования исследуемых белков были использованы программы *LipoP* и *UiB Lipo*. Обнаружение сайтов липидирования (липо-боксов) в структуре 17 отобранных белков с применением программы *LipoP* показало, что характерными участками для жирно-кислотных радикалов обладали 6 белков *T. pallidum* (Таблица 8), однако программа *UiB Lipo* смог определить наличие сайтов липидирования только в 4 из них. Для верификации полученных результатов была проведена визуальная проверка последовательности белков, определенных программой *LipoP* как липопротеины (Рисунок 15).

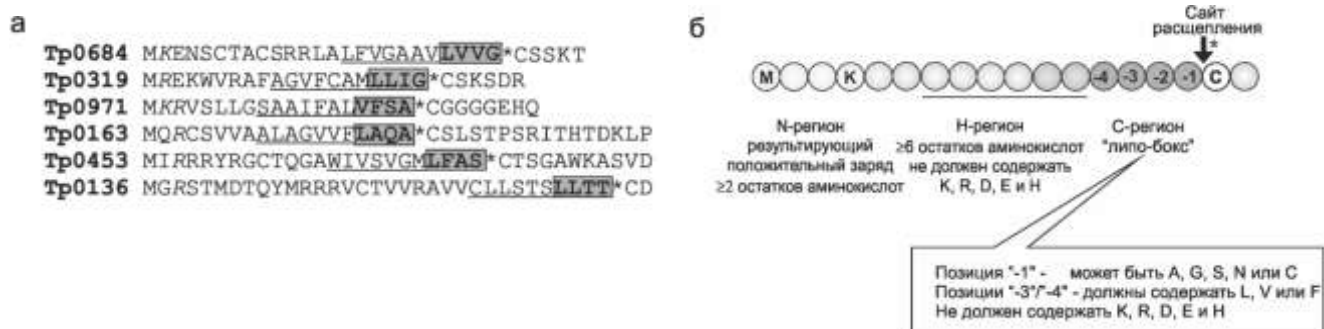


Рисунок 15 – Сравнение N-концевых последовательностей белков *T. pallidum* с консенсусной структурой липо-боксов спирохет: а - N-концевые последовательности белков *T. pallidum*, определенные программой *LipoP* как липопротеины; б - схема организации липо-боксов липопротеинов спирохет [65]

Полученные данные позволили установить, что N-концевые участки этих белков содержат аминокислотный мотив, характерный для липо-боксов спирохет [65]. Таким об-



разом, в результате проведенного биоинформатического анализа было установлено, что последовательности 6 белков (Tr0136, Tr0163, Tr0319, Tr0453, Tr0684, Tr0971) обладают структурой, характерной для липопротеинов спирохет.

В результате комплексного анализа последовательностей 17 отобранных для изучения белков *T. pallidum* 3 белка (Tr0326, Tr0453 и Tr0769) были определены как белки наружной мембраны, для 7 белков (Tr0136, Tr0163, Tr0249, Tr0319, Tr0684, Tr0965 и Tr0971) была предсказана локализация на цитоплазматической мембране и для 7 белков (Tr0108, Tr0216, Tr0259, Tr0277, Tr0608, Tr0886 и Tr1038) была установлена цитоплазматическая локализация.

### **3.1.5 Анализ специфичности выявленных белков *T. pallidum* для микроорганизмов порядка *Spirochaetales* и рода *Treponema***

Анализ специфичности исследуемых белков *T. pallidum* для микроорганизмов порядка *Spirochaetales* и рода *Treponema* проводился с использованием базы данных Национальной лаборатории Лос-Аламоса, США [<http://stdgen.northwestern.edu/>] на основании первичной структуры. Из всех 17 белков специфическими для микроорганизмов порядка *Spirochaetales* оказались белки Tr0259, Tr0453, Tr0608, для микроорганизмов рода *Treponema* специфическими были только белки Tr0453 и Tr0608. Учитывая такие показатели, как специфичность белков для порядка *Spirochaetales* и рода *Treponema*, кандидатами для изучения могут являться белки Tr0259, Tr0453, Tr0608. Однако при оценке специфичности антигенов в иммунологических исследованиях следует учитывать не только их первичную структуру, но и пространственное расположение антигенных эпитопов, что возможно проверить при экспериментальном изучении этих белков.

### **3.2 Получение новых целевых рекомбинантных антигенов *T. pallidum* для серодиагностики сифилиса**

В результате проведенного биоинформатического анализа были отобраны белки с различными структурными характеристиками, которые в дальнейшем были включены в разработку и серологическое исследование на образцах сыворотки крови больных сифилисом и здоровых индивидов (Таблица 8).

Таблица 8 – Предварительная характеристика кандидатных антигенов *T. pallidum*

Обозначение по номеру ОРС Другие названия	<b>Тр0277</b>	<b>Тр0319</b>	<b>Тр0453</b>	<b>Тр0684</b>	<b>Тр0965</b>	<b>Тр1038</b>
Актуальная номенклатура	Prc	TmpC, PnrA	-	MglB-2	macA	ТрF1
	TP_RS01430	TP_RS01595	TP_RS02260	TP_RS03470	TP_RS04835	TPASS_RS05210
<b>Мол. масса, кДа</b>	50,317	37,769	31,986	43,052	33,969	19,361
<b>Описанная локализация в клетке</b>	Периплазматическая локализация	Липопротеин, связанный с внутренней мембраной липидным якорем	Белок, ассоциированный с внешней мембраной	Периплазма/ внутренняя мембрана, прикрепление через липидный якорь	Локализуется на внутренней мембране, содержит один $\alpha$ -спиральный трансмембр. домен	Белок, ассоциированный с внутренней мембраной со стороны цитоплазмы
<b>Описанная функция</b>	C-терминальная пептидаза S41A.	Рецептор и транспортер пуриновых нуклеозидов через мембрану, возможно в составе ABC-системы переноса.	Предположительно участвует в транспорте липидов и гликолипидов через наружную мембрану, изменяет проницаемость мембраны.	АТФ-зависимый транспортер глюкозы и галактозы, обнаружено сходство с глюкозо/ галактозо-связывающим MglB белком <i>E.coli</i> .	Транспортный белок, участвует в активации клеток эндотелия и регуляции проницаемости эндотелиального барьера.	Бактериоферритин, обладает ферроксидазной активностью. Кристаллическая структура сходна с другими ферритинами семейства Dps ( <i>DNA protection complex</i> ).
<b>Описанная серореактивность по данным литературы</b>	В 4,3 раза превышение уровня специфических антител в группе позднего скрытого сифилиса по сравнению с группой здоровых индивидов. PMC1393150	В 2,8-6,2 раза превышение уровня специфических антител по сравнению с группой здоровых индивидов. PMC1393150	Чувствительность 98% и специфичность 100% в диагностических тестах. PMID: 23100335	«+++» серореактивность на образцах сыворотки больных сифилисом. PubMed: 20385758 В 6,8-19,0 раза превышение уровня спец. антител по сравнению с группой здоровых. PMC1393150	«++» серореактивность на образцах сыворотки больных сифилисом. PMID: 20385758	Чувствительность 95,9% и специфичность 98,9%. PMID: 26607421
<b>Ссылки на публикации</b>	PMC:1393150	PMID:16418175 PMC: 5421087	PMID: 12904373 PMID: 16159783 PMID: 23100335	PMC: 4990184 PMID: 27536942 PMID: 8921855	PMID: 25514584	PMID: 21709157 PMID: 26607421 PMID: 16345079

### 3.2.1 Создание экспрессионных систем, содержащих гены целевых белков

#### *T. pallidum*

На первом этапе создания экспрессионных систем была проведена амплификация кодирующих последовательностей генов *tp0453*, *tp0319*, *tp1038*, *tp0965*, *tp0277* и *tp0684* с помощью разработанных праймеров (Таблица 9).

Таблица 9 – Последовательности праймеров, использованных для амплификации целевых генов *T. pallidum* штамм *Nichols* и длина соответствующих ПЦР-продуктов

Название	Последовательность 5'-3'	Длина ПЦР-продукта (п.о.)
Tr0277_F_NdeI	AATCATATGCAGACGGTGCAGGATGTCTAC	1347
Tr0277_R_HindIII	TTTAAGCTTTCAAGATACCTTCTTTTTTTCCTGT	
Tr0319_F_NdeI	TATCATATGGACAGGCCGCAGATGGGAAAC	1080
Tr0319_R_XhoI	TTTCTCGAGTGTTTCATCATGCGTGCAGATCG	
Tr0453_F_NdeI	GTTCATATGGCATCAGTAGATCCGTTGGGG	880
Tr0453_R_BamHI	TGTGGATCCCGAACTTCCCTTTTTGGAGTACAA	
Tr0684_F_NdeI	TTTCATATGGCGGTGCTTGTGGTAGGCTGT	1212
Tr0684_R_HindIII	TTTAAGCTTGGTATTTGAGCTTGTCTGTATAG	
Tr0965_F_NdeI	TTTCATATGCTGCGTCGGGTTCCGCCG	980
Tr0965_R_XhoI	TTTCTCGAGTTTTCCCTCGCTGCACTTTGGTC	
Tr01038_F_NdeI	GGGCATATGAACATGTGTACAGATGGAAAAAAA	550
Tr01038_R_XhoI	TTTCTCGAGTCAGGCTTTCAGGGTAGCAC	

Примечание – подчеркнуты сайты расщепления рестрикционных эндонуклеаз

Наличие ПЦР-продукта было подтверждено для всех указанных генов наличием ДНК-фрагментов соответствующей длины в агарозном гель-электрофорезе. После очистки полученных фрагментов от компонентов реакционной смеси и проведения рестрикции по сайтам, заложенным в последовательности праймеров, полученные линейные фрагменты ДНК были визуализированы в агарозном геле с помощью дополнительного электрофореза в качестве подготовительного этапа для лигирования целевых кодирующих последовательностей в экспрессионный вектор pET28a(+) (Рисунок 16).

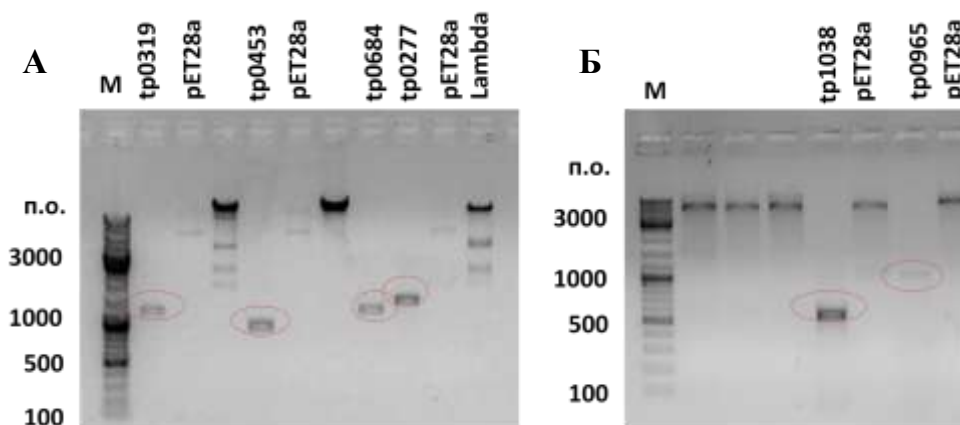


Рисунок 16 – Результаты гель-электрофореза продуктов ПЦР, кодирующих последовательности генов *tp0453*, *tp0319*, *tp0277*, *tp0684* (А) и *tp1038*, *tp0965* (Б) *T. pallidum*, вектора pET28a(+) и геномной ДНК фага лямбда (в качестве контроля) после рестрикции эндонуклеазами. М – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК (отмечены 100, 500, 1000 и 3000 п.о.)

После лигирования кодирующих последовательностей в вектор pET28a(+) компетентные клетки *E. coli* TOP10 трансформировали полученными системами и проводили отбор единичных колоний, которые далее анализировали с помощью ПЦР и секвенирования по Сенгеру (Рисунок 17).

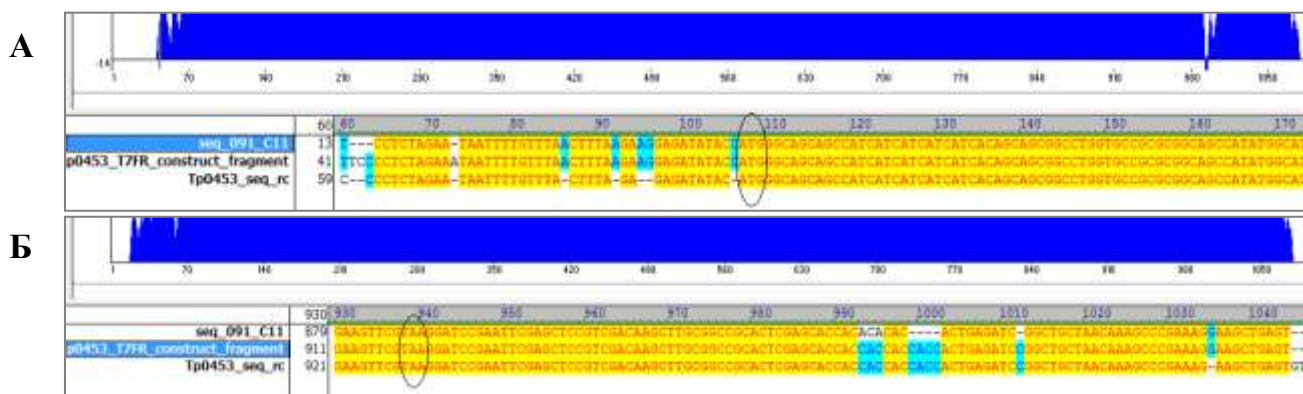


Рисунок 17 – Подтверждение (на примере белка Trp0453) вставки кодирующей последовательности (гена *tp0453*) в структуру экспрессионного вектора по результатам секвенирования по Сенгеру. Приведено выравнивание трех последовательностей (сверху вниз): 1) результат секвенирования полученного клона с праймера T7F; 2) референсная последовательность вставки гена *tp0453* в вектор pET28a; 3) результат секвенирования (обратная комплементарная цепь) полученного клона с праймера T7R. А - 5'-концевой фрагмент; Б - 3'-концевой фрагмент. Черным обведены старт- и стоп-кодоны (ATG и TAA, соответственно), фланкирующие кодирующую часть гена

Положительным результатом ПЦР считалось наличие фрагментов соответствующей длины с использованием как специфических, так и общих (к регионам T7 промотора и терминатора) праймеров. Результат секвенирования подтверждал точность встраивания кодирующего фрагмента по сайтам рестрикции и отсутствие сдвига рамки считывания в анализируемой экспрессионной системе. Все применяемые далее системы были подтверждены двумя указанными методами.

Штаммы-продуценты BL-21(DE3)-Tp0453, BL-21(DE3)-Tp0319, BL-21(DE3)-Tp1038, BL-21(DE3)-Tp0965, BL-21(DE3)pLysS-Tp0277 и BL-21(DE3)pLysS-Tp0684 были получены путем трансформации компетентных клеток *E. coli* BL-21(DE3) и BL-21(DE3)pLysS соответствующими экспрессионными системами (Рисунок 18).

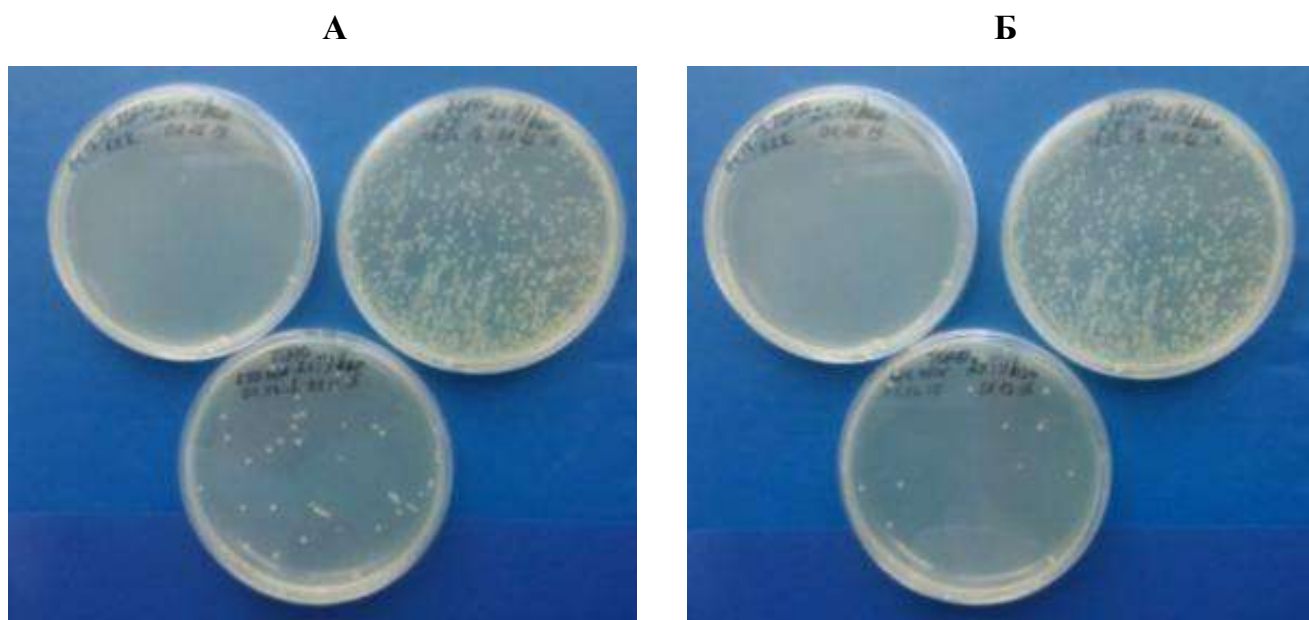


Рисунок 18 – Результаты трансформации компетентных клеток *E. coli* TOP10 генетическими конструкциями на примере фрагментов генов *tp0277* (А) и *tp0684* (Б) вместе с положительным и отрицательным контролем трансформации (верхняя правая и верхняя левая чашки Петри, соответственно)

Для определения целевых рекомбинантных белков в клетках указанных штаммов-продуцентов провели пробную индукцию, в ходе которой клеточный осадок культуры до и после индукции анализировали методом денатурирующего гель-электрофореза в ПААГ (Рисунок 19).

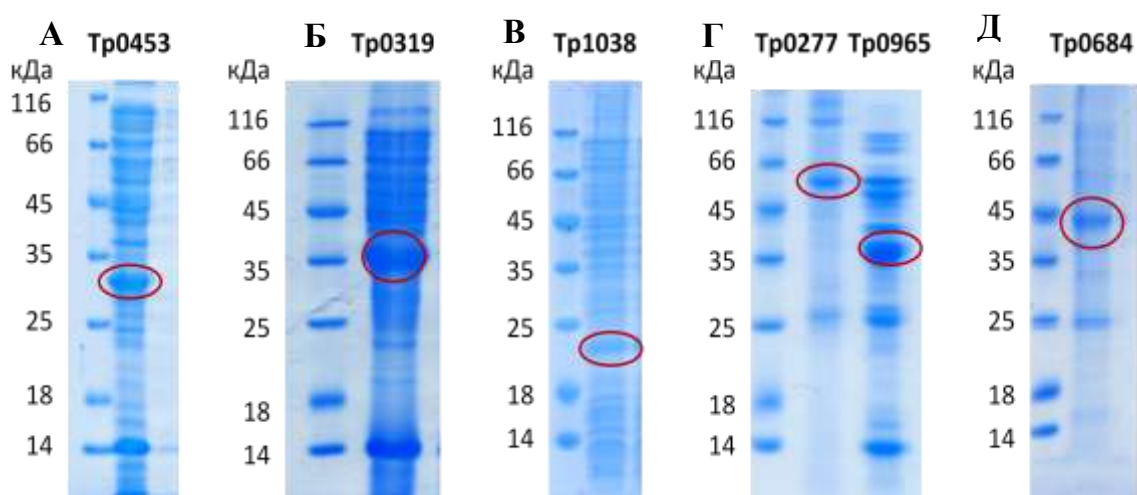


Рисунок 19 – Подтверждение экспрессии целевых белков в штаммах-продуцентах. А – BL-21(DE3)-Trp0453, Б – BL-21(DE3)-Trp0319, В – BL-21(DE3)-Trp1038, Г – BL-21(DE3)-Trp0965, BL-21(DE3)pLysS-Trp0277, Д – BL-21(DE3)pLysS-Trp0684. В левом столбце указан маркер молекулярной массы (кДа)

Наличие преобладающего белкового продукта соответствующей молекулярной массы стало подтверждением успешной трансформации и применяемых условий экспрессии.

Каждый штамм-продуцент рекомбинантных белков был проверен на соответствие экспрессируемого продукта целевому антигену *T. pallidum* с применением метода масс-спектрометрии (*MALDI-TOF MS*). В результате проведенного анализа для каждого образца был получен набор масс-спектров, которые сравнивали с эталонными масс-спектрами базы данных *SwissProt* в программном обеспечении *Mascot*. На основании подобного сравнения были получены значения «Score» для каждого анализируемого образца, который позволил провести идентификацию белков (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты идентификации рекомбинантных белков *T. pallidum*

Белок	Мол. масса	Значение «Score»	Идентификация
Trp0453	31,9 кДа	154	<i>membrane protein [Treponema pallidum]</i>
Trp0319	34,0 кДа	116	<i>Chain A, Pnra From T. Pallidum As Purified From E.coli</i>
Trp1038	23,5 кДа	136	<i>antigen TpF1 [T. pallidum subsp. pallidum str. Chicago]</i>
Trp0965	35,3 кДа	128	<i>membrane protein [Treponema pallidum]</i>
Trp0277	50,28 кДа	177	<i>peptidase S41 [Treponema pallidum]</i>
Trp0684	43,02 кДа	119	<i>glucose/galactose-binding lipoprotein [T. pallidum]</i>

Из приведенных на рисунке 20 графиков распределения значений «Score» видно, что максимальные значения для каждого из белков значительно отличаются от минорных, которые не считаются достоверными (выделенная область значений), и не соответствуют исследуемым белкам по идентификации *Mascot*.

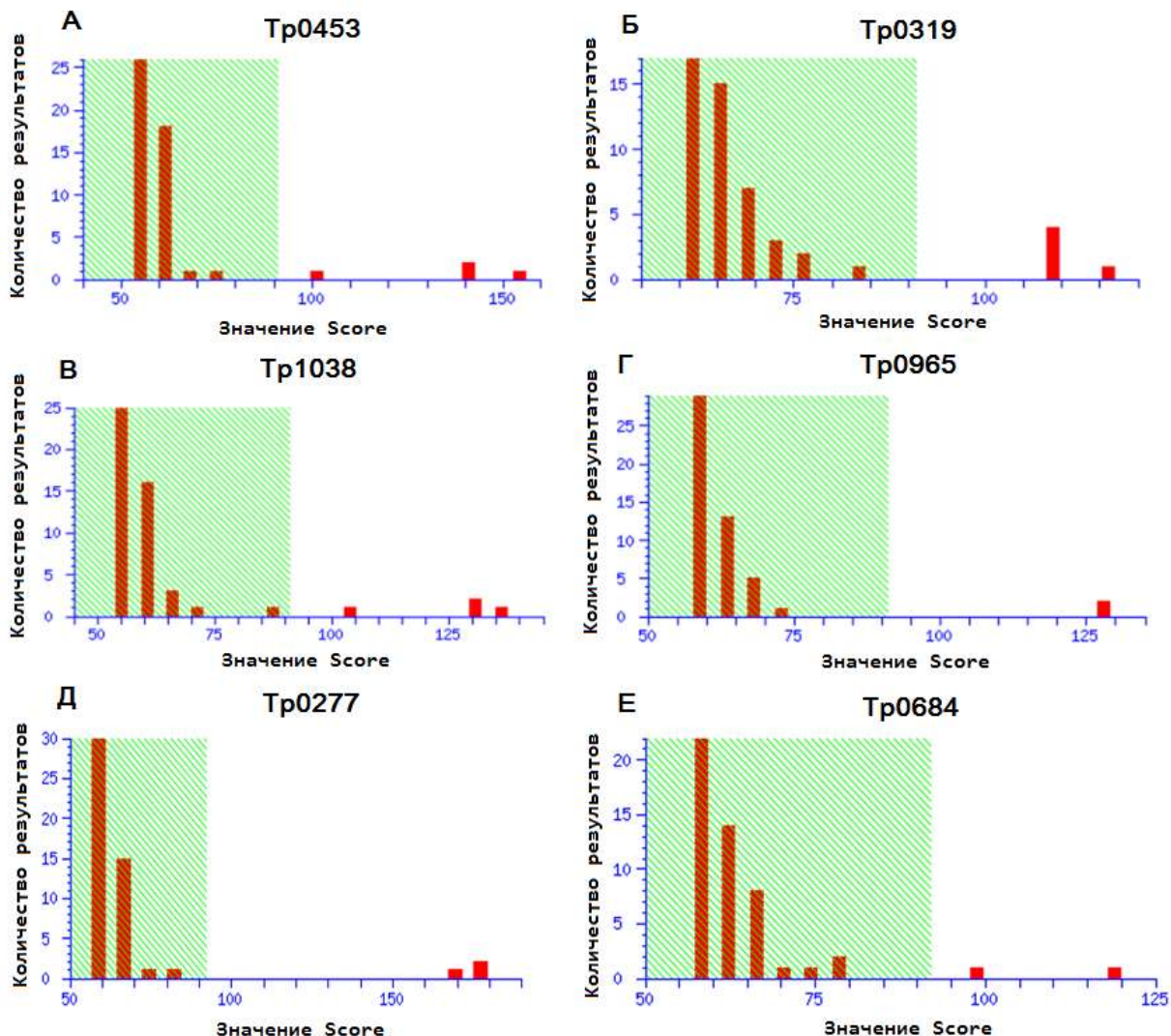


Рисунок 20 – Графики распределения значений «Score» по результатам масс-спектрометрии рекомбинантных белков *T. pallidum*

Таким образом, результаты масс-спектрометрического анализа подтвердили пептидный профиль анализируемых рекомбинантных белков, доказав их соответствие целевым белкам Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0965, Tr0277 и Tr0684 *T. pallidum*.

### 3.2.2 Выделение и очистка целевых рекомбинантных белков *T. pallidum*

После подтверждения последовательности рекомбинантных белков с помощью масс-спектрометрии каждый из них был экспрессирован в культуре соответствующего

штамма-продуцента и очищен хроматографическими методами. Полученные фракции после проведения металл-хелатной хроматографии анализировали в денатурирующем гель-электрофорезе (Рисунок 21).

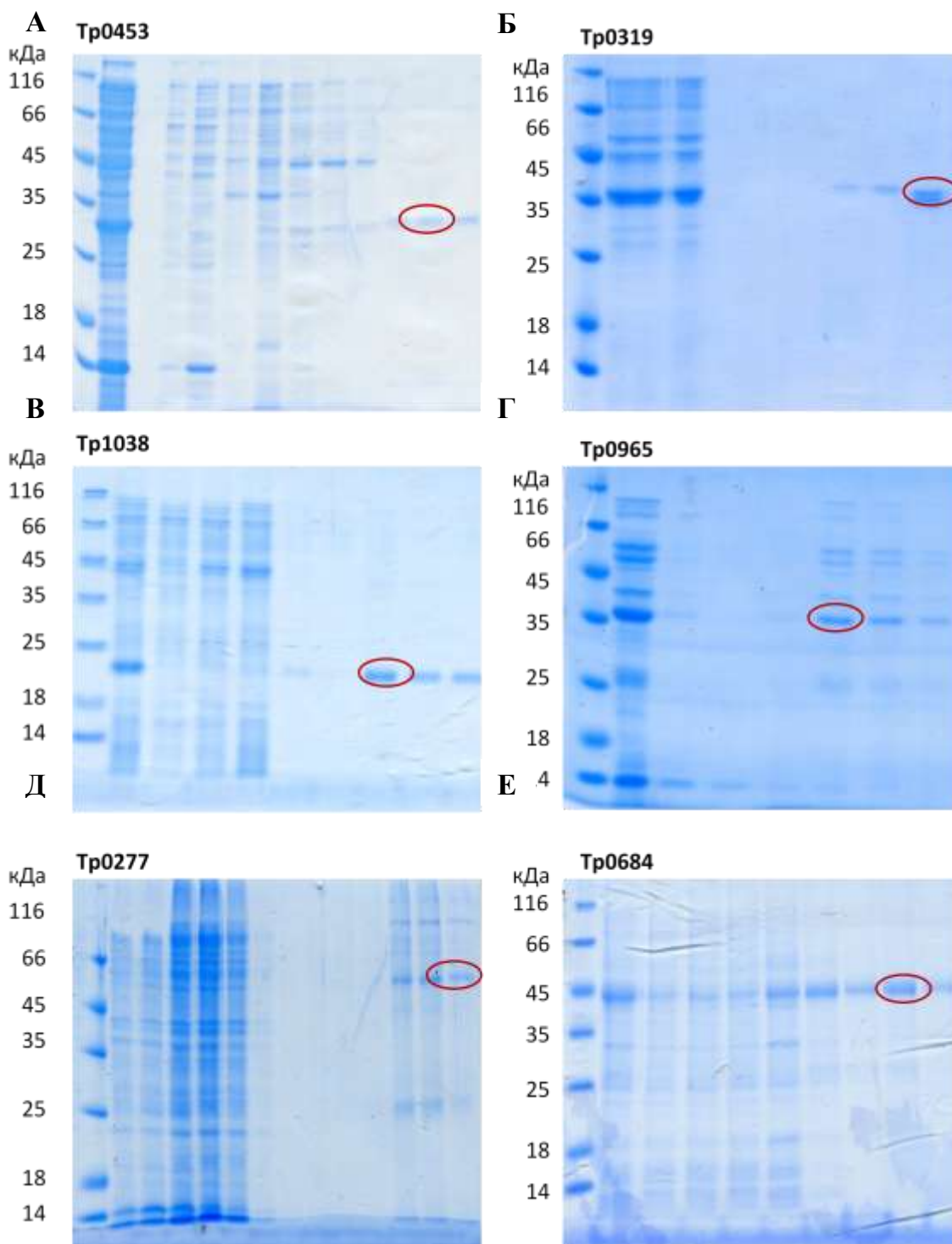


Рисунок 21 – Результаты хроматографической очистки рекомбинантных белков *T. pallidum*. В левом столбце указан маркер молекулярной массы (кДа). А – график результатов анализа белка Tr0453, Б – Tr0319; В – Tr1038; Г – Tr0965; Д – Tr0277; Е – Tr0684



Фракции, содержащие целевой белок в гомогенном состоянии, объединяли, диализовали против соответствующего буфера без имидазола, концентрировали в фильтровальных колонках с пределом отсечения 10 кДа (Рисунок 22).

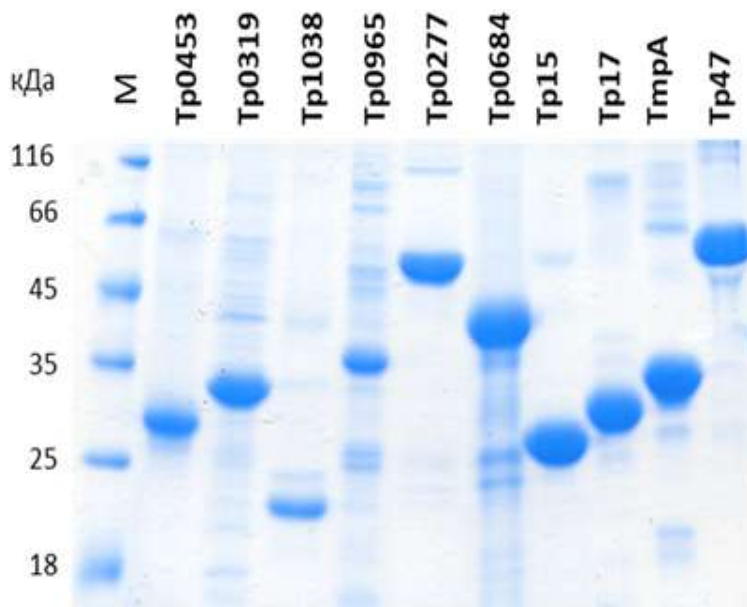


Рисунок 22 – Фракции рекомбинантных белков *T. pallidum* Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0965, Tr0277, Tr0684 и коммерческих рекомбинантных белков Tr15, Tr17, Tr47, TrpA. В левом столбце указан маркер молекулярной массы (кДа)

Продуктивность штаммов-продуцентов характеризовали путем определения удельного количества синтезируемого полипептида после его очистки с помощью металл-хелатной хроматографии и измерения концентрации полученного рекомбинантного белка по методу Бредфорд в пересчете на 1 г клеток осажденной культуры штамма-продуцента. Продуктивность разработанных штаммов имела следующие значения:

- для BL-21(DE3)-Tr0453 составила 0,312 мг/1 г клеток;
- для BL-21(DE3)-Tr0319 составила 0,450 мг/1 г клеток;
- для BL-21(DE3)-Tr1038 составила 0,162 мг/1 г клеток;
- для BL-21(DE3)-Tr0965 составила 0,275 мг/1 г клеток;
- для BL-21(DE3)pLysS-Tr0277 составила 0,375 мг/1 г клеток;
- для BL-21(DE3)pLysS-Tr0684 составила 0,300 мг/1 г клеток.

### 3.3 Оценка диагностических характеристик рекомбинантных белков *T. pallidum*

Предварительный анализ возможности диагностического использования каждого из разработанных рекомбинантных белков *T. pallidum* проводили с использованием технологии иммуноферментного анализа (ИФА) на примере групп больных сифилисом ( $n = 85$ ), боррелиозом ( $n = 10$ ) и здоровых индивидов ( $n = 46$ ). Окончательную оценку диагностической эффективности использования каждого рекомбинантного белка проводили с использованием реакции прямой иммунофлуоресценции (нРИФ) на примере образцов сыворотки крови пациентов с первичным ( $n = 11$ ), вторичным ( $n = 21$ ), ранним скрытым ( $n = 24$ ) и поздним скрытым сифилисом ( $n = 29$ ) в сравнении с сыворотками, оцененными как «отрицательные» в комплексе традиционных серологических реакций ( $n = 46$ ).

В соответствии с действующими рекомендациями для интерпретации результатов предварительно определяли пороговый уровень оптического поглощения при длине волны 492 нм (для ИФА) или интенсивность флуоресценции при длине волны 670 нм (для нРИФ), экспериментально рассчитанный на основе среднего значения для образцов сыворотки крови здоровых индивидов с поправкой  $+3\sigma$  (квадратичное отклонение для данной выборки). В результате «положительными» считали значения, превышающие указанные пороговые уровни более чем на 10 %, а «отрицательными» – значения, составляющие менее 90 % от порогового значения оптической плотности. Случаи со значениями  $\pm 10$  % расценивали как сомнительные, т. е. как серую зону диагностического исследования. Различия между группами больных сифилисом, боррелиозом и здоровых индивидов на данном этапе было рассчитано по критерию Манна–Уитни для непарных выборок.

**Рекомбинантный антиген Tr0277 *T. pallidum*.** Исследование антител к антигену Tr0277 методом ИФА показало наличие большого процента результатов серой зоны в группе больных сифилисом (38,5 %) и в группе здоровых индивидов (20,0 %), однако большая часть результатов была положительной в группе больных сифилисом (59,0 %) или же была отрицательной в группе здоровых индивидов (80,0 %). Сигналы в группе больных боррелиозом были отрицательными в 100 % случаев (Рисунок 23). С учетом только 2,5 % ложноотрицательных результатов и отсутствием ложноположительных сигналов белок Tr0277 был включен в дальнейшие исследования.

### Распределение результатов ИФА для антигена Tr0277 (%)

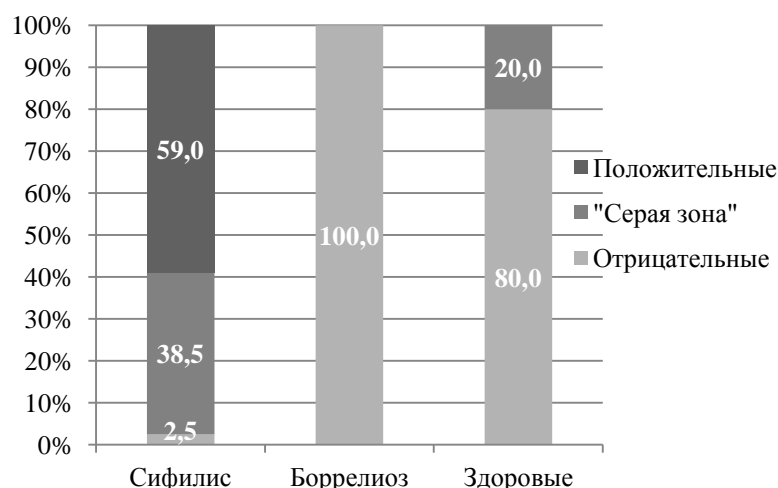


Рисунок 23 – Процентное соотношение полученных результатов исследования в группах больных сифилисом, больных боррелиозом и здоровых индивидов с белком Tr0277 в качестве антигена *T. pallidum*

Полученные результаты позволили расценивать белок Tr0277 в качестве перспективного антигена для дальнейшей разработки методом нРИФ. Данные флуоресцентных сигналов для данного белка представлены на рисунке 24.

### Распределение результатов нРИФ для антигена Tr0277

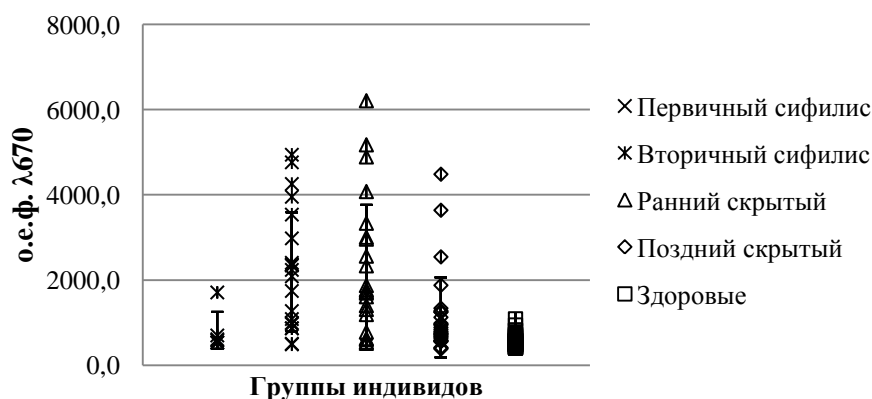


Рисунок 24 – График распределения флуоресцентного сигнала по группам исследуемых пациентов в отношении антигена Tr0277 *T. pallidum*

Результаты нРИФ с применением рекомбинантного белка Tr0277 в качестве антигена показали значительное превышение уровня антител (в 2,7 раза) в группах больных сифилисом (385–6212 о.е.ф.) относительно группы здоровых индивидов (403–1091 о.е.ф.) при  $P < 0,001$ .

В группе пациентов с первичным сифилисом значения флуоресценции в отношении рекомбинантного белка Tr0277 *T. pallidum* распределялись в диапазоне 531–1711 о.е.ф., в среднем в 1,3 раза ( $P < 0,05$ ) превышая значения флуоресценции в контрольной группе здоровых индивидов. Для групп больных вторичным (492–4945 о.е.ф.) и ранним скрытым (517–6213 о.е.ф.) сифилисом. Превышение среднего значения флуоресценции было более значительным, в 3,7 раза в каждом случае ( $P < 0,001$ ). Наконец в группе пациентов с поздним скрытым сифилисом среднее значение флуоресценции превышало контрольные значения в 2,0 раза (385–4487 о.е.ф.) при  $P < 0,05$ .

Значение специфичности для антигена Tr0277, так же, как и положительная предсказательная ценность, составило 100 %. Чувствительность данного антигена была значительно ниже, на уровне от 30,0 % до 77,8 % в зависимости от формы сифилиса, суммарно составляя 56,4 %. Такое же значение было показано для отрицательной предсказательной ценности. Общая диагностическая эффективность антигена Tr0277 составила 72,1 %.

**Рекомбинантный антиген Tr0319 *T. pallidum*.** Исследование образцов сыворотки больных сифилисом в отношении белка Tr0319 методом ИФА показало средний процент положительных результатов (59,7 %), и 20,8% всех образцов была отнесена к серой зоне результатов исследования (Рисунок 25).

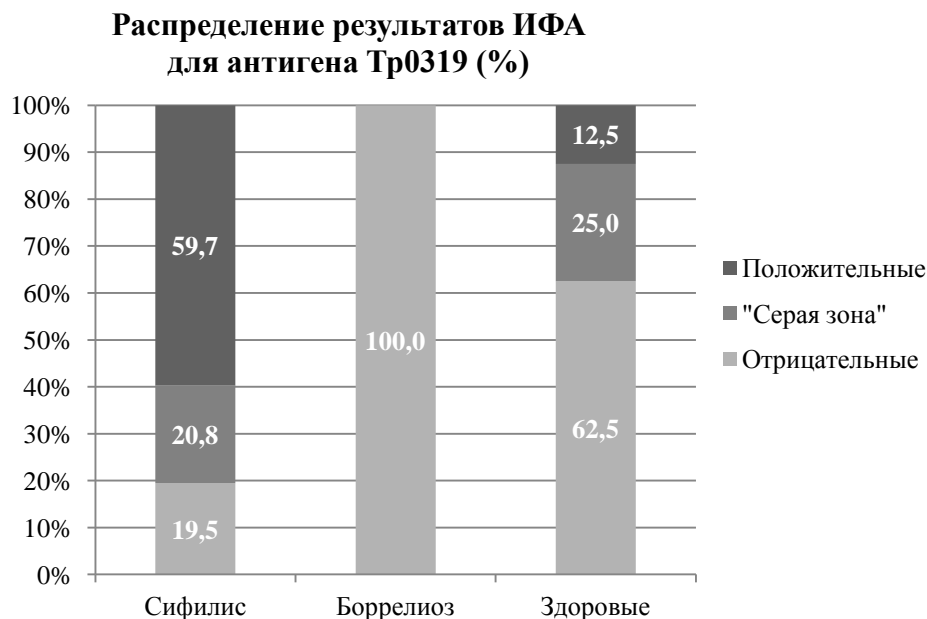


Рисунок 25 – Процентное соотношение полученных результатов исследования в группах больных сифилисом, боррелиозом и здоровых индивидов с белком Tr0319 в качестве антигена *T. pallidum*

Наличие приблизительно такого же количества ложноотрицательных результатов (19,5 %) свидетельствовал о необходимости пересмотреть пороговое значение для данного антигена, а также проверить контрольную группу образцов сыворотки, поскольку в ней были показаны ложноположительные результаты в 12,5 % случаев и, кроме этого, почти четверть результатов – в серой зоне. Однако результаты исследования сыворотки больных боррелиозом были все охарактеризованы как отрицательные. С учетом большинства истинно положительных результатов в группе больных и истинно отрицательных результатов в группе здоровых индивидов данный антиген был включен в дальнейшее исследование с поправкой на уточнение значений порогового значения ОП492.

Полученные результаты позволили расценивать белок Tr0319 в качестве перспективного антигена для дальнейшей разработки методом нРИФ. Данные флуоресцентных сигналов для данного белка представлены на рисунке 26.

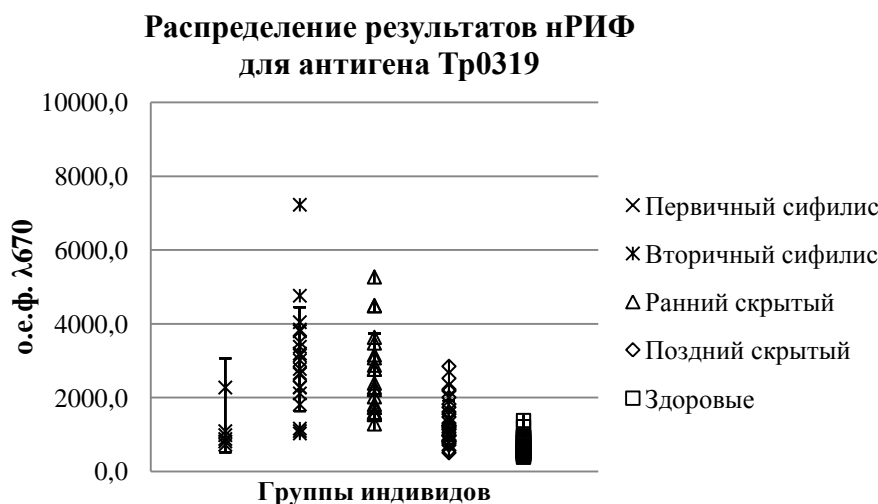


Рисунок 26 – График распределения флуоресцентного сигнала по группам исследуемых пациентов в отношении антигена Tr0319 *T. pallidum*.

Результаты нРИФ с применением рекомбинантного Tr0319 в качестве антигена показали значимое превышение уровня антител (в 3,2 раза) в группах больных сифилисом (503–7222 о.е.ф.) относительно группы здоровых индивидов (380–1376 о.е.ф.), значение достоверности  $P < 0,001$ . Значения флуоресценции для образцов сыворотки крови больных первичным сифилисом колебались в пределах 721-5064 о.е.ф. и в 2,5 раза превышали те же значения контрольной группы. Различие между этими группами было статистически достоверно ( $P < 0,05$ ). Более значимое отличие было получено в группах вторичного и раннего скрытого сифилиса по сравнению со здоровыми индивидами: зна-

чения флуоресценции превышали значения контрольной группы в 4,4 раза (1025–7222 о.е.ф.) и в 3,9 раза (1284–5267 о.е.ф.) соответственно (для двух указанных сравнений  $P < 0,001$ ). Сигналы флуоресценции в группе позднего скрытого сифилиса отличалась от контрольной группы в 2,0 раза (503–2844 о.е.ф.), что было статистически значимым отличием ( $P < 0,05$ ).

Некоторое количество ложноотрицательных результатов было получено во всех группах больных сифилисом, кроме группы раннего скрытого сифилиса. В данной группе все образцы определялись как положительные с одним результатом в серой зоне. Был выявлен один ложноположительный результат в группе здоровых индивидов.

Диагностические характеристики для применения Tr0319 в качестве антигена *T. pallidum* были следующими: специфичность составила 97,8 %, тогда как общая чувствительность была 71,8% за счет низкой чувствительности в группе больных первичным сифилисом (50,0 %) и в группе позднего скрытого сифилиса (41,7 %). Чувствительность в группах больных вторичным и ранним скрытым сифилисом составила 90,0 % и 95,8 % соответственно. Положительная предсказательная ценность указанного антигена была 98,2 %, тогда как отрицательная предсказательная ценность составила 66,7 %. Финальное значение эффективности диагностики с применением Tr0319 была на уровне 81,3 %.

**Рекомбинантный антиген Tr0453 *T. pallidum*.** Исследование уровня антител к рекомбинантному белку Tr0453 *T. pallidum* в формате ИФА на образцах сыворотки больных сифилисом (Рисунок 27) выявило 92 % образцов как положительные с незначительным количеством результатов, которые были отнесены в итоге к отрицательным или же попали в серую зону. В группе образцов больных боррелиозом не было выявлено значений оптической плотности при длине волны 492 нм, позволяющих отнести их к положительным или же к значениям из серой зоны, обеспечивая таким образом 100 % отрицательных результатов в этой группе. Достаточно большая часть (25 %) результатов здоровых индивидов была отнесена к серой зоне полученных результатов, а также были получены и ложноположительные результаты в 12,5 % случаев, что может быть следствием достаточно высокого порога отсека для данного антигена и может быть решено с уточнением  $OP_{\text{порог}}$  после увеличения количества образцов в контрольной группе.

**Распределение результатов ИФА  
для антигена Тр0453 (%)**

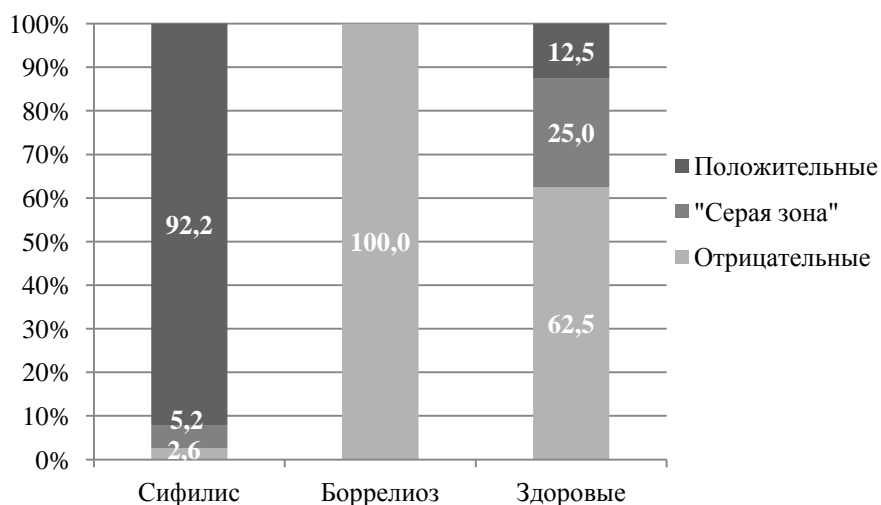


Рисунок 27 – Процентное соотношение полученных результатов исследования в группах больных сифилисом, боррелиозом и здоровых индивидов с белком Тр0453 в качестве антигена *T. pallidum*

Полученные результаты позволили расценивать белок Тр0453 в качестве перспективного антигена для дальнейшей проверки методом нРИФ. Данные флуоресцентных сигналов для данного белка представлены на рисунке 28.

**Распределение результатов нРИФ  
для антигена Тр0453**

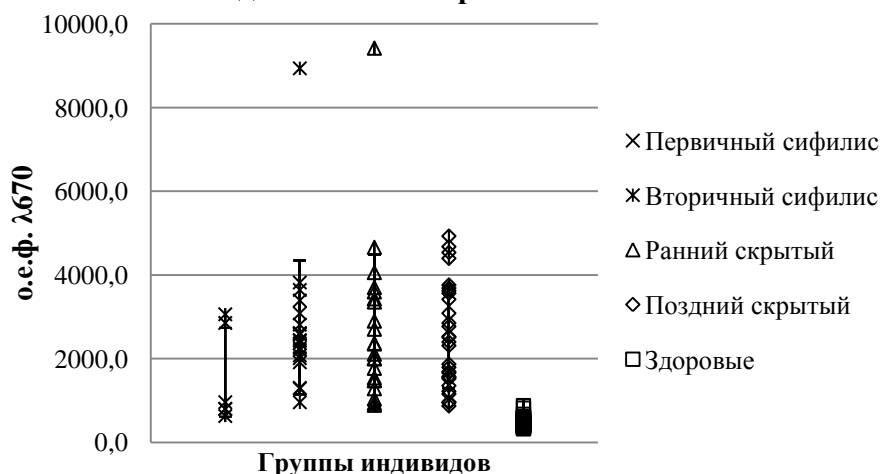


Рисунок 28 – График распределения флуоресцентного сигнала по группам исследуемых пациентов в отношении антигена Тр0453 *T. pallidum*

Уровень антител к рекомбинантному белку Тр0453 *T. pallidum* в исследовании нРИФ на образцах сыворотки больных сифилисом показало превышение интенсивности

флуоресценции в среднем в 5 раз (9418–576 о.е.ф.) по сравнению с группой здоровых индивидов (324–875 о.е.ф.), и отличие результатов данных групп образцов была достоверно значима ( $P < 0,001$ ). Значение флуоресценции в группе больных первичным сифилисом оказалось выше в 3,2 раза (576–3275 о.е.ф.) по сравнению с группой здоровых индивидов, и статистическая достоверность данного различия была близка к пограничному значению ( $P < 0,05$ ). В группах вторичного (954–8936 о.е.ф.), раннего скрытого (858–9418 о.е.ф.) и позднего скрытого сифилиса (867–4927 о.е.ф.) это отличие было более значительно, в 5,5, в 5,3 и в 5,3 раза превышая значения флуоресценции контрольной группы индивидов соответственно (для всех указанных групп  $P < 0,001$ ). Два ложноотрицательных результата были получены в группе больных первичным сифилисом, остальные группы больных показали только положительные результаты ИРИФ и незначительное количество результатов в серой зоне. В группе здоровых индивидов не было выявлено ни одного ложноположительного результата.

На основе полученных данных были рассчитаны диагностические характеристики для применения Тр0453 в качестве антигена *T. pallidum*. Специфичность данного антигена составила 100 %, тогда как общая чувствительность была снижена до 95,0 % за счет низкой чувствительности в группе больных первичным сифилисом (75 %), при 100 % чувствительности в группах больных вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом. Положительная предсказательная ценность указанного антигена была 100 %, тогда как отрицательная предсказательная ценность составила 91,7 %. Финальное значение эффективности диагностики с применением Тр0453 было на уровне 96,8 %.

**Рекомбинантный антиген Тр0684 *T. pallidum*.** Результаты ИФА для белка Тр0864 достаточно сильно варьировались как в группе больных сифилисом, так и в группе здоровых индивидов, что оставляло значительную часть полученных данных в серой зоне оценки результата (Рисунок 29). Для группы больных более половины результатов были все же оценены как истинно положительные (53,9 %), а для группы здоровых только 30 % результатов были интерпретированы как истинно отрицательные. Все результаты больных боррелиозом были отрицательными.



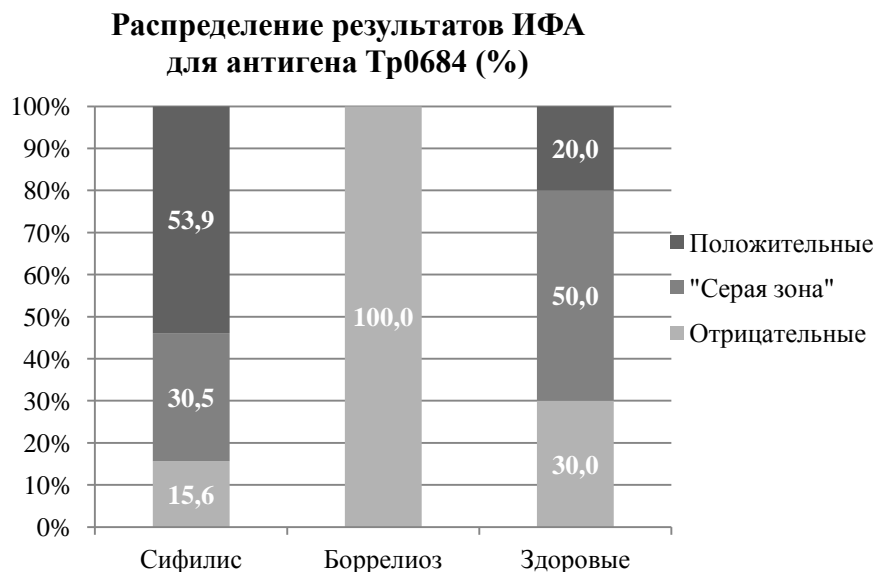


Рисунок 29 – Процентное соотношение полученных результатов исследования в группах больных сифилисом, больных боррелиозом и здоровых индивидов с белком Тр0684 в качестве антигена *T. pallidum*

Полученные результаты позволили расценивать белок Тр0684 в качестве перспективного антигена для дальнейшей разработки методом нРИФ. Данные флуоресцентных сигналов для данного белка представлены на рисунке 30.

Результаты нРИФ с применением рекомбинантного Тр0684 в качестве антигена показали незначительное превышение уровня антител (в 1,2 раза) в группах больных сифилисом (352–3065 о.е.ф.) относительно группы здоровых индивидов (369–885 о.е.ф.) при  $P > 0,05$ .

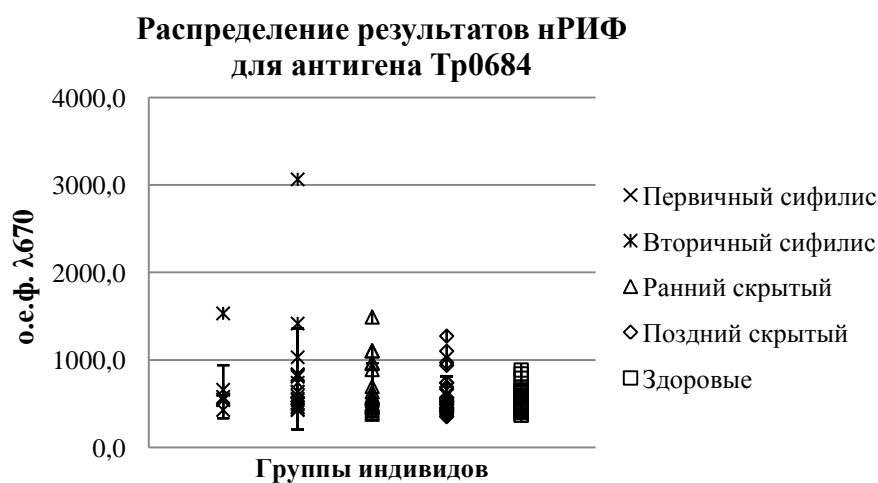


Рисунок 30 – График распределения флуоресцентного сигнала по группам исследуемых пациентов в отношении антигена Тр0684 *T. pallidum*

В исследовании с применением рекомбинантного белка Tr684 *T. pallidum* уровень флуоресценции во всех группах больных сифилисом был приблизительно одинаковым: 428–1533 о.е.ф. для первичного, 427–3065 о.е.ф. для вторичного, 380–1492 о.е.ф. для раннего скрытого и 352–1273 о.е.ф. для позднего скрытого сифилиса. Эти результаты не превышали значений флуоресценции в группе здоровых индивидов в промежутке от 1,1 до 1,4 раза, что в свою очередь было обусловлено низкими значениями флуоресценции в группах больных сифилисом. Полученные данные сформировали значения чувствительности в группах больных сифилисом от 9,1 % до 28,6 % со средним значением для всех больных 16,9 % и отрицательной предсказательной ценностью 40,2 %. Однако отсутствие ложноположительных результатов дало в итоге 100 % специфичность и положительную предсказательную ценность. Общая эффективность применения данного антигена составила 46,7 %.

**Рекомбинантный антиген Tr0965 *T. pallidum*.** Исследование антител к белку Tr0965 методом ИФА в группе больных сифилисом выявило 94 % образцов как положительные, 2,4 % образцов были отнесены к ложноотрицательным результатам и в серой зоне количество образцов составило 3,6 % (Рисунок 31).

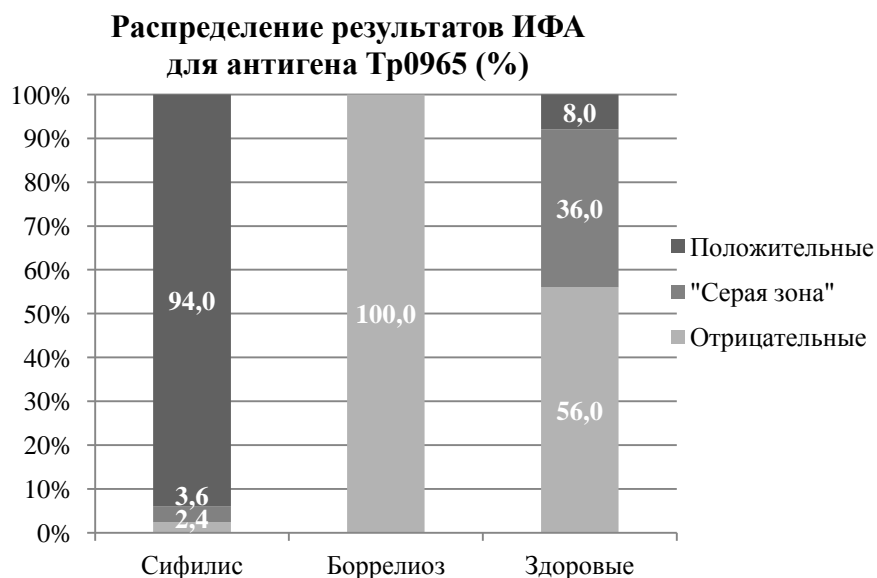


Рисунок 31 – Процентное соотношение полученных результатов исследования в группах больных сифилисом, больных боррелиозом и здоровых индивидов с белком Tr0965 в качестве антигена *T. pallidum*

Данные исследования в контрольной группе содержали больше трети всех результатов в серой зоне, что свидетельствовало о большом разбросе значений ОП<sub>492</sub> для

данного антигена среди здоровых индивидов. Эти результаты, а также 8 % ложноположительных результатов, в свою очередь указывало на возможную кросс-реактивность внутри исследования для данного антигена, а также на необходимость более точной проверки образцов в группе здоровых индивидов. Однако результаты исследования в группе больных боррелиозом были однозначными – 100 % отрицательные. С учетом высокой серореактивности в группе больных сифилисом антиген Tr0965 был включен в дальнейшие исследования.

Полученные результаты позволили расценивать белок Tr0965 в качестве перспективного антигена для дальнейшей разработки методом нРИФ. Данные флуоресцентных сигналов для данного белка представлены на рисунке 32.

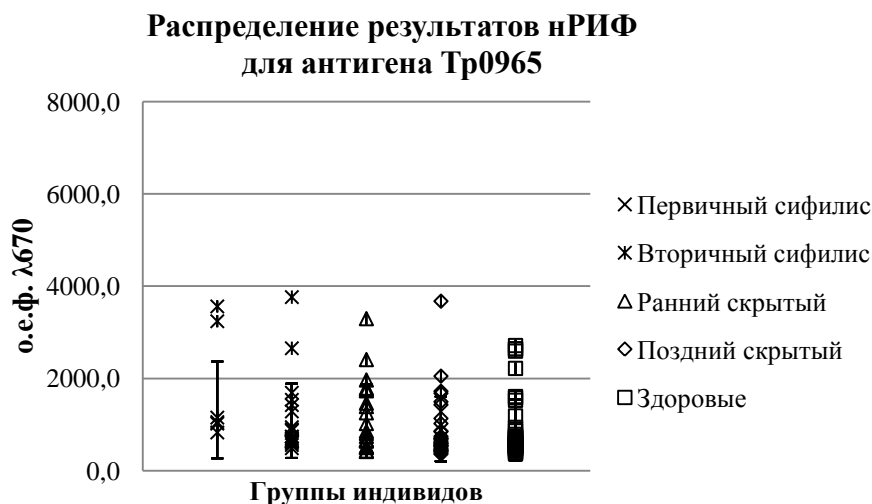


Рисунок 32 – График распределения флуоресцентного сигнала по группам исследуемых пациентов в отношении антигена Tr0965 *T. pallidum*

Результаты нРИФ с применением рекомбинантного Tr0965 в качестве антигена показали незначительное (в 1,2 раза) превышение уровня антител в группах больных сифилисом (358–3762 о.е.ф.) относительно группы здоровых индивидов (362–2712 о.е.ф.) при  $P > 0,05$ .

При проведении исследований с использованием рекомбинантного белка Tr0965 *T. pallidum* во всех группах больных сифилисом диапазон флуоресценции был приблизительно одинаковым: 572–3560 о.е.ф. для первичного, 486–3762 о.е.ф. для вторичного, 415–3295 о.е.ф. для раннего скрытого и 358–3674 о.е.ф. для позднего скрытого сифилиса. Эти результаты превышали соответствующие значения в группе здоровых индивидов не более чем в 1,4 раза, что в свою очередь было обусловлено высокими значениями

флуоресценции контрольной группы. Высокие значения флуоресценции в исследовании образцов здоровых индивидов могут объясняться неспецифичным связыванием или же неоднородностью выборки в данной группе, однако это явилось причиной высокого значения порога отсечения и, соответственно, множества ложноотрицательных значений в группах больных сифилисом. Повышение пороговой флуоресценции не позволило чувствительности в группах больных различными формами сифилиса подняться выше 28,6 %, оставляя среднюю чувствительность на уровне 10,8 % и отрицательную предсказательную ценность на уровне 33,3 %. Специфичность составила 80,4 %, а положительная предсказательная ценность – 50,0 %. Общая эффективность применения данного антигена была 35,7 %.

Следует отметить, что значения флуоресценции были достаточно высокими для больных сифилисом и соответствовали таковым в сравнении со значениями других исследуемых антигенов, однако они терялись на фоне таких же высоких значений здоровых индивидов. Отсюда можно сделать вывод о достаточной иммуногенности данного антигена при невысокой специфичности.

**Рекомбинантный антиген Tr1038 *T. pallidum*.** Исследование антител к белку Tr1038 методом ИФА показало 100 % отрицательных результатов в контрольной группе и в группе больных боррелиозом, что говорит о высокой специфичности данного антигена (Рисунок 33).

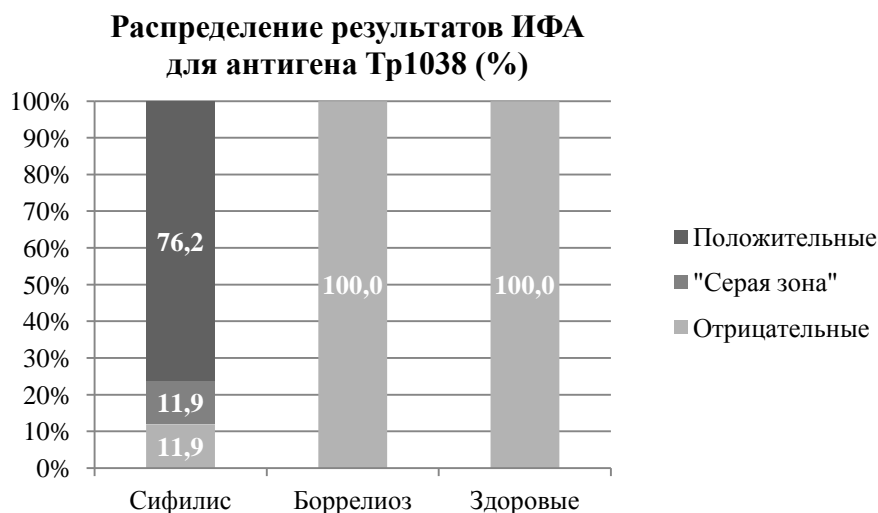


Рисунок 33 – Процентное соотношение полученных результатов исследования в группах больных сифилисом, больных боррелиозом и здоровых индивидов с белком Tr1038 в качестве антигена *T. pallidum*

В группе больных сифилисом были, однако, получены ложноотрицательные результаты в 11,9 % случаев, и столько же пришлось на долю результатов в серой зоне. Высокий процент истинно положительных результатов (76,2 %) стали основанием для включения данного белка в дальнейшие исследования.

Полученные результаты позволили расценивать белок Tr1038 в качестве перспективного антигена для дальнейшей разработки методом нРИФ. Данные флуоресцентных сигналов для данного белка представлены на рисунке 34.

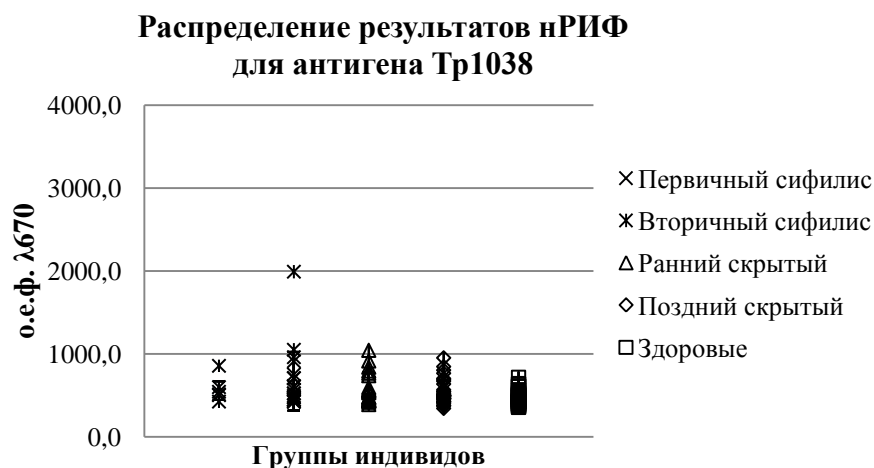


Рисунок 34 – График распределения флуоресцентного сигнала по группам исследуемых пациентов в отношении антигена Tr1038 *T. pallidum*

Результаты нРИФ с применением рекомбинантного Tr1038 в качестве антигена показали незначительное превышение уровня антител (в 1,2 раза) в группах больных сифилисом (345–1993 о.е.ф.) относительно группы здоровых индивидов (357–720 о.е.ф.) при  $P > 0,05$ . В исследовании с использованием рекомбинантного белка Tr1038 *T. pallidum* диапазон флуоресценции во всех группах больных сифилисом был приблизительно одинаковым: 427–858 о.е.ф. для первичного, 422–1993 о.е.ф. для вторичного, 392–1045 о.е.ф. для раннего скрытого и 345–954 о.е.ф. для позднего скрытого сифилиса. Эти результаты не превышали значений флуоресценции в группе здоровых индивидов более чем в 1,3 раза, что в свою очередь было обусловлено низкими значениями флуоресценции в группах больных сифилисом. Полученные данные сформировали значения чувствительности в группах больных сифилисом в промежутке от 9,1 % до 22,2 % со средним значением для всех больных 15,1 % и отрицательной предсказательной ценностью 42,1 %. Однако отсутствие ложноположительных результатов дало в итоге 100 % специфичность и положительную предсказательную ценность. Общая эффективность применения данного антигена составила 47,5 %.

Следует отметить, что значения флуоресценции были достаточно низкими для больных сифилисом и были значительно ниже в сравнении со значениями других исследуемых антигенов, что позволяет сделать вывод о низкой иммуногенности данного антигена.

Таким образом, результаты исследования позволили оценить эффективность диагностического использования рекомбинантных белков Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0965, Tr0277 и Tr0684 *T. pallidum* в качестве антигенов для трепонема-специфической диагностики сифилиса, количественно охарактеризовав чувствительность и специфичность подобного исследования, его положительную и отрицательную ценность, а также производный от этого интегральный параметр – общую диагностическую эффективность (Таблица 11). Полученные значения были сравнены с соответствующими значениями для антигенов Tr15, Tr17, Tr47, TmpA, традиционно применяемых для трепонема-специфической диагностики сифилиса.

Полученные результаты позволили констатировать достаточно высокую специфичность и определяемую этим положительную предсказательную ценность большинства разработанных рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, находящихся в диапазоне 97,8–100 % и несколько сниженных только при использовании Tr0965 (80,4 % и 50,0 % соответственно). В свою очередь наиболее высокие показатели чувствительности и определяемой этим отрицательной предсказательной ценности зафиксированы как для традиционно используемого иммунодоминантного белка Tr17 (91,3 % и 86,3 %), так и вновь синтезированного белка Tr0453 (95,0 % и 91,7 %), что позволяет рассматривать его в качестве наиболее перспективного дополнительного антигена для трепонема-специфической диагностики сифилиса.

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%).

Таблица 11 – Диагностические параметры рекомбинантных белков *T. pallidum* в качестве антигенов для диагностики сифилиса (нРИФ)

Диагностические характеристики	Тр0277	Тр0319	Тр0453	Тр0684	Тр0965	Тр1038	Тр15*	Тр17*	Тр47*	ТрpA*
<b>Специфичность (%)</b>										
Общая	100,0	97,8	100,0	100,0	80,4	100,0	100,0	97,8	97,8	97,8
<b>Чувствительность (%)</b>										
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
<b>Положительная предсказательная ценность (%)</b>										
Общая	100,0	98,2	100,0	100,0	50,0	100,0	100,0	98,6	97,8	97,7
<b>Отрицательная предсказательная ценность (%)</b>										
Общая	56,4	66,7	91,7	40,2	33,3	42,1	67,2	86,3	60,3	58,4
<b>Диагностическая эффективность (%)</b>										
Общая	72,1	81,3	96,8	46,7	35,7	47,5	81,8	93,6	74,8	72,7

Примечание – \* Классические антигены, используемые в регламентированных лабораторных исследованиях для диагностики сифилиса

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*. Два из этих белков являются мембранными липопротеинами, что подтверждает предположение о высокой иммуногенности белков с липидной модификацией. Наиболее высокие значения чувствительности и специфичности были получены для белка Tr0453, являющегося белком наружной мембраны *T. pallidum*. Это говорит о том, что редкие белки наружной мембраны являются важными мишенями для клеток иммунной системы человека. При этом цитоплазматическая протеаза Tr0277 также является иммуногенным белком, и ввиду этого цитоплазматические белки также могут быть диагностически значимыми антигенами возбудителя сифилиса.

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.

### **3.4 Апробация модельного иммуночипа с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* для диагностики сифилиса**

#### ***3.4.1 Результаты скрининга образцов сыворотки крови больных сифилисом на иммуночипах с расширенной панелью антигенов *T. pallidum****

Для проведения испытаний иммуночипов с панелью из 10 антигенов *T. pallidum* были использованы образцы сыворотки крови больных первичным, вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом. Интегральная оценка результата тестирования на иммуночипе с использованием формального критерия – положительной реакции сыворотки крови с 2 или более антигенами *T. pallidum* позволила подтвердить преимущества использования расширенной диагностической панели.



Так, если традиционное использование четырех иммунодоминантных белков со 100 % специфичностью позволяло охарактеризовать как «положительные» 61 из 85 (71,8 %) тестированных образцов сыворотки крови больных сифилисом, то использование панели из десяти антигенов существенно повышало чувствительность подобного скрининга до 90,6 % с сохранением наивысшего уровня специфичности. Показатели чувствительности варьировались среди групп пациентов с различными формами сифилиса. Самое низкое значение было получено по результатам исследования образцов пациентов с первичным сифилисом, однако даже в данной группе пациентов было получено увеличение значения чувствительности при использовании панели из 10 антигенов (54,5 %) по сравнению с результатами исследования с помощью панели из 4 антигенов (45,5 %). В трех других группах пациентов применение расширенной панели привело к увеличению чувствительности до 95,2 %, 95,8 % и 96,6 %, соответственно для образцов пациентов со вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом. С расширением панели анализируемых антигенов общая диагностическая эффективность исследования повысилась от 82,3 % до 94,6 % (Таблица 12).

Таблица 12 – Сравнение диагностических характеристик применения панели из 10 рекомбинантных белков *T. pallidum*

Диагностические характеристики (%)	4 применяемых в диагностике антигена*	Расширенная панель из 10 антигенов**
Специфичность	100,0	100,0
Чувствительность (общая)	71,8	90,6
Первичный сифилис	45,5	54,5
Вторичный сифилис	85,7	95,2
Ранний скрытый сифилис	83,3	95,8
Поздний скрытый сифилис	62,1	96,6
Положительная предсказательная ценность	100,0	100,0
Отрицательная предсказательная ценность	66,7	86,8
Диагностическая эффективность	82,3	94,6

Примечание – \* Tr15, Tr17, Tr47, TmpA; \*\* Tr15, Tr17, Tr47, TmpA, Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0965, Tr0277, Tr0684

Профиль иммунореактивности дополнительно идентифицированных положительных образцов сыворотки в 12 из 16 случаев включал иммунодоминантный антиген Tr17 и вновь синтезированный рекомбинантный белок Tr0453. Кроме того, в данных

образцах зафиксированы антитела к рекомбинантным белкам Tr0277 (3 сыворотки) и Tr0319 (2 сыворотки), в результате чего профиль их иммунореактивности расширился до 3–4 антигенов. Один вновь достигнутый результат основывался на специфическом взаимодействии с иммунодоминантным антигеном Tr15 и рекомбинантным белком Tr0453, а еще три «положительные» сыворотки могли быть верифицированы исключительно на основе их реагирования с вновь синтезированными антигенами: Tr0319 + Tr0453 и Tr0453 + Tr0965 соответственно.

Таким образом, использование расширенной панели диагностических антигенов *T. pallidum* и её практическая реализация с использованием технологии белковых биочипов (иммуночипов), позволили существенно повысить эффективность трепонема-специфической серологической диагностики сифилиса. Достигнутая при этом чувствительность диагностического исследования составила 71,8 % против 90,6 % при использовании традиционного метода, а его специфичность характеризовалась величиной 100 %. Достигнутая при этом эффективность дифференциации составила 94,6 % против 82,3 %.

Многопараметрический характер исследования на иммуночипе определил возможность и иного варианта его оценки, основанного на использовании линейного дискриминантного анализа и приводящего результаты сравнения групп анализируемых образцов к виду:

$$D = a_1(\text{ФЛТр15}) + a_2(\text{ФЛТр17}) + \dots + a_n(\text{ФЛТрN}) + b, \quad (6)$$

где  $D$  – классификационное значение дискриминантной функции; ФЛТр15–ФЛТрN – независимые переменные, соответствующие интенсивности флуоресценции (отн. ед.) 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;  $b$  – поправочная константа.

При последующем пошаговом анализе с использованием уровня значимости  $F$ -статистики был уточнен список независимых переменных, вносящих максимальный вклад в дифференциацию «положительных» и «отрицательных» образцов сыворотки крови. По его результатам в качестве наиболее значимых диагностических антигенов *T. pallidum* были идентифицированы Tr15, Tr17, TmpA, Tr0319 и Tr0453 ( $F$ -удаление переменной более 6,00;  $P < 0,05$ ), составляющие оптимальную панель для трепонема-специфической диагностики сифилиса с использованием иммуночипа.

Распределение значений дискриминантной функции в группах больных сифилисом и здоровых индивидов (Рисунок 35) приближалось к нормальному, одновременно демонстрируя существенное различие между сравниваемыми группами. При этом значения в группе здоровых индивидов находились в узком диапазоне (от  $-2,03$  до  $-0,88$ ), что исключало получение ложноположительных результатов и обеспечивало 100 % специфичность проведенного исследования. В свою очередь значения дискриминантной функции в группе больных сифилисом распределялись в более широком диапазоне (от  $-1,97$  до  $+5,01$ ), а установленный «порог отсечения»  $C \geq -0,6$  позволял правильно идентифицировать 80 из 85 тестируемых образцов сыворотки, что соответствовало 94,1 % чувствительности проведенного исследования.

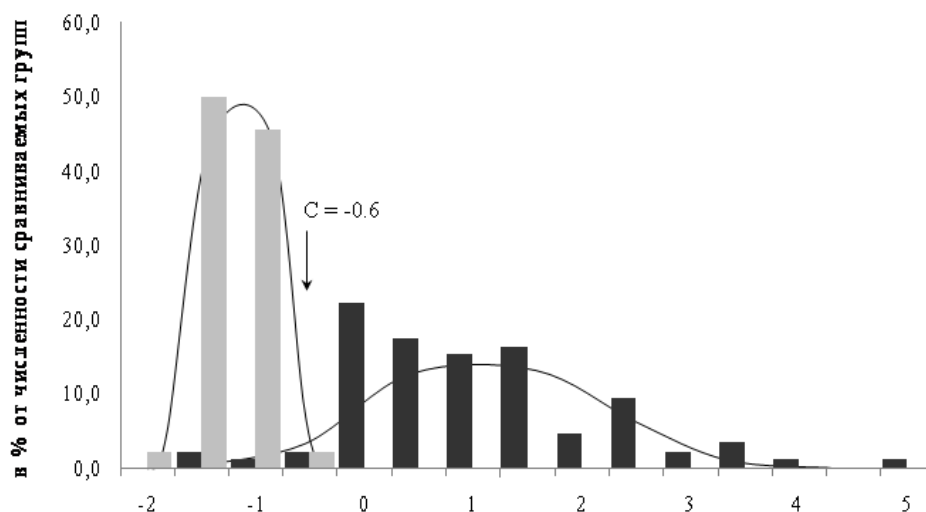


Рисунок 35 – Распределения значений линейной дискриминантной функции (по оси абсцисс), основанной на результатах многопараметрического анализа сыворотки крови на иммуночипе с расширенной панелью антигенов *T. pallidum*, в группах больных сифилисом (серые столбики) и здоровых индивидов (черные столбики)

Следует также отметить, что среди «ложноотрицательных» образцов 4 из 5 были получены от пациентов с первичным сифилисом, что может объяснять отрицательный результат их тестирования присутствием иного класса диагностических антител (IgM, но не IgG), определение которых с применением разработанного иммуночипа в дальнейшем также является возможным. Кроме этого, использование данного подхода позволяет подойти к решению принципиально новой задачи, связанной с вероятностной дифференциацией различных форм сифилиса, в первую очередь – его ранней или поздней скрытых форм.

### 3.4.2 Результаты применения расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* для дифференциальной диагностики различных форм сифилиса

Для решения задачи дифференциальной диагностики различных форм сифилиса в контексте серологических лабораторных исследований была проведена интегральная оценка интенсивности иммунного ответа на всю совокупность тестируемых антигенов. На рисунке 36 в качестве примера приведены профили серореактивности сыворотки крови больных четырех исследуемых форм сифилиса.

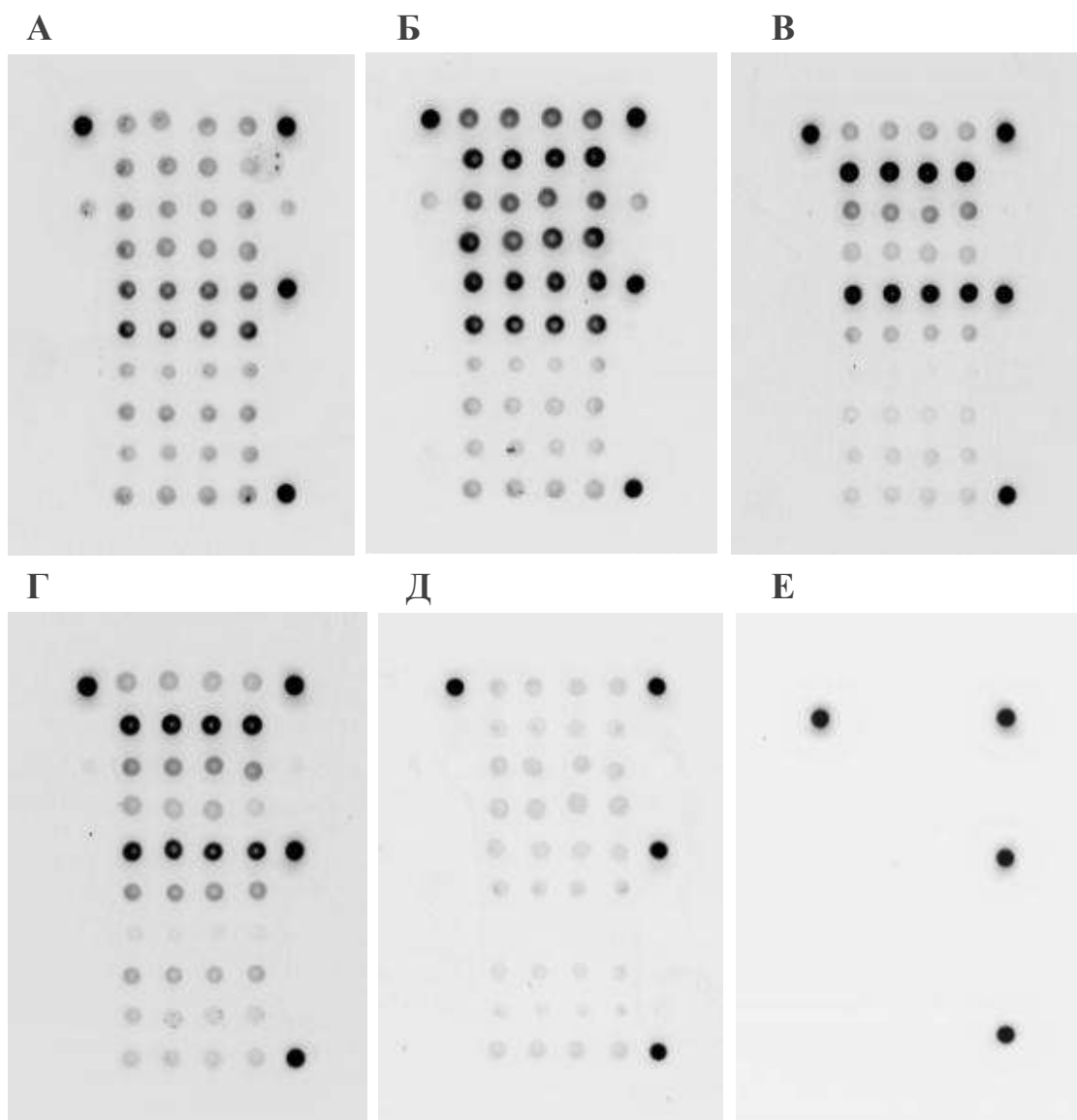


Рисунок 36 – Результаты анализа образцов сыворотки больных сифилисом и здорового индивида: А – образец больного первичным сифилисом; Б - образец больного вторичным сифилисом; В – образец больного ранним скрытым сифилисом; Г – образец больного поздним скрытым сифилисом; Д – образец здорового индивида; Е – отрицательный контроль эксперимента

На основе профиля распределения интенсивности флуоресцентного сигнала к определенным антигенам в группах больных с различными формами сифилиса показано, что наибольшая доля максимальных значений приходится на группу образцов от больных с вторичным сифилисом, интенсивно взаимодействующих с антигенами Tr15, Tr47, TmpA, а также Tr0319. Для белков Tr0453 и Tr17 наибольшие значения иммунореактивности зафиксированы при тестировании сыворотки крови от больных с поздним скрытым сифилисом, а для Tr0277 – с ранним скрытым сифилисом.

Использование расширенной панели антигенов *T. pallidum* для дифференциального анализа первичного, вторичного, раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса показало различный вклад отдельных антигенов и данное распределение. Наибольший вклад имели белки Tr17, Tr47 и Tr0319 ( $P < 0,001$ ),  $F$ -фактор исключения был максимальный среди всей панели и равнялся соответственно 5,98, 5,10 и 8,15. Применение алгоритма линейного дискриминантного анализа позволило рассчитать коэффициенты классификационных уравнений и отнести каждую сыворотку с присущим ей спектром антител к одной из шести дифференцируемых групп, соответствующих определенной форме заболевания, а также группе здоровых индивидов (Таблица 13).

Таблица 13 – Распределение анализируемых образцов сыворотки крови по формам сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты тестирования на иммуночипе с расширенной панелью из 10 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*

Дифференцируемые группы	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием дифференцирующего алгоритма					Эффективность дифференциации, %
	(1)*	(2)*	(3)*	(4)*	(5)*	
(1) Первичный сифилис; n = 11	3	1	1	0	6	27,3
(2) Вторичный сифилис; n = 21	0	13	5	0	3	61,9
(3) Ранний скрытый сифилис; n = 24	2	3	15	3	1	62,5
(4) Поздний скрытый сифилис; n = 29	0	0	3	20	6	69,0
(5) Здоровые; n = 46	0	0	0	0	46	100,0

Примечание – \* Обозначения форм сифилиса 1–5 в колонках аналогичны обозначениям в строках

Важным результатом проведенного исследования представляется подтверждение однозначной (100 %) оценки образцов сыворотки здоровых индивидов, что свидетельствует о высокой специфичности предложенного диагностического алгоритма. В свою очередь использование дискриминантного анализа для дифференциации образцов сыворотки крови, полученных от больных с различными формами сифилиса, характеризовалась значениями эффективности от 27,3 % до 69,0 %: минимальными при первичном и максимальными при позднем скрытом сифилисе.

На Рисунке 37 представлено распределение результатов дискриминантного анализа с использованием расширенной панели антигенов из 10 антигенов *T. pallidum* для образцов сыворотки больных первичным и вторичным сифилисом, ранним и поздним скрытым сифилисом, а также больных боррелиозом (дополнительная группа) и здоровых индивидов.

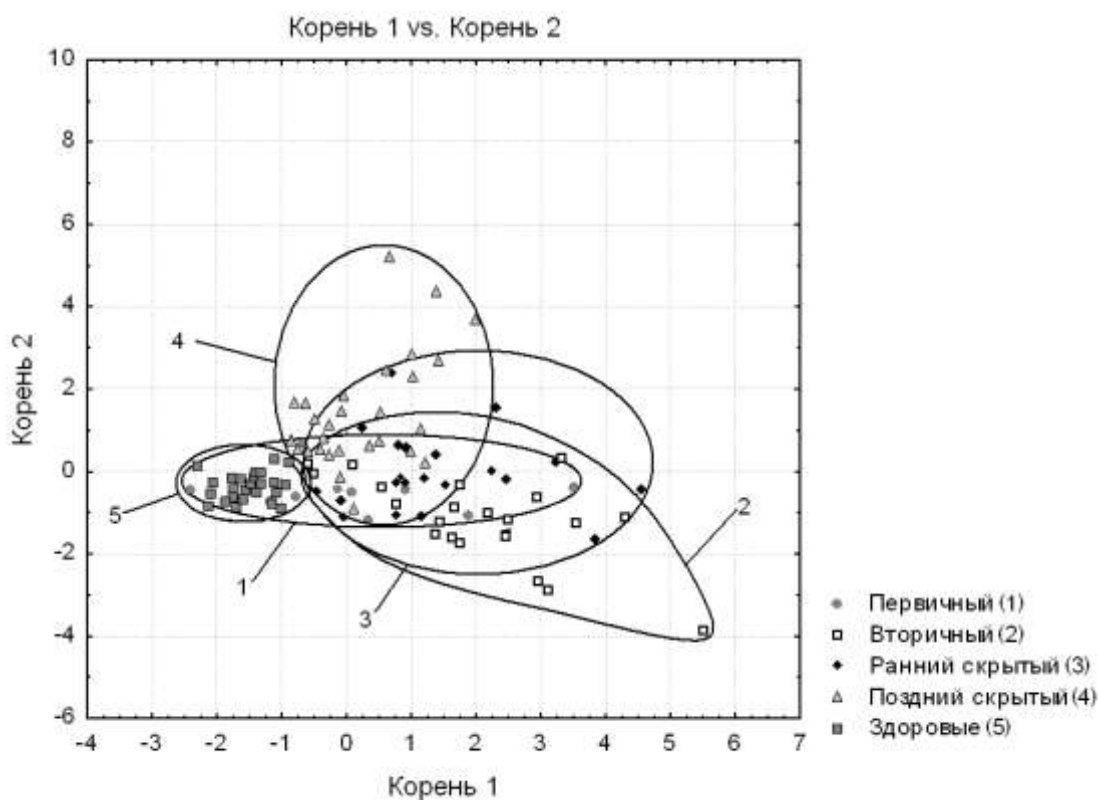


Рисунок 37 – Распределение результатов дискриминантного анализа сыворотки крови больных различными формами сифилиса, боррелиозом и здоровых индивидов в проекции двух дискриминантных функций (Корень 1, Корень 2), описывающих результаты тестирования на иммуночипе с расширенной панелью рекомбинантных антигенов *T. pallidum*

Из данного распределения видно, что образцы здоровых индивидов формируют отдельный кластер, с которым ассоциируется ряд образцов из группы первичного сифилиса (вероятно, из-за небольшой длительности заболевания, недостаточной для формирования специфического иммунного ответа). В свою очередь наиболее разделенный кластер с прочими случаями заболевания формирует группа позднего скрытого сифилиса. Группы первичного, вторичного и раннего скрытого сифилиса большей частью перекрываются друг с другом, захватывая области распределения остальных групп образцов.

Клинически наибольшее значение имеет вклад разработанных антигенов в дифференциацию ранних и поздних скрытых форм сифилиса. Проверка совокупности из 10 антигенов для скрытых форм данного заболевания показала различную дифференциальную ценность каждого антигена в данной панели. Расчет статистического показателя «лямбды Уилкса», характеризующего потенциальный вклад каждого антигена в дифференциацию отдельных форм сифилиса, свидетельствовал о достаточном уровне значимости ( $P < 0,05$ ) для шести из них (Tr15, Tr17, Tr0453, Tr0319, Tr1038 и Tr0684). Из указанных антигенов максимальное значение  $F$ -фактора исключения (22,85) показал белок Tr0319, имеющий, соответственно, наибольший вклад в распределение между исследуемыми группами скрытого сифилиса. Далее по значимости  $F$ -фактора исключения расположились Tr15 и Tr17, имеющие приблизительно равный вес 8,77 и 8,08 соответственно. Все три антигена имели уровень достоверности вклада в дифференциальный анализ  $P < 0,001$ . Остальные антигены были исключены программой из дальнейшего анализа как избыточные.

Последующее применение алгоритма линейного дискриминантного анализа позволило рассчитать коэффициенты классификационных уравнений, позволяющих отнести каждую сыворотку с присущим ей спектром антител к одной из групп скрытого сифилиса, а также группе здоровых индивидов (Таблица 14). Важным результатом проведенного исследования представляется достижение однозначного (100 %) соответствия при анализе сыворотки крови здоровых индивидов, что свидетельствует о высокой специфичности предложенного диагностического алгоритма. В свою очередь его использование для дифференциации образцов, полученных от больных со скрытыми формами сифилиса, в каждой группе сравнения привело к высокой вероятности совпадения истинного и прогнозируемого результата, что обозначило эффективность дифференциации на уровне 70,8 % для раннего скрытого и 65,5 % для позднего скрытого сифилиса.

Таблица 14 – Распределение анализируемых образцов сыворотки крови по формам сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты тестирования на иммуночипе с расширенной панелью рекомбинантных антигенов *T. pallidum*

Дифференцируемые группы и их численность	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием дифференцирующего алгоритма			Эффективность дифференциации (%)
	(1)*	(2)*	(3)*	
(1) Ранний скрытый сифилис; n = 24	17	4	3	70,8
(2) Поздний скрытый сифилис; n = 29	4	19	6	65,5
(3) Здоровые; n = 46	0	0	46	100,0

Примечание – \* Обозначения форм сифилиса 1–3 в колонках аналогичны обозначениям в строках

На рисунке 38 приведено распределение результатов дискриминантного анализа образцов сыворотки крови больных ранним и поздним скрытым сифилисом.

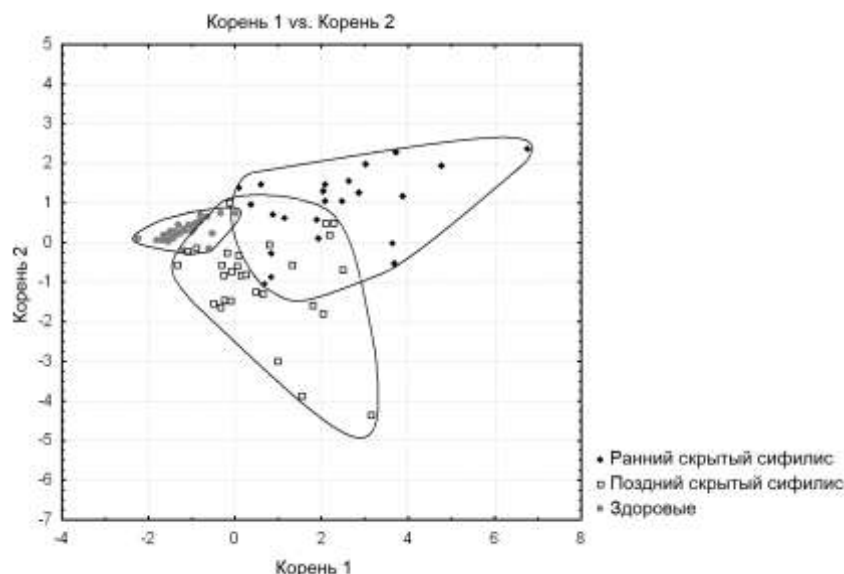


Рисунок 38 – Распределение результатов дискриминантного анализа образцов сыворотки крови больных ранним и поздним скрытым сифилисом в проекции двух дискриминантных функций (Корень 1, Корень 2), описывающих результаты тестирования на иммуночипе с расширенной панелью рекомбинантных антигенов *T. pallidum*

Из данного распределения видно, что образцы здоровых индивидов формируют отдельный кластер, а группы раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса, в свою очередь, образуют разделенные кластеры, которые частично перекрываются друг с дру-



гом, минимально захватывая область распределения группы образцов здоровых индивидов.

В связи с недостаточной дискриминацией скрытых форм сифилиса была проверена гипотеза о повышении эффективности дифференциации форм сифилиса по результатам исследования на иммуночипе с добавлением в панель дополнительных антигенов и определением двух классов иммуноглобулинов IgG и IgM в сыворотке крови больных сифилисом. В дальнейших экспериментах в расширенную панель рекомбинантных антигенов *T. pallidum* были добавлены два экспериментальных коммерческих белка, а именно Tr0163 (белок в составе АТФ-связывающего транспортного комплекса на внутренней мембране) и Tr0971 (лактоферрин-связывающий,  $Zn^{2+}$  связывающий белок внутренней мембраны) (*Cusabio*, Китай). Опубликованные исследования [36, 108] характеризуют данные белки как наиболее серореактивные при скрытых формах сифилиса. Для всех образцов пациентов со скрытыми формами сифилиса и для группы здоровых индивидов был проведен анализ иммуноглобулинов классов IgG и IgM на иммуночипах с панелью из 12 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*. В результате проведенного анализа было получено однозначное (100%) распределение здоровых индивидов в одну группу (Таблица 15).

Таблица 15 – Распределение анализируемых образцов сыворотки крови по формам сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты тестирования иммуноглобулинов IgG и IgM против расширенной панели из 12 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*

Дифференцируемые группы	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием линейных уравнений дифференциального анализа			Эффективность дифференциации, (%)
	(1)*	(2)*	(3)*	
(1) Ранний скрытый сифилис; n=18	16	2	0	88,9
(2) Поздний скрытый сифилис; n=18	1	17	0	94,4
(3) Здоровые; n=27	0	0	27	100,0
Всего; n=63	17	19	27	95,6

Примечание – \* Обозначения форм сифилиса 1-3 в колонках аналогичны обозначениям в строках

Группы раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса были дифференцированы с эффективностью 88,9% и 94,4%, соответственно. Два пациента с ранним скрытым сифилисом были определены в группу позднего скрытого сифилиса, тогда как в группе позднего скрытого сифилиса один пациент был отнесен к группе раннего скрытого сифилиса.

На рисунке 39 представлено полученное в ходе дискриминантного анализа распределение результатов нРИФ с использованием расширенной панели из 12 антигенов *T. pallidum* для образцов сыворотки больных ранним и поздним скрытым сифилисом, а также здоровых индивидов.

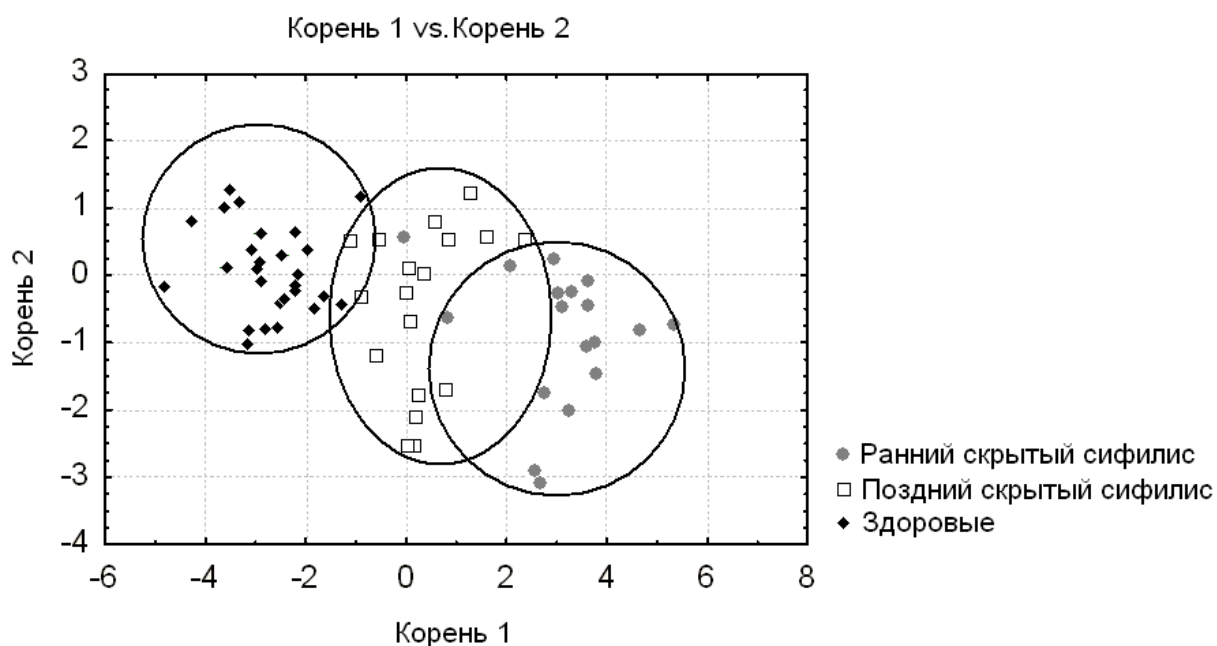


Рисунок 39 – Распределение результатов исследования на иммуночипе иммуноглобулинов IgG и IgM к расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* в сыворотке крови больных скрытыми формами сифилиса и здоровых индивидов по данным дискриминантного анализа в двух проекциях (Корень1, Корень 2)

Из данного распределения видно, что исследуемые образцы сформировали три кластера в соответствии с дифференцируемыми группами пациентов. Наибольшее расстояние зафиксировано между центроидами кластеров здоровых индивидов и больных ранним скрытым сифилисом (квадратичное расстояние Махаланобиса 33,15), тогда как группа больных поздним скрытым сифилисом расположена на меньшем расстоянии от группы здоровых индивидов (квадратичное расстояние Махаланобиса 11,94) вероятно, из-за длительности заболевания, достаточной для относительно низкого уровня тропо-

нема-специфических иммуноглобулинов. Группы больных с ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом наименее удалены друг от друга, квадратичное расстояние Махаланобиса составило 11,10. Различия между значениями переменных всех дифференцируемых групп статистически достоверны,  $p < 0,00001$  в попарном сравнении групп больных скрытыми формами сифилиса и группы здоровых индивидов.

Итоговая дискриминация между группами была высоко значима ( $\lambda$  Уилкса 0,31; F-исключения 9,8;  $p < 0,00001$ ). Наибольшее значение ( $p < 0,00001$ ) имели данные определения антител класса IgG против антигенов Tr17 ( $\lambda$  Уилкса 0,061; F-исключения максимальный 17,5), Tr0971 ( $\lambda$  Уилкса 0,052; F-исключения 12,0), Tr0163 ( $\lambda$  Уилкса 0,051; F-исключения 11,6). Далее по значимости ( $p < 0,001$ ) за ними шли данные определения антител класса IgG против антигенов Tr0965 ( $\lambda$  Уилкса 0,044; F-исключения 7,6) и Tr0319 ( $\lambda$  Уилкса 0,043; F-исключения 6,7). Из данных определения антител класса IgM наиболее значимыми для классификации ( $p < 0,001$ ) были данные IgM к антигенам Tr0277 ( $\lambda$  Уилкса 0,041; F-исключения 6,0) и Tr0453 ( $\lambda$  Уилкса 0,041; F-исключения 5,7). Вклад в классификацию других переменных данной модели, а именно данных антител IgG к антигенам Tr1038, Tr0277, Tr0684 и данных антител IgM к антигенам Tr47 и Tr1038, был также статистически значимым ( $p < 0,05$ ), значения  $\lambda$  Уилкса находились в пределах 0,036-0,038, F-исключения в пределах 3,0-4,4.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности определения уровня антител классов IgG и IgM к расширенной панели из 12 антигенов *T. pallidum* для лабораторной диагностики сифилиса. Интегральный учет результатов обнаружения двух классов антител с высокой эффективностью позволяет решать следующие задачи: 1) выявление сифилитической инфекции; 2) вероятностной дифференциации отдельных форм сифилиса (ранний скрытый и поздний скрытый).

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Современная диагностика сифилиса сталкивается с рядом трудностей, в частности, при определении скрытых форм сифилиса, поскольку бессимптомное течение данных форм не дает возможности получения образцов возбудителя текущей инфекции. Основными методами лабораторных исследований в этом случае являются серологические тесты, как нетрепонемные, так и трепонемные, и их диагностические характеристики напрямую связаны со спектром применяемых антигенов.

Получение рекомбинантных аналогов антигенов бледной трепонемы стало переходом к новой высокоточной и многоплановой диагностике сифилитической инфекции. В связи с этим работы по изучению протеома *T. pallidum* вывели на новый уровень возможность поиска серореактивных белков, кандидатных антигенов бледной трепонемы, для повышения точности результатов диагностических исследований. В настоящей работе были проведены исследования по изучению белков *T. pallidum*, не используемых в настоящее время в качестве антигенов для серодиагностики сифилиса.

В рамках описанных в настоящей работе исследований был применен подход многоэтапного отбора кандидатных белков с использованием как опубликованных данных пилотных протеомных скринингов, так и методов математического моделирования и прогнозирования клеточной локализации белков с применением биоинформатических ресурсов для анализа структурных доменов аминокислотных последовательностей.

Определение клеточной локализации и структурных элементов исследуемых белковых молекул в большинстве случаев соответствовало данным, представленным в международных информационных базах молекулярно-биологических данных *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) и *UniProt* (*The Universal Protein Resource*). Цитоплазматическое расположение было определено и подтверждено внешними ресурсами для белков Tr0108, Tr0216, Tr0886 и Tr1038. Для белков Tr0259 и Tr0277 результаты проведенного анализа показали расположение в цитоплазме. В публикации Brinkman M.B. с соавт. есть указание на предположительную цитоплазматическую локализацию для белка Tr0277 [36]. Вместе с тем белок Tr0277 в описании протеома *T. pallidum* представлен как периплазматический, однако базы данных *NCBI* и *UniProt* не содержат информации о клеточной локализации данного белка.

Анализ последовательности белка Tr0608 программами *PSORTb 3.0* и *Cello* позволил предположить его цитоплазматическую локализацию, однако в базе данных *UniProt* он описан как интегральный мембранный компонент с трансмембранным альфа-спиральным участком (который был также определен и программой *TMHMM*). Такой же результат анализа был получен для белка Tr0965.

Белками наружной мембраны были определены Tr0326 и Tr0453, что полностью соответствует доступной на сегодняшний день информации о данных белках. Белок Tr0769 был охарактеризован как мембранный белок наружной или внутренней мембраны, и это частично совпадает с описанной локализацией на наружной мембране в базе *UniProt* при отсутствии трансмембранных участков. Для белка Tr0136 была спрогнозирована секреторируемая форма, однако база данных *UniProt* описывает его как белок цитоплазматической мембраны и подтверждает это наличием  $\alpha$ -спирального трансмембранного домена. Белок Tr0249 является периплазматическим флагеллином, что совпадает с результатом прогнозирования программой *PSORTb 3.0*, однако опровергает результат прогнозирования программой *Cello* данного белка как цитоплазматического. Клеточная локализация белков Tr0163, Tr0319, Tr0684 и Tr0971 не была спрогнозирована однозначно, присутствовали варианты цитоплазматической или периплазматической локализации, а также расположения на цитоплазматической мембране. В итоге с учетом комбинации полученных результатов анализа все эти белки были отнесены к белкам, локализующимся на внутренней мембране бледной трепонемы, что далее подтвердилось характеристикой в базе данных *UniProt*. Таким образом, для 8 из 17 белков клеточная локализация была спрогнозирована однозначно верно, для 9 прогнозирование было неточным и потребовало дополнительного уточнения, из чего можно сделать вывод, что использование программ *PSORTb 3.0* и *Cello* может применяться для прогнозирования клеточной локализации белков с дополнительными уточнениями вспомогательных программ.

Если говорить о результатах определения  $\beta$ -складчатых участков, то можно отметить, что два белка, описанных в литературе с локализацией на наружной мембране, были однозначно охарактеризованы содержанием таких участков. Третий белок, для которого в базе *UniProt* показана локализация на наружной мембране (Tr0769), был определен программой *Cello* неоднозначно, как белок либо цитоплазматической, либо наружной мембраны. Окончательное решение было принято в сторону локализации Tr0769 на

цитоплазматической мембране на основании отсутствия в структуре данного белка  $\beta$ -складчатых участков и  $\alpha$ -спиралей, однако это заключение не соответствовало данным базы *UniProt*. Таким образом, можно сделать вывод, что  $\beta$ -складчатые участки являются характеристикой белков наружной мембраны в случае *T. pallidum*, однако их наличие не является обязательным условием для данного типа локализации.

Обнаружение  $\alpha$ -спиральных трансмембранных участков помогло уточнить локализацию трех белков (Tr0136, Tr0608 и Tr0965) на цитоплазматической мембране. Для двух белков наружной мембраны Tr0453 и Tr0326 также было определено наличие  $\alpha$ -спиральных трансмембранных участков. Однако, кроме уже указанных трех белков цитоплазматической мембраны, для белков Tr0163, Tr0319 и Tr0971 не было найдено трансмембранных  $\alpha$ -спиралей, но была показана мембранная локализация, что говорит о возможном прикреплении данных белков к мембране с помощью липидных фрагментов. Из всех исследуемых белков подтверждение наличия  $\alpha$ -спиральных трансмембранных участков в структуре белка найдено в базе *UniProt* только для белка Tr0608. Из этого можно сделать вывод о целесообразности поиска  $\alpha$ -спиральных трансмембранных участков для мембранных белков и расширения подобных данных для широкого спектра белков, однако отсутствие описанных участков не исключает мембранной локализации исследуемого белка.

Для всех белков с сигнальной последовательностью по результатам исследования программой *SignalP 3.0* прогнозирование было подтверждено данными базы *UniProt*. Точность полученных результатов говорит о надежности прогнозирования этого фрагмента структуры белков с применением программы *SignalP 3.0*. Дополнительным подтверждением служит и отсутствие прогнозируемых сигнальных последовательностей у белков с цитоплазматической локализацией, тогда как в одном случае (Tr0965) белок с локализацией на цитоплазматической мембране не имел сигнального пептида и изначально был определен как цитоплазматический.

Прогнозирование липидных модификаций белков программами *UiB Lipo* и *Lipo P* различилось только в случае двух белков, а именно Tr0163 и Tr0684. Проверка консенсусных последовательностей липобоксов в структуре данных белков подтвердила их липидирование, однако база данных *UniProt* описывает в качестве липопротеина только Tr0684. Отсюда можно сделать вывод, что прикрепление липидных радикалов к белковым продуктам необходимо проверять несколькими методиками.

В итоге можно увидеть, что биоинформатическое прогнозирование клеточной локализации базируется на использовании многих программных ресурсов и уточнение результата дает возможность верифицировать и получить в итоге точные данные о характере расположения данного белка внутри клетки. Из этого можно сделать вывод, что результаты подобного прогнозирования являются достоверными и могут быть экстраполированы на малоизученные белки при подборе кандидатных антигенов для диагностики бактериальных инфекций.

По результатам биоинформатического анализа были отобраны наиболее интересные и разнообразные белки, как наружной, так и внутренней мембраны, цитоплазматические белки, содержащие липидные группы и без липидной модификации. В разработку и дальнейшие серологические исследования были включены: белок внешней мембраны Tr0453 (липопротеин), белки цитоплазматической мембраны Tr0319 (липопротеин), Tr0684 (липопротеин) и Tr0965 (нелипидный), а также белки цитоплазмы Tr0277 (нелипидный) и Tr1038 (нелипидный). Для каждого из них была описана высокая или средняя серореактивность с соответствующими антителами в сыворотке крови больных сифилисом. Таким образом была реализована возможность анализа иммуногенности белков различной структуры и клеточной локализации.

Полученные генно-инженерные экспрессионные системы для каждого из отобранных белков содержали соответствующий ген и позволили сформировать соответствующие штаммы-продуценты, которые в дальнейшем применялись для синтеза и очистки фракций рекомбинантного белкового продукта в количествах, достаточных для проведения ИФА и нРИФ на активированных стеклах. Подобные системы были сконструированы ранее для Tr0277, Tr0319, Tr0684 и Tr1038 в исследовании М.В. Brinkman с соавт. при создании рекомбинантных экспрессионных библиотек *T. pallidum*, которые были получены путем клонирования кодирующей последовательности целевых белков в вектор-донор с последующей гомологичной рекомбинацией *Cre-loxP* [36]. Однако разработанные в настоящей работе экспрессионные системы отличались от описанных М.В. Brinkman с соавт. деталями клонирования (прямое клонирование в экспрессионный вектор) и подходом к хроматографической очистке. В других опубликованных исследованиях также описаны варианты успешного клонирования отдельных белков бледной трепонемы, таких как Tr0453, Tr0965 и Tr1038 [161, 100, 150, 83], что подтверждает надежность применения данного подхода для получения рекомбинантных аналогов

белков *T. pallidum*. Полученные в настоящей работе экспрессионные системы и штаммы-продуценты были созданы для формирования расширенной диагностической панели антигенов, подтверждены результатами секвенирования и масс-спектрометрии. Полученные рекомбинантные белки дали основу для проведения всех последующих экспериментов, а также сами по себе стали новой разработкой с большим практическим значением.

Характеристика каждого полученного антигена как классическим ИФА, так и методом нРИФ на стеклянных слайдах позволила описать их чувствительность, специфичность и диагностическую эффективность. Липопротеин Tr0453 показал одни из самых высоких показателей среди исследуемых белков *T. pallidum* как по данным ИФА и нРИФ, которые согласовывались с результатами опубликованных ранее исследований. К примеру, Smith В. С. с соавт. описывают снижение значений чувствительности для данного белка в группе первичного сифилиса (96 %) при 100 % чувствительности в группах других форм сифилиса [150]. В настоящем исследовании по данным нРИФ общая чувствительность Tr0453 в группе первичного сифилиса составила 75 %, остальные группы – 100 %. Результаты оценки специфичности сходятся на значении 100 % для данного белка. Эти данные несколько отличаются от результатов скрининга иммунопротеома McGill М.А. с соавт., в котором наибольшая серореактивность Tr0453 была показана при первичном сифилисе, а при поздних скрытых формах отсутствовала [108]. Только в работе Brinkman М.В. с соавт. серореактивность данного белка показана не была [36], однако подавляющее число публикаций, характеризующих данный антиген как высокоиммуногенный, вместе с полученными результатами настоящей работы подтверждают ценность Tr453 в качестве дополнительного диагностического антигена *T. pallidum*.

Белок Tr0319 в настоящем исследовании по результатам ИФА показал довольно средние значения чувствительности и специфичности (59,7 % и 62,5 %, соответственно), однако по данным экспериментов в формате нРИФ было видно, что общая чувствительность снижается за счет показателей в группах первичного и позднего скрытого сифилиса, которые не превышают 50,0 %. Диагностически наиболее ценными стали результаты группы раннего скрытого сифилиса, где чувствительность достигла 95,8 %, а также была выявлена высокая специфичность (97,8 %) и положительная предсказательная ценность (98,2 %). Сравнение с опубликованными ранее данными, которые характери-



зуют Tr0319 как серореактивный белок при всех формах сифилиса [36, 108], подтверждает достоверность полученных результатов и целесообразность включения Tr0319 в панель диагностически значимых антигенов *T. pallidum*.

Цитоплазматический белок Tr1038 показал достаточно низкую серореактивность как в ИФА (76,2 %), так и в исследованиях нРИФ с образцами всех групп больных сифилисом (9,1–22,2 %). Это расходится с некоторыми опубликованными ранее данными, в частности, с результатами Jiang С. с соавт., в соответствии с которыми для Tr1038 была показана чувствительность 93,3–100,0% [83]. Скрининг McGill М.А. с соавт. описывает высокую серореактивность олигомерного Tr1038, и низкую – мономерного [108], что может быть объяснением полученных в настоящем исследовании результатов. В исследовании Brinkman М.В. с соавт. даны пограничные результаты серореактивности для Tr1038 в мономерной форме, превышение значений группы здоровых в 1,1 и 2,2 раза в группах первичного и раннего скрытого сифилиса соответственно [36]. Вследствие этого стоит с осторожностью применять данный белок в качестве диагностического антигена и учитывать образование его олигомерной формы. В дополнение к этому, полученные в настоящей работе данные однозначно сходятся с результатами других исследований в оценке специфичности данного белка – 100,0 % [83]. Отсюда можно сделать вывод об ограниченном спектре задач для применения Tr1038 в качестве диагностического антигена.

Для белка Tr0965 в рамках исследований методом ИФА было получено высокое значение чувствительности (94,0 %) и среднее специфичности (56,0 %), однако в рамках нРИФ показатели чувствительности значительно отличались и были ниже 30,0 % для всех групп больных сифилисом. Эти данные контрастируют с чувствительностью более 95,0 % и специфичностью 100,0 %, описанными в работе Long F.Q. с соавт. [100], а также с данными о средней серореактивности Tr0965 в группах первичного, вторичного, раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса в скрининге McGill М.А. с соавт. [108]. Полученные в настоящей работе данные не подтверждают опубликованные ранее исследования, в связи с чем Tr0965 требует отдельного внимательного рассмотрения в качестве диагностического антигена.

Цитоплазматический белок Tr0277 показал специфичность 100 % в исследованиях ИФА (без ложноположительных результатов) и нРИФ, а наибольшую специфичность (более 75,0 %) в группах вторичного и раннего скрытого сифилиса. Значимость данного

антигена в группе раннего скрытого сифилиса также была описана в работе Brinkman M.V. с соавт., где уровень антител против Tr0277 достоверно значимо превышал соответствующее значение группы здоровых индивидов [36]. Таким образом, Tr0277 можно расценивать как важный диагностический антиген для ранних скрытых форм сифилиса.

Белок Tr0684 по результатам проведенных исследований ИФА был охарактеризован низкими значениями как чувствительности, так и специфичности (53,9 % и 30,0 % соответственно), тогда как данные нРИФ показали высокую специфичность (100,0 %) и очень низкую чувствительность (16,9 %) для данного белка. По данным, опубликованным Brinkman M.V. с соавт., уровень антител к Tr0684 в крови больных сифилисом превышает таковой уровень в группе здоровых индивидов в 6,8–19,0 раз [36], а в скрининге McGill M.A. с соавт. описана высокая серореактивность при всех формах сифилиса [108]. Это несоответствие полученных данных и опубликованных ранее результатов оставляет возможность для дальнейшего изучения Tr0684 в качестве антигена, но требует внимательного рассмотрения его для включения в состав диагностических систем.

На основании вышесказанного был сделан вывод, что наиболее перспективными по индивидуальной оценке ИФА и нРИФ являются белки Tr0453, Tr0319 и Tr0277, первые два из которых – мембранные липопротеины, а третий – белок цитоплазмы. В этой связи подтверждается теория об иммуногенности липидированных белков, высокий уровень антител к которым детектируется в крови больных сифилисом при всех формах сифилиса в случае Tr0453 и при вторичном и раннем скрытом сифилисе в случае Tr0319. Впоследствии первый из этих белков может быть ценен как антиген качественного анализа заболевания, а второй – для дифференциальной диагностики разных форм сифилиса. Белок Tr0277 – цитоплазмный, и не вызывает значительного повышения уровня соответствующих антител у больных первичным или поздним скрытым сифилисом. Такие белки могут играть роль в диагностике и дифференциации отдельных форм данного заболевания. Неоднозначные результаты исследования белков Tr0684, Tr0965 и Tr1038 оставляют открытым вопрос о значении отдельных белковых молекул для диагностических целей, при этом стоит также учитывать и индивидуальные характеристики каждого кандидатного антигена.

Оценка вклада совокупности всех исследуемых белков в диагностику сифилиса была охарактеризована на иммуночипах в сравнении расширенной панели из 10 антигенов с панелью из 4 антигенов, традиционно применяемых для трепонема-

специфической диагностики сифилиса. В случае расширенной панели антигенов *T. pallidum* было получено значительное увеличение как показателей чувствительности (с 71,8 % до 90,6 %), так и показателей общей диагностической эффективности (с 82,3 % до 94,6 %) при неизменной специфичности 100,0%. Согласно опубликованным данным, чувствительность традиционно применяемых рекомбинантных антигенов в диагностике методом ИФА варьируется в зависимости от формы заболевания и составляет в среднем 85,0 % для манифестных и 75,1 % для скрытых форм сифилиса [80, 141, 154]. По данным Binnicker M.J. с соавт. совокупность 4 антигенов дает чувствительность 93,8–96,9 % [26], однако в литературе нет указаний на тестирование панели 4 «классических» совместно с другими дополнительными (исследуемыми в настоящей работе) антигенами, поэтому невозможно оценить вклад новых антигенов в общую эффективность методики опубликованных исследований. Можно предположить, что даже высокая чувствительность и эффективность диагностики могла бы быть увеличена с расширением панели дополнительными антигенами, как это было показано в настоящем исследовании. Абсолютные значения чувствительности и специфичности, безусловно, являются важнейшими характеристиками применяемых диагностических методик, однако при их совершенствовании несомненной ценностью является возможность сравнения этих характеристик до и после внесения изменений, то есть, в данном случае серореактивности классических и новых рекомбинантных белков в едином эксперименте на одной выборке больных сифилисом и здоровых индивидов. Таким образом, результаты проведенного исследования однозначно указывают на целесообразность расширения панели диагностических антигенов *T. pallidum* для трепонема-специфической диагностики сифилиса путем включения в неё ряда новых рекомбинантных белков с высокими аналитическими характеристиками.

Другим важным аспектом настоящей работы является демонстрация проведения подобных исследований в формате иммуночипа, возможности которого, вместе с высокой технологичностью анализа, дают многопараметрический характер получаемого результата, со значениями 90,6 % чувствительности и 100 % специфичности серодиагностики сифилиса. Дальнейшее развитие предложенного подхода в перспективе должно позволить комплексно решать основной спектр задач лабораторной серодиагностики сифилиса, включающих выявление факта заболевания, уточнение диагноза и вероятностную дифференцировку его форм.

Эффективность иммуночипа с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* была продемонстрирована и для решения таких задач, как вероятностная дифференциация форм сифилиса на основе серологического анализа профиля антител к 10 антигенам *T. pallidum*. Совокупность полученных результатов подтвердила исходное предположение о варьировании иммунного ответа на отдельные антигены *T. pallidum* в динамике сифилитической инфекции. Так, оценка специфических антител к белку Tr0277 (С-концевой протеазе), согласуясь с представлениями о целесообразности его включения в состав диагностических антигенных композиций [патент WO 2006138324 A2], свидетельствовала о перспективе его использования в первую очередь для подтверждения диагноза первичного сифилиса. Ранее охарактеризованный антиген Tr0965 (локализованный на внутренней цитоплазматической мембране белок с транспортной функцией) [100] индуцировал наибольшую продукцию специфических антител при вторичном сифилисе, что может быть объяснено его участием в генерализации инфекционного процесса через активацию клеток эндотелия и регуляцию проницаемости эндотелиального барьера [172]. В свою очередь функционирование белка Tr1038 (TrF1) в качестве железо-связывающего трансферрина [158], одновременно играющего важную роль в подавлении Т-клеточного иммунного ответа через стимуляцию выброса специфических цитокинов, в частности - трансформирующего ростового фактора TGF- $\beta$  [17], может служить объяснением выраженного иммунного ответа на этот антиген при переходе к персистирующим формам сифилитической инфекции. Наконец центральная роль белка Tr0684 (Mgl-B) в обеспечении *T. pallidum* глюкозой и галактозой путем их активного транспорта из внутренней среды организма хозяина в бактериальную клетку [31], является наиболее вероятной причиной устойчивого роста интенсивности иммунного ответа на данный антиген при позднем скрытом сифилисе.

Выявленные особенности серореактивности антигенов *T. pallidum* позволили приблизиться к решению задачи вероятностной серологической дифференциации различных форм сифилиса, имеющей теоретическое и экспериментальное обоснование [36; 108]. Предложенным решением стало использование метода многомерной статистики – дискриминантного анализа, позволяющего учесть всю совокупность полученных данных и превратить отличия в профилях антигенной специфичности детектируемых антител в интегральные дифференцирующие критерии. Достигнутая с использованием подобного подхода дифференциация образцов сыворотки больных сифилисом и здоровых

индивидов могла быть оценена как успешная (эффективность дифференциации достигала 100 %), однако при сравнении отдельных форм сифилиса она позволила приблизиться лишь к 75 %.

Результаты проведенного исследования впервые демонстрируют возможность совершенствования серологической диагностики сифилиса, ориентированную на построение лабораторного алгоритма дифференциации форм этого заболевания и основанную на учете интенсивности иммунного ответа на отдельные антигены *T. pallidum*. В то же время достигнутая в настоящем исследовании эффективность дифференциации оказывается еще недостаточно высокой, что требует совершенствования используемого диагностического и статистического инструментария. При этом одним из направлений подобного поиска должно стать расширение панели антигенов *T. pallidum*, характеризующихся альтернативным характером экспрессии при различных формах заболевания, а другим возможным решением – применение более мощных статистических инструментов (в частности, технологии «нейронных сетей»), позволяющих дополнительно повысить аналитическую эффективность проводимого лабораторного исследования.

В настоящем исследовании также показана эффективность серодиагностики отдельных форм сифилиса при использовании панели из 12 диагностических антигенов *T. pallidum* и определении уровня синтезируемых к ним антител двух классов (IgG и IgM). Методом дискриминантного анализа определены наиболее информативные для дифференциального диагноза антигены с формируемыми к ним антителами. 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. Это позволило с вероятностью 88,9% и 94,4%, соответственно, провести дифференциацию исследуемых образцов сыворотки крови больных скрытым сифилисом на группы с ранней и поздней формами. Надежность проводимых исследований характеризует также

100% выявление образцов здоровых индивидов. Возможности подобной дифференциации ранее не были описаны в литературе.

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 происходящим 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*.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности определения антител к 12 антигенам *T. pallidum* для лабораторной диагностики сифилиса. Общий анализ результатов с высокой эффективностью позволяет решать задачи вероятностной дифференциации отдельных форм сифилиса (ранний скрытый и поздний скрытый). Тем самым полученные результаты характеризуют разработанный иммуночип с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* и метод его использования как новый подход к серологической диагностике сифилиса с высокой диагностической эффективностью и широким спектром решаемых задач.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вследствие увеличения доли скрытых форм сифилиса наиболее значимое место в диагностике данного заболевания занимают непрямые серологические методы. Диагностические показатели трепонемных тестов варьируются в зависимости от используемого набора рекомбинантных белков *T. pallidum*, вследствие чего одним из наиболее значимых направлений совершенствования серодиагностики сифилиса стало расширение спектра применяемых антигенов *T. pallidum* с выраженной иммуногенностью и специфичностью для разработки высокоэффективных методов серодиагностики различных форм сифилиса.

В настоящей работе были проведены исследования по совершенствованию трепонема-специфической серологической диагностики сифилиса с применением расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* в формате белкового чипа (иммуночипа). Впервые был применен подход многоэтапного отбора кандидатных белков с использованием как опубликованных данных пилотных протеомных скринингов, так и методов прогнозирования клеточной локализации белков с применением биоинформатических ресурсов для анализа структурных доменов аминокислотных последовательностей. По результатам биоинформатического анализа были отобраны наиболее интересные и разнообразные белки, как внешней, так и внутренней мембраны, цитоплазматические белки, содержащие липидные группы и без липидной модификации. В разработку и дальнейшие серологические исследования были включены: белок внешней мембраны Tr0453 (липопротеин), белки цитоплазматической мембраны Tr0319 (липопротеин), Tr0684 (липопротеин) и Tr0965 (нелипидный), а также белки цитоплазмы Tr0277 (нелипидный) и Tr1038 (нелипидный). Для указанных белков были сконструированы генно-инженерные экспрессионные системы, гетерологическая экспрессия которых в штаммах-продуцентах позволила получить соответствующие рекомбинантные белки для проведения ИФА и нРИФ на активированных стеклах. С применением сыворотки крови больных первичным, вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом, а также больных боррелиозом и здоровых индивидов указанные белки были охарактеризованы в качестве антигенов, а именно определена их чувствительность, специфичность и диагностическая эффективность, положительная и отрицательная предска-

тельная ценность. Наиболее перспективными по индивидуальной оценке являются белки Tr0453, Tr0319 и Tr0277.

Расширенная панель рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, включающая четыре традиционно используемые (Tr15, Tr17, Tr47, TmpA) и шесть разработанных в настоящей работе рекомбинантных антигенов (Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0965, Tr0277 и Tr0684), была реализована в формате белкового чипа (иммуночипа). Оценка вклада совокупности всех исследуемых белков в диагностику сифилиса была охарактеризована сравнением расширенной панели из 10 антигенов с панелью из 4 антигенов, регламентированных для трепонема-специфической диагностики сифилиса. В случае расширенной панели антигенов *T. pallidum* было получено значительное увеличение как показателей чувствительности (с 71,8 % до 90,6 %), так и показателей общей диагностической эффективности (с 82,3 % до 94,6 %) при специфичности 100,0 %.

Эффективность иммуночипа с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* была продемонстрирована и для вероятностной дифференциации форм сифилиса на основе серологического анализа профиля антител к 10 антигенам *T. pallidum*. Совокупность полученных результатов подтвердила исходно выдвинутое предположение о варьировании иммунного ответа на отдельные антигены *T. pallidum* в динамике сифилитической инфекции. Интегральный учет интенсивности иммунного ответа на данную совокупность рекомбинантных антигенов *T. pallidum* позволил с точностью от 27,3 % до 69,0 % проводить лабораторную дифференциацию различных форм этого заболевания. Также показана эффективность дифференциации серодиагностики отдельных форм сифилиса при использовании панели из 12 диагностических антигенов *T. pallidum* и определении уровня синтезируемых к ним антител двух классов (IgG и IgM). Это позволило с вероятностью 88,9% и 94,4%, соответственно, провести дифференциацию исследуемых образцов сыворотки крови больных ранним и поздним скрытым сифилисом.

Полученные результаты составили основу для разработки новой диагностической методики с применением иммуночипа, основанного на использовании расширенной панели рекомбинантных белков *T. pallidum*, и обеспечивающего высокую эффективность лабораторного выявления трепонема-специфических антител. Применение предложенного подхода позволяет комплексно решать основной спектр задач лабораторной серодиагностики данного заболевания, включающих выявление ранних и скрытых форм, а также вероятностную дифференциацию скрытых форм сифилиса.



## 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 рЕТ28a(+) 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.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю Д.Г. Дерябину за ведение работы, к.м.н. Г. Л. Катунину (ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, отдел ИППП) за помощь в формировании коллекции образцов сыворотки крови больных сифилисом, к.б.н. И. Ю. Торопыгину (ЦКП «Протеом человека» на базе ФГБНУ «Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича») за помощь в масс-спектрометрической идентификации разработанных рекомбинантных белков *T. pallidum*; к.х.н. М. А. Филипповой (ФГБУН «ИМБ им. В. А. Энгельгардта» РАН, лаборатория биологических микрочипов) за помощь в печати модельной серии иммуночипов с расширенной панелью антигенов *T. pallidum*, д.б.н. А. М. Затевалову (ФГБУ «МНИИ эпидемиологии и микробиологии Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора) за помощь в статистическом анализе полученных данных, а также к.х.н. Хайруллину Р.Ф. (НИЛ «OpenLab Генные и клеточные технологии» Казанского федерального университета) за вклад в становление проекта.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АТФ	– аденозинтрифосфат
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИППП	– инфекции, передаваемые половым путем
ИПТГ	– изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИХЛ	– метод иммунохемилюминесценции
МКБ-10	– международная классификация болезней 10-го пересмотра
кДа	– килодальтон (единица измерения молекулярной массы)
нРИФ	– реакция непрямой иммунофлуоресценции
о.е.	– оптические единицы (измерение оптической плотности)
о.е.ф.	– относительные единицы флуоресценции
ОП	– оптическая плотность
ОП <sub>порог</sub>	– пороговая оптическая плотность
ОРС	– открытая рамка считывания
ОФД	– <i>o</i> -фенилендиамин
п.о.	– пар нуклеотидных оснований (длина фрагментов ДНК)
ПААГ	– полиакриламидный гель-электрофорез
ПСА	– персульфат аммония
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РИБТ	– реакция иммобилизации бледных трепонем
РИФ <sub>абс</sub>	– реакция иммунофлуоресценции с абсорбцией
РМП	– реакция микропреципитации
РМГА	– реакция микрогемагглютинации
РПГА	– реакция пассивной гемагглютинации
РСК	– реакция связывания комплемента
ФЛ	– флуоресценция
ЦНС	– центральная нервная система
ЦСЖ	– цереброспинальная жидкость

ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ABC-transporters	– АТФ-связывающие комплексы транспортных белков ( <i>ATP-binding cassette transporters</i> )
CDC	– Центр контроля и профилактики заболеваний Министерства здравоохранения США ( <i>Centres for Disease Control and Prevention, USA</i> )
CLIA/CIA	– метод иммунохемилюминесценции, ИХЛ ( <i>Chemiluminescence immunoassay</i> )
DFM	– темнопольная микроскопия ( <i>Dark-field microscopy</i> )
ECDC	– Европейский центр профилактики и контроля заболеваний ( <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
EIA	– иммуноферментный анализ, ИФА ( <i>Enzyme immunoassay</i> )
FITC	– флуоресцентный краситель изотиоционат ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
FTA <sub>abs</sub>	– реакция иммунофлуоресценции с абсорбцией, РИФ <sub>абс</sub> ( <i>Fluorescent treponemal antibody absorption</i> )
His-тэг	– фрагмент пептидной цепи из 6 аминокислотных остатков гистидина ( <i>His-tag</i> )
MALDI-TOF	– масс-спектрометрия с матрично-активированной десорбцией/ионизацией ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight</i> )
MFI	– метод проточного иммунофлуоресцентного анализа ( <i>Multiplex flow immunoassay</i> )
MHA-TP	– реакция микрогеммагглютинации, РМГА ( <i>Microhemagglutination assay</i> )
mQ	– вода, очищенная через фильтр 0,22мкм
NCBI	– Национальный центр биотехнологической информации ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
PBS	– фосфатно-солевой буфер ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PBS-T	– фосфатно-солевой буфер с добавлением детергента <i>Tween-20</i>
pH	– показатель кислотности среды ( <i>pondus Hydrogenii</i> – лат.)
POCs	– экспресс-тесты на сифилис ( <i>Point of care tests</i> )

RMP	– реакция микропреципитации, РМП ( <i>Reaction of microprecipitation</i> )
RPR	– тест быстрых плазменных реагинов ( <i>Rapid Plasma Reagin Test</i> )
SAP	– щелочная фосфатаза ( <i>Scrimp alkaline phosphatase</i> )
SDS	– додецилсульфат натрия ( <i>Sodium dodecyl sulfat</i> e)
TAE	– трис-ацетатный буфер ( <i>Tris/Acetic Acid/EDTA</i> )
TPI	– реакция иммобилизации бледных трепонем, РИБТ ( <i>Treponema pallidum immobilization</i> )
ТРНА	– реакция пассивной гемагглютинации, РПГА ( <i>Treponema pallidum haemagglutination</i> )
ТРПА	– реакция пассивной гемагглютинации с использованием полимерных искусственных частиц ( <i>Treponema pallidum particle agglutination</i> )
TRUST	– тест с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой ( <i>Toluidine red unheated serum test</i> )
UniProtKB	– универсальный ресурс информации о белках ( <i>The Universal Protein Resource</i> )
USR	– тест на реагины с непрогретой сывороткой ( <i>Unheated serum reagin</i> )
VDRL	– тест исследовательской лаборатории венерических заболеваний ( <i>Venereal Diseases Research Laboratory</i> )
WB	– иммуноблоттинг ( <i>Western blot</i> )
WHO	– Всемирная организация здравоохранения ( <i>World Health Organization</i> )

**СПИСОК ТЕРМИНОВ**

Антиген	– макромолекулярный компонент микроорганизма, несущий признаки генетически чужеродной информации, который при введении в организм животных или человека вызывает образование специфических антител и специфически реагирует с ними.
Вектор	– самореплицирующаяся в клетке-хозяине молекула ДНК, к которой возможно присоединить изолированный из генома другого организма фрагмент ДНК для обеспечения его репликации.
Иммунопротеом	– часть протеома микроорганизма, обладающая иммуногенными свойствами при жизнедеятельности микроорганизма в условиях организма хозяина.
Иммуночип	– вариант белкового чипа, представляющий собой подложку из стекла или пластика с нанесенными зондами – белковыми антигенами, и предназначенный для выявления взаимодействующих с ними антител.
Открытая рамка считывания	– последовательность нуклеотидов в составе ДНК или РНК, потенциально способная кодировать определенный белок.
Праймер	– олигонуклеотид ДНК для проведения ПЦР.
Протеом	– комплекс белков, проявляющих себя на разных этапах и стадиях жизнедеятельности микроорганизма.
Рекомбинантный белок	– белок, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК, клонированный в экспрессионную систему (вектор) и экспрессированный в гетерологичной клетке-хозяине.
Сайты липидирования	– остатки жирных кислот в первичной структуре белка.
Штамм-продуцент	– изогенные клетки бактерий или микроскопических грибов, обеспечивающие устойчивое воспроизведение вектора в ряду поколений, а также эффективную экспрессию клонированных последовательностей рекомбинантных белков.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Гущин А.Е. Перспективы применения полимеразной цепной реакции для диагностики ранних форм сифилиса. / Гущин А.Е., Фриго Н.В., Дударева Л.А. // Вестник дерматологии и венерологии – 2009. – №.1. – С.45-46.
2. Катунин Г. Л. Использование стандартных серологических методов исследования крови для диагностики скрытого позднего сифилиса / Катунин Г. Л., Рубцов А. Б. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2016. – №. 3. – С. 69-74.
3. Китаева Н. В. Преспективы использования протеомных технологий в диагностике ИППП и заболеваний кожи / Китаева Н. В., Фриго Н. В., Ротанов С. В., Хайрулин Р. Ф. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2010. – №. 4. – С. 17-27.
4. Китаева Н. В. Актуальные проблемы сифилидологии. Современные технологии диагностики сифилитической инфекции / Китаева Н. В., Фриго Н. В., Мелехина Л. Е. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2008. – №. 5. – С. 51-59.
5. Коробко А. В. Сифилис у пациентов с ВИЧ-инфекцией-значение медико-социальных факторов в развитии сочетанной инфекции / Коробко А. В., Орлова И. А., Смирнова Н. В., Дудко В. Ю., Смирнова И. О., Смирнова Т. С., Литвиненко И. В., Пирятинская А. Б., Севашевич А. В., Гайворонская О. В., Иванов А. М. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2014. – Т. 6. – №. 4. – С. 57-63.
6. Красносельских Т. В. Современные стандарты терапии сифилиса: сравнение российских и зарубежных клинических рекомендаций / Красносельских Т. В., Соколовский Е. В. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2015. – №. 2. – С. 23-40.
7. Кубанова А. А. Динамика изменений интенсивных показателей заболеваемости инфекций, передаваемым половым путем, в оценке эпидемиологического процесса и состояния здоровья населения Российской Федерации за 2006–2016 годы / Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2018. – Т.94. – №.1. – С. 27-37.
8. Кубанова А. А. Заболеваемость сифилисом в Российской Федерации за период 2006–2016 г.г. / Кубанова А. А., Кубанов А. А., Мелехина Л. Е. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – №. 5. – С. 16-25.



9. Кубанова А.А. Заболеваемость сифилисом в Российской Федерации за период 2004-2013 г.г. / Кубанова А.А., Мелехина Л.Е., Кубанов А.А., Богданова Е.В. // Вестник дерматологии и венерологии – 2014. – №5. – С. 24-31.
10. Пунченко О. Е. Значение серологических тестов в постановке диагноза сифилиса и оценке эффективности его лечения / Пунченко О. Е., Рищук С. В. // Terra Medica. – 2014. – №. 2. – С. 30-38.
11. Соколовский Е. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы / Соколовский Е., Фриго Н., Ротанов С., Савичев А., Доля О., Китаева Н., Халлен А., Унемо М., Домейка М., Баллард Р. // Вестник дерматологии и венерологии – 2008. – №5. – С.87-96.
12. Смердова М. А. Разработка экспериментальной тест-системы на основе иммуночипа для серодиагностики сифилиса / Смердова, М. А., Маркелов, М. Л., Гушин, А. Е., Судьина, А. Е., Шишова, А. В., Шипулин, Г. А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – №. 6. – С. 54-58.
13. Фриго Н.В. и др. Лабораторная диагностика сифилиса: вчера, сегодня, завтра / Фриго Н. В., Ротанов С. В., Манукьян Т. В., Катунин Г. Л., Суворова А. А., Волков И. А., Китаева Н. В. // Вестник дерматологии и венерологии – 2012. - № 4. – С.16-23.
14. Akins D. R. Lipid modification of the 17-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines macrophage activation as well as amphiphilicity / Akins D. R., Purcell B. K., Mitra M. M., Norgard M. V., Radolf J. D. // Infection and immunity. – 1993. – Vol. 61. – №.4. – P. 1202-1210.
15. Altschul S. F. Basic local alignment search tool / Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. //Journal of molecular biology. – 1990. – Vol. 215. – №. 3. – P. 403-410.
16. Anand A. Bipartite Topology of *Treponema pallidum* Repeat Proteins C/D and I: Outer Membrane Insertion and Porin Function Require a C-terminal  $\beta$ -barrel Domain / Anand A., LeDoyt M., Karanian C., Luthra A., Koszelak-Rosenblum M., Malkowski M. G., Radolf J. D. // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290. –№19. – P. 12313-12331.
17. Babolin C. TpF1 from *Treponema pallidum* activates inflammasome and promotes the development of regulatory T cells / Babolin C., Amedei A., Ozoliņš D., Žileviča A., D’Elios M. M., de Bernard M. //The Journal of Immunology. – 2011. – P. 1100615. – Vol. 187, №3. – P. 1377-1384.

18. Backhouse J. L. *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis / Backhouse J. L., Nesteroff S. I. // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2001. – Vol. 39. – №. 1. – P. 9-14.
19. Baida G. E. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus* / Baida G. E., Kuzmin N. P // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. – 1995. – Vol. 1264. – №2. – P. 151-154.
20. Baker-Zander S. A. Development of cellular immunity to individual soluble antigens of *Treponema pallidum* during experimental syphilis / Baker-Zander S. A., Fohn M. J., Lukehart S. A. // *The Journal of Immunology*. – 1988. – Vol.141 – №12. – P. 4363-4369.
21. Barbulovic-Nad I. Bio-microarray fabrication techniques / Barbulovic-Nad I., Lucente M., Sun Y., Zhang M., Wheeler A. R., Busmann M. // *Critical reviews in biotechnology*. – 2006. – Vol. 26. – №. 4. – P. 237-259.
22. Baughn R. E. Characterization of the antigenic determinants and host components in immune complexes from patients with secondary syphilis / Baughn R. E., McNeely M. C., Jorizzo J. L., Musher D. M. // *The Journal of Immunology*. – 1986. – Vol. 136, №4. – P. 1406-1414.
23. Baughn R. E. Molecular mimicry between an immunodominant amino acid motif on the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* (Tpp47) and multiple repeats of analogous sequences in fibronectin / Baughn R. E., Jiang A., Abraham R., Ottmers V., Musher, D. M. // *The Journal of Immunology*. – 1996. – Vol. 157. – №. 2. – P. 720-731.
24. Becker P. S. Similarity between the 38-kilodalton lipoprotein of *Treponema pallidum* and the glucose/galactose-binding (MglB) protein of *Escherichia coli* / Becker P. S., Akins D. R., Radolf J. D., Norgard M. V. // *Infection and immunity*. – 1994. – Vol. 62, №4. – P. 1381-1391.
25. Berven F. S. BOMP: a program to predict integral  $\beta$ -barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria / Berven F. S., Flikka K., Jensen H. B., Eidhammer I. // *Nucleic acids research*. – 2004. – Vol. 32. – №. suppl\_2. – P. W394-W399.
26. Binnicker M. J. *Treponema pallidum*-specific tests for the serodiagnosis of syphilis: A comparative evaluation of seven assays. / Binnicker M. J., Jespersen D. J., Rollins L. O. // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. – Vol. 49. – № 4 – P. 1313–1317.
27. Birnbaum N. R. Resolving the common clinical dilemmas of syphilis / Birnbaum N. R., Goldschmidt R. H., Buffett W. O. // *American family physician*. – 1999. – Vol. 59. – №8. – P. 2233-40,2245-46.

28. Blanco D. R. Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* genes encoding signal peptides and membrane-spanning sequences using a novel alkaline phosphatase expression vector / Blanco D. R., Giladi M., Champion C. I., Haake D. A., Chikami G. K., Miller J. N., Lovett M. A // Molecular microbiology. – 1991. – Vol. 5. – №. 10. – P. 2405-2415.
29. Blanco D. R. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants / Blanco D. R., Miller J. N., Lovett M. A. // Emerging infectious diseases. – 1997. – Vol. 3. – №. 1. – P. 11-20.
30. Bordet J. Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des Serums antimicrobiens / Bordet J., Gengou B. //Annales de l'institut Pasteur. – 1901. – P. 292-297.
31. Brautigam C. A. The Tp0684 (MglB-2) lipoprotein of *Treponema pallidum*: a glucose-binding protein with divergent topology / Brautigam C. A., Deka R. K., Liu W. Z., Norgard M. V. // PloS One. – 2016. – Vol. 11. – №. 8. – P. e0161022.
32. Brautigam C. A. Insights into the potential function and membrane organization of the TP0435 (Tp17) lipoprotein from *Treponema pallidum* derived from structural and biophysical analyses / Brautigam C. A., Deka R. K., Liu W. Z., Norgard M. V. // Protein Science. – 2015. – Vol. 24. – №1. – P. 11-19.
33. Brautigam C. A. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of TP0435 (Tp17) from the syphilis spirochete *Treponema pallidum* / Brautigam C. A., Deka R. K., Norgard M. V. // Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications. – 2013. – Vol. 69. – №4. – P. 453-455.
34. Brautigam C. A. Biophysical and bioinformatic analyses implicate the *Treponema pallidum* Tp34 lipoprotein (Tp0971) in transition metal homeostasis / Brautigam C. A., Deka R. K., Ouyang Z., Machius M., Knutsen G., Tomchick D. R., Norgard M. V. // Journal of bacteriology. – 2012. – P. JB. 01494-12.
35. Brinkman M. B. A novel *Treponema pallidum* antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin / Brinkman M. B., McGill M. A., Pettersson J., Rogers A., Matějková P., Šmajš D., Palzkill T. // Infection and immunity. – 2008. – Vol. 76. – № 5. – P. 1848-1857.
36. Brinkman M.B. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. / Brinkman M. B., McKeivitt M., McLoughlin M., Perez C., Howell J., Weinstock G. M., Palzkill T. // J Clin Microbiol. – 2006. – Vol.44. – №3. – P.888-891.

37. Cameron C. E. Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein. / Cameron C. E. // *Infection and immunity*. – 2003. – Vol. 71. – №. 5. – P. 2525-2533.
38. Cameron C. E. *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins / Cameron C. E., Brown E. L., Kuroiwa J. M., Schnapp L. M., Brouwer N. L. // *Journal of bacteriology*. – 2004. – Vol. 186. – №. 20. – P. 7019-7022.
39. Cameron C. E. Heterologous expression of the *Treponema pallidum* laminin-binding adhesin Tp0751 in the culturable spirochete *Treponema phagedenis* / Cameron C. E., Kuroiwa J. M., Yamada M., Francescutti T., Chi B., Kuramitsu H. K. // *Journal of bacteriology*. – 2008. – Vol. 190. – №. 7. – P. 2565-2571.
40. Cameron C. E. Opsonic potential, protective capacity, and sequence conservation of the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Tp92 / Cameron C. E., Lukehart S. A., Castro C., Molini B., Godornes C., Van Voorhis W. C. // *The Journal of infectious diseases*. – 2000. – Vol. 181. – №. 4. – P. 1401-1413.
41. Carlson J. A. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity / Carlson J. A., Dabiri G., Cribier B., Sell S. // *The American Journal of dermatopathology*. – 2011. – Vol. 33. – №. 5. – P. 433-460.
42. Castro R. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum* / Castro R., Prieto E. S., Santo I., Azevedo J., Exposto F. D. L. // *Journal of clinical microbiology*. – 2003. – Vol. 41, №1. – P. 250-253.
43. Centurion-Lara A. Gene conversion: a mechanism for generation of heterogeneity in the tprK gene of *Treponema pallidum* during infection / Centurion-Lara A., LaFond R. E., Hevner K., Godornes C., Molini B. J., Van Voorhis W. C., Lukehart S. A. // *Molecular microbiology*. – 2004. – Vol. 52. – №. 6. – P. 1579-1596.
44. Chamberlain N. R. Major integral membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids / Chamberlain N. R., Brandt M. E., Erwin A. L., Radolf J. D., Norgard M. V. // *Infection and immunity*. – 1989. – Vol. 57. – №9. – P. 2872-2877.
45. Chi B. Development of a system for expressing heterologous genes in the oral spirochete *Treponema denticola* and its use in expression of the *Treponema pallidum* flaA gene / Chi B., Chauhan S., Kuramitsu H. // *Infection and immunity*. – 1999. – Vol. 67. – №. 7. – P. 3653-3656.
46. Cockayne A. Analysis of sheath and core structures of the axial filament of *Treponema pallidum* / Cockayne A., Bailey M. J., Penn C. W. // *Microbiology*. – 1987. – Vol. 133. – №6. – P. 1397-1407.

47. Cox D. L. Culture of *Treponema pallidum* / Cox D. L. // Methods in enzymology. – 1993. – Vol. 236. – P. 390-405.
48. Cox D. L. *Treponema pallidum* in gel microdroplets: a novel strategy for investigation of treponemal molecular architecture / Cox D. L., Akins D. R., Porcella S. F., Norgard M. V., Radolf J. D. // Molecular microbiology. – 1995. – Vol. 15. – № 6. – P. 1151-1164.
49. Cox D. L. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum* / Cox D. L., Luthra A., Dunham-Ems S., Desrosiers D. C., Salazar J. C., Caimano M. J., Radolf J. D. // Infection and immunity. – 2010. – Vol. 78. – № 12. – P. 5178-5194.
50. Cullen P. A. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes / Cullen P. A., Haake D. A., Adler B. // FEMS microbiology reviews. – 2004. – Vol. 28. – № 3. – P. 291-318.
51. De Lemos E. A. Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis / de Lemos E. A., Belém Z. R., Santos A., Ferreira A. W. // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2007. – Vol. 58. – № 2. – P. 177-183.
52. Deacon W. E. A fluorescent test for treponemal antibodies / Deacon W. E., Falcone V. H., Harris A. // Experimental Biology and Medicine. – 1957. – Vol. 96. – № 2. – P. 477-480.
53. Dedhar S. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling / Dedhar S., Hannigan G. E. // Current opinion in cell biology. – 1996. – Vol. 8. – № 5. – P. 657-669.
54. Deka R. K. Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein / Deka R. K., Machius M., Norgard M. V., Tomchick D. R. // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277. – № 44. – P. 41857-41864.
55. Deka R. K. The Tp38 (TpMglB-2) lipoprotein binds glucose in a manner consistent with receptor function in *Treponema pallidum* / Deka R. K., Goldberg M. S., Hagman K. E., Norgard, M. V. // Journal of bacteriology. – 2004. – Vol. 186. – № 8. – P. 2303-2308.
56. Deka R. K. The PnrA (Tp0319; TmpC) lipoprotein represents a new family of bacterial purine nucleoside receptor encoded within an ATP-binding cassette (ABC)-like operon in *Treponema pallidum* / Deka R. K., Brautigam C. A., Yang X. F., Blevins J. S., Machius M., Tomchick D. R., Norgard M. V. // Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Vol. 281. – № 12. – P. 8072-8081.
57. Dementieva E. I. Protein microchips in quantitative assays for tumor markers / Dementieva E. I., Rubina A. Y., Darii E. L., Dyukova V. I., Zasedatelev A. S., Osipova T. V., Mirzabekov A. D. //

- Doklady Biochemistry and Biophysics. – Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 2004. – Vol. 395. – №. 1-6. – P. 88-92.
58. Desrosiers D. C. TP0326, a *Treponema pallidum*  $\beta$ -barrel assembly machinery A (BamA) orthologue and rare outer membrane protein / Desrosiers D. C., Anand A., Luthra A., Dunham-Ems S. M., LeDoyt M., Cummings M. A., Radolf, J. D. // Molecular microbiology. – 2011. – Vol. 80. – №. 6. – P. 1496-1515.
  59. Fears M. B. Syphilis fast latex agglutination test, a rapid confirmatory test / Fears M. B., Pope V. // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2001. – Vol. 8. – №. 4. – P. 841-842.
  60. Fieldsteel A. H. Cultivation of virulent *Treponema pallidum* in tissue culture / Fieldsteel A. H., Cox D. L., Moeckli R. A. // Infection and immunity. – 1981. – Vol. 32. – №. 2. – P. 908-915.
  61. Fieldsteel A. H. Further studies on replication of virulent *Treponema pallidum* in tissue cultures of Sf1Ep cells / Fieldsteel A. H., Cox D. L., Moeckli R. A. // Infection and immunity. – 1982. – Vol. 35. – №. 2. – P. 449-455.
  62. Fraser C. M. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete / Fraser C. M., Norris S. J., Weinstock G. M., White O., Sutton G. G., Dodson R., Venter, J. C. // Science. – 1998. – Vol. 281. – №. 5375. – P. 375-388.
  63. Giacani L. Gene organization and transcriptional analysis of the tprJ, tprI, tprG, and tprF loci in *Treponema pallidum* strains *Nichols* and *Sea 81-4* / Giacani L., Hevner K., Centurion-Lara A. // Journal of bacteriology. – 2005. – Vol. 187. – №. 17. – P. 6084-6093.
  64. Gomez E. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 syphilis multiplex flow immunoassay for the detection of IgM-and IgG-class antitreponemal antibodies / Gomez E., Jespersen D. J., Haring J. A., Binnicker M. J. // Clinical and Vaccine Immunology. – 2010. – Vol. 17. – № 6. – P. 966-968.
  65. Haake D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. / Haake D. A. // Microbiology – 2000. – Vol. 146. – №7. – P.1491-1504.
  66. Hanff P. A. Humoral immune response in experimental syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum* / Hanff P. A., Bishop N. H., Miller J. N., Lovett M. A. // The Journal of Immunology. – 1983. – Vol. 131. – №. 4. – P. 1973-1977.
  67. Hardy Jr P. H. Lack of endotoxin in *Borrelia hispanica* and *Treponema pallidum* / Hardy Jr P. H., Levin J. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1983. – Vol. 174. – №. 1. – P. 47-52.

68. Harris A. A Microflocculation Test for Syphilis using Cardioliipin Antigen. Preliminary Report / Harris A. D., Rosenberg A. A., Riedel L. M. // Journal of Venereal Disease Information. – 1946. – Vol. 27. – № 7. – P. 169-74.
69. Hartmann M. Protein microarrays for diagnostic assays / Hartmann M., Roeraade J., Stoll D., Templin M. F., Joos T. O. // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2009. – Vol. 393. – № 5. – P. 1407-1416.
70. Hazlett K. R. O. TP0453, a concealed outer membrane protein of *Treponema pallidum*, enhances membrane permeability / Hazlett K. R., Cox D. L., Decaffmeyer M., Bennett M. P., Desrosiers D. C., La Vake C. J., Radolf J. D. // Journal of bacteriology. – 2005. – Vol. 187. – № 18. – P. 6499-6508.
71. Hensel U. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis immunoblotting as a serological tool in the diagnosis of syphilitic infections / Hensel U., Wellensiek H. J., Bhakdi S. // Journal of clinical microbiology. – 1985. – Vol. 21, № 1. – P. 82-87.
72. Herring A. J. A multi-centre evaluation of nine rapid, point-of-care syphilis tests using archived sera / Herring A. J., Ballard R. C., Pope V., Adegbola R. A., Changalucha J., Fitzgerald D. W., Peeling R. W. // Sexually transmitted infections. – 2006. – Vol. 82. – № 5. – P. 7-12.
73. Heymans R. TprK gene regions are not suitable for epidemiological syphilis typing / Heymans R., Kolader M. E., Van Der Helm J. J., Coutinho R. A., Bruisten S. M. // European journal of clinical microbiology & infectious diseases. – 2009. – Vol. 28. – № 7. – P. 875-878.
74. Hindersson P. Interaction of spirochetes with the host / Hindersson P., Thomas D., Stamm L., Penn C., Norris S., Joens L. A. // Research in microbiology. – 1992. – Vol. 143. – № 6. – P. 629-639.
75. Ho E. L. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease / Ho E. L., Lukehart S. A. // The Journal of clinical investigation. – 2011. – Vol. 121. – № 12. – P. 4584-4592.
76. Hoover K. W. Serodiagnosis of syphilis in the recombinant era: reversal of fortune / Hoover K. W., Radolf J. D. // Journal of Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 204. – № 9. – P. 1295-1296.
77. Huang N. L. Development of a novel protein biochip enabling validation of immunological assays and detection of serum IgG and IgM antibodies against *Treponema pallidum* pathogens in the patients with syphilis / Huang N. L., Ye, L., Schneider M. E., Du Y. X., Xu Y. H., Fan L. B., Du W. D. // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – T. 75. – C. 465-471.
78. Hunter E. F. Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponemal antibody-absorption test for syphilis / Hunter E. F., Russell H. A. R. O. L. D., Farshy C. E.,

- Sampson J. S., Larsen S. A. // Sexually transmitted diseases. – 1986. – Vol. 13. – № 4. – P. 232-236.
79. Hunter E. F. An improved FTA test for syphilis, the absorption procedure (FTA-ABS) / Hunter E. F., Deacon W. E., Meyer P. E. // Public health reports. – 1964. – Vol. 79, № 5. – P. 410-412.
80. Ijsselmuiden O. E. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *Treponema pallidum* protein TmpA for serodiagnosis of syphilis and the potential use of TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy / Ijsselmuiden O. E., Schouls L. M., Stolz E., Aelbers G. N., Agterberg C. M., Top J., Van Embden J. D. // Journal of clinical microbiology. – 1989. – Vol. 27. – № 1. – P. 152-157.
81. Isaacs R. D. Molecular cloning and DNA sequence analysis of the 37-kilodalton endoflagellar sheath protein gene of *Treponema pallidum* / Isaacs R. D., Hanke J. H., Guzman-Verduzco L. M., Newport G., Agabian N., Norgard M. V., Radolf J. D. // Infection and immunity. – 1989. – Vol. 57. – № 11. – P. 3403-3411.
82. Isaacs R. D. Expression in *Escherichia coli* of the 37-kilodalton endoflagellar sheath protein of *Treponema pallidum* by use of the polymerase chain reaction and a T7 expression system / Isaacs R. D., Radolf J. D. // Infection and immunity. – 1990. – Vol. 58. – № 7. – P. 2025-2034.
83. Jiang C. Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis / Jiang C., Zhao F., Xiao J., Zeng T., Yu J., Ma X., Wu Y. // Clinical and Vaccine Immunology. – 2013. – Vol. 20. – № 10. – P. 1563-1568.
84. Ke W. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* TP0136 Protein Is Heterogeneous among Isolates and Binds Cellular and Plasma Fibronectin via its NH 2-Terminal End / Ke W., Molini B. J., Lukehart S. A., Giacani L. // PLoS Negl Trop Dis. – 2015. – Vol. 9. – № 3. – P. 62-64.
85. Kenedy M. R. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins / Kenedy M. R., Lenhart T. R., Akins D. R. // FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2012. – Vol. 66. – № 1. – P. 1-19.
86. Knight C. G. Global analysis of predicted proteomes: functional adaptation of physical properties / Knight C. G., Kassen R., Hebestreit H., Rainey P. B. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – № 22. – P. 8390-8395.
87. Kojima N. An update on the global epidemiology of syphilis / Kojima N., Klausner J. D. // Current epidemiology reports. – 2018. – T. 5. – № 1. – C. 24-38.



88. Kraus S. J. Fluorescent treponemal antibody-absorption test reactions in lupus erythematosus: atypical beading pattern and probable false-positive reactions / Kraus S. J., Haserick J. R., Lantz M. A. // *New England Journal of Medicine*. – 1970. – Vol. 282, № 23. – P. 1287-1290.
89. 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. – Vol. 2017.
90. LaFond R. E. Biological basis for syphilis / LaFond R. E., Lukehart S. A. // *Clinical microbiology reviews*. – 2006. – Vol. 19. – №. 1. – P. 29-49.
91. Larsen S. A. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis / Larsen S. A., Steiner B. M., Rudolph A. // *Clinical microbiology reviews*. – 1995. – Vol. 8, № 1. – P. 1-21.
92. Larsen S.A., Pope V., Johnson R.E., Kennedy E. A manual of tests for syphilis / Larsen S.A., Pope V., Johnson R.E., Kennedy E. // *American Public Health Association*. - Washington, DC, 1998. – P.112-137.
93. Lefevre J. C. Evaluation of the Captia enzyme immunoassays for detection of immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in syphilis / Lefevre J. C., Bertrand M. A., Bauriaud R. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Vol. 28, № 8. – P. 1704-1707.
94. Lei-yang W. Expression, purification and characterization of recombinant Tp0136 from *Treponema pallidum* / Wang L. Y., Chen Z. Z., Fu M. C., He J. M., Li T. T., Shen L., Yang, J. // *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*. – 2011. – Vol. 5. – P. 5-11.
95. Lesiński J. Specificity, sensitivity, and diagnostic value of the TPHA test / Lesiński J., Krach J., Kadziewicz E. // *British Journal of Venereal Diseases*. – 1974. – Vol. 50. – №5. – P. 334-340.
96. Lewis L. L. Evaluation of immunoglobulin M western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis / Lewis L. L., Taber L. H., Baughn R. E. // *Journal of clinical microbiology*. – 1990. – Vol. 28, № 2. – P. 296-302.
97. Li C. The spirochete FlaA periplasmic flagellar sheath protein impacts flagellar helicity / Li C., Corum L., Morgan D., Rosey E. L., Stanton T. B., Charon N. W. // *Journal of bacteriology*. – 2000. – Vol. 182, № 23. – P. 6698-6706.
98. Liu J. Cellular architecture of *Treponema pallidum*: novel flagellum, periplasmic cone, and cell envelope as revealed by cryo electron tomography / Liu J., Howell J. K., Bradley S. D., Zheng Y., Zhou Z. H., Norris S. J. // *Journal of molecular biology*. – 2010. – Vol. 403. – №. 4. – P. 546-561.

99. Liu W. Performance of novel infection phase-dependent antigens in syphilis serodiagnosis and treatment efficacy determination / Liu W., Deng M., Zhang X., Yin W., Zhao T., Zeng T., Zhao F. // *Clinica Chimica Acta*. – 2019. – Vol. 488. – P. 13-19.
100. Long F. Q. Seroreactivity and immunogenicity of Tp0965, a hypothetical membrane protein of *Treponema pallidum* / Long F. Q., Zhang J. P., Shang G. D., Shang S. X., Gong K. L., Wang Q. Q. // *Chinese medical journal*. – 2012. – Vol. 125. – № 11. – P.1920-1924.
101. Lukehart S. A. Identification of *Treponema pallidum* antigens: comparison with a nonpathogenic treponeme / Lukehart S. A., Baker-Zander S. A., Gubish E. R. // *The Journal of Immunology*. – 1982. – Vol. 129. – № 2. – P.833-838.
102. Luthra A. A homology model reveals novel structural features and an immunodominant surface loop/opsonic target in the *Treponema pallidum* BamA ortholog TP0326 / Luthra A., Anand A., Hawley K. L., LeDoyt M., La Vake C. J., Caimano M. J., Radolf J. D. // *Journal of bacteriology*. – 2015. – P. JB. 00086-15. – Vol.197. – №11. – P.1906–1920.
103. Luthra A. The transition from closed to open conformation of *Treponema pallidum* outer membrane-associated lipoprotein TP0453 involves membrane sensing and integration by two amphipathic helices / Luthra A., Zhu G., Desrosiers D. C., Eggers C. H., Mulay V., Anand A., Radolf J. D. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – P. jbc. M111. 305284. Vol.286. – №48 – P. 41656-41668.
104. Magnarelli L. A. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease / Magnarelli L. A., Miller J. N., Anderson, J. F., Riviere G. R // *Journal of clinical microbiology*. – 1990. – Vol. 28. – № 6. – P. 1276-1279.
105. Marangoni A. Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis / Marangoni A., Sambri V., Accardo S., Cavrini F., D'Antuono A., Moroni A., Cevenini, R. // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. – 2005. – Vol. 12. – № 10. – P. 1231-1234.
106. Marangoni A. Evaluation of the BioPlex 2200 syphilis system as a first-line method of reverse-sequence screening for syphilis diagnosis / Marangoni A., Nardini P., Foschi C., Moroni A., D'Antuono A., Reggiani L. B., Cevenini R // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2013. – Vol. 20. – № 7. – P. 1084-1088.
107. Mattei P. L. Syphilis: a reemerging infection / Mattei P. L., Beachkofsky T. M., Gilson R. T., Wisco, O. J. // *American Family Physician*. – 2012. – Vol. 86. – №5. – P. 433-440.

108. McGill M.A. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. / Mattei P. L., Beachkofsky T. M., Gilson R. T., Wisco O. J. // *Infect and Immun.* – 2010. – Vol.78. – № 6. – P.2631-2643.
109. McKeivitt M. Genome scale identification of *Treponema pallidum* antigens. / McKeivitt M., Brinkman M. B., McLoughlin M., Perez C., Howell J. K., Weinstock G. M., Palzkill T. // *Infect and Immun.* – 2005 – Vol. 73. – №7. – P. 4445-4450.
110. McKeivitt M. Systematic cloning of *Treponema pallidum* open reading frames for protein expression and antigen discovery. / McKeivitt M., Patel K., Smajs D., Marsh M., McLoughlin M., Norris S. J., Palzkill T. // *Genome research.* – 2003. – Vol. 13. – №7. – P.1665-1674.
111. Möller S. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions / Möller S., Croning M. D., Apweiler R. // *Bioinformatics.* – 2001. – Vol. 17. – №. 7. – P. 646-653.
112. Nally J. E. Proteomic strategies to elucidate pathogenic mechanisms of spirochetes / Nally J. E., Whitelegge J. P., Carroll J. A. // *Proteomics–Clinical Applications.* – 2007. – Vol.1. – №. 9. – P. 1185-1197.
113. Nelson R. A. Immobilization of *Treponema pallidum* in vitro by antibody produced in syphilitic infection / Nelson Jr, R. A., Mayer M. M // *Journal of Experimental Medicine.* – 1949. – Vol. 89. – №. 4. – P. 369-393.
114. Nichols J. C. Carbon sources utilized by virulent *Treponema pallidum* / Nichols J. C., Baseman J. B. // *Infection and immunity.* – 1975. – Vol. 12, № 5. – P. 1044-1050.
115. Nielsen, H. A. The *Treponema pallidum* immobilization test / Nielsen, H. A., Reyn A. // *Bull World Health Organ.* – 1956. – Vol.14. – № 2. – P.263–288.
116. Norgard M. V. Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of *Treponema pallidum Nichols* in the diagnosis of syphilis / Norgard M. V., Selland C. K., Kettman J. R., Miller J. N. // *Journal of clinical microbiology.* – 1984. – Vol. 20. – № 4. – P. 711-717.
117. Norgard M. V. Cloning and expression of the major 47-kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum* in *Escherichia coli* / Norgard M. V., Chamberlain N. R., Swancutt M. A., Goldberg M. S // *Infection and immunity.* – 1986. – Vol. 54. – №. 2. - P. 500-506.
118. Norris S. J. Antigenic relatedness and N-terminal sequence homology define two classes of periplasmic flagellar proteins of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and *Treponema phagedenis* / Norris S. J., Charon N. W., Cook R. G., Fuentes M. D., Limberger R. J. // *Journal of bacteriology.* – 1988. – Vol. 170. – № 9. – P. 4072-4082.

119. Norris S. J. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema Pallidum* Polypeptide Research Group / Norris S. J. // Microbiological reviews. – 1993. – Vol. 57. – №3. – P. 750-779.
120. Norris S. J. Biology of *Treponema pallidum*: correlation of functional activities with genome sequence data / Norris S. J., Cox D. L., Weinstock G. M. // Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2001. – Vol. 3. – №1. – P. 37-62.
121. Norris S. J. In vitro cultivation of *Treponema pallidum*: independent confirmation / Norris S. J. // Infection and immunity. – 1982. – Vol. 36. – №1. – P. 437-439.
122. Ou Y. Y. TMBETADISC-RBF: Discrimination of  $\beta$ -barrel membrane proteins using RBF networks and PSSM profiles / Ou Y. Y., Gromiha M. M., Chen S. A., Suwa, M. // Computational biology and chemistry. – 2008. – Vol. 32. – №. 3. – P. 227-231.
123. Palmer H. M. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom / Palmer H. M., Higgins S. P., Herring A. J., Kingston M. A // Sexually transmitted infections. – 2003. – Vol. 79, № 6. – P. 479-483.
124. Pangborn M. C. A new serologically active phospholipid from beef heart / Pangborn M. C. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1941. – Vol. 48, № 2. – P.484-486.
125. Peeling R. W. Syphilis. / Peeling R. W., Mabey D., Kamb M. L., Chen X., Radolf J. D., Benzaken A. S. // Nature Reviews. Disease Primers. – 2017. – Vol.3. – №17073. – P.1-21. doi:10.1038/nrdp.2017.73
126. Peeling R. W. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited / Peeling R. W., Hook III E. W. // The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. – 2006. – Vol. 208. – №. 2. – P. 224-232.
127. Peters L. L. Ank3 (epithelial ankyrin), a widely distributed new member of the ankyrin gene family and the major ankyrin in kidney, is expressed in alternatively spliced forms, including forms that lack the repeat domain / Peters L. L., John K. M., Lu F. M., Eicher E. M., Higgins A., Yialamas M., Lux S. E. // The Journal of Cell Biology. – 1995. – Vol. 130, № 2. – P. 313-330.
128. Petersen T. N. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions / Petersen T. N., Brunak S., Von Heijne G., Nielsen, H. // Nature methods. – 2011. – Vol. 8. – №. 10. – P. 785.
129. Purcell B. K. Molecular cloning and characterization of the 15-kilodalton major immunogen of *Treponema pallidum* / Purcell B. K., Chamberlain N. R., Goldberg M. S., Andrews L. P., Robin-

- son E. J., Norgard M. V., Radolf J. D. // *Infection and immunity*. – 1989. – Vol. 57. – №12. – P.3708-3714.
130. Qiu X. H. Evaluation of the Boson Chemiluminescence Immunoassay as a First-Line Screening Test in the ECDC Algorithm for Syphilis Serodiagnosis in a Population with a High Prevalence of Syphilis / Qiu X. H., Zhang Y. F., Chen Y. Y., Zhang Q., Chen F. Y., Liu L., Yang, T. C. // *Journal of clinical microbiology*. – 2015. – Vol. 53. – № 4. – P.1371-1374.
  131. Radolf J. D. Identification and localization of integral membrane proteins of virulent *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* by phase partitioning with the nonionic detergent triton X-114 / Radolf J. D., Chamberlain N. R., Clausell A., Norgard M. V. // *Infection and immunity*. – 1988. – Vol. 56. – №2. – P. 490-498.
  132. Radolf J. D. Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* activate cachectin/tumor necrosis factor synthesis. Analysis using a CAT reporter construct / Radolf J. D., Norgard M. V., Brandt M. E., Isaacs R. D., Thompson P. A., Beutler B. // *The Journal of Immunology*. – 1991. – Vol. 147, №6. – P. 1968-1974.
  133. Radolf J. D. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen / Radolf J. D., Deka R. K., Anand A., Šmajš D., Norgard M. V., Yang X. F. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2016. – Vol. 14. – №. 12. – P. 744.
  134. Radolf J. D. *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins / Radolf J. D. // *Molecular microbiology*. – 1995. – Vol. 16. – №. 6. – P. 1067-1073.
  135. Rathlev T. Hemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* / Rathlev T. // *VDT/RES*. – 1965. – Vol. 77. – P. 65-82.
  136. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis / Ratnam S. // *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. – 2005. – Vol. 16. – №. 1. – P. 45-51.
  137. Reid T. B. Antigenic variation of TprK facilitates development of secondary syphilis / Reid T. B., Molini B. J., Fernandez M. C., Lukehart S. A. // *Infection and immunity*. – 2014. – P. IAI. 02236-14. – Vol. 82– №. 12. – P. 4959–4967.
  138. Rey S. PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria / Rey S., Acab M., Gardy J. L., Laird M. R., DeFays K., Lambert C., Brinkman F. S. // *Nucleic acids research*. – 2005. – Vol. 33. – №. suppl\_1. – P. D164-D168.
  139. Riley B. S. Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells / Riley B. S., Oppenheimer-Marks N., Hansen E. J., Radolf J. D., Norgard M. V. // *Journal of Infectious Diseases*. – 1992. – Vol. 165. – №3. – P. 484-493.

140. Rubina A. Y. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications / Rubina A. Y., Dementieva E. I., Stomakhin A. A., Darii E. L., Pankov S. V., Barsky V. E., Mirzabekov, A. D. // *Biotechniques*. – 2003. – Vol. 34. – № 5. – P. 1008-1023.
141. Sambri V. Evaluation of recomWell *Treponema*, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis / Sambri V., Marangoni A., Simone M. A., D'antuono A., Negosanti M., Cevenini R. // *Clinical microbiology and infection*. – 2001. – Vol. 7. – №4. – P. 200-205.
142. Sampedro-Martinez A. Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis / Sampedro-Martinez A., Padilla-Malo A., Gomez-Camarasa C., Rodriguez-Granger J., Lara-Oya A. // *Journal of microbiological methods*. – 2013. – Vol. 94. – №2. – P. 133-134.
143. Schiller N. L. Catabolism of glucose and fatty acids by virulent *Treponema pallidum* / Schiller N. L., Cox C. D. // *Infection and immunity*. – 1977. – Vol. 16. – №1. – P. 60-68.
144. Schmitz J. L. Laboratory diagnosis of congenital syphilis by immunoglobulin M (IgM) and IgA immunoblotting / Schmitz J. L., Gertis K. S., Mauney C., Stamm L. V., Folds, J. D. // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. – 1994. – Vol. 1. – № 1. – P. 32-37.
145. Schouls L. M. Overproduction and purification of *Treponema pallidum* recombinant-DNA-derived proteins TmpA and TmpB and their potential use in serodiagnosis of syphilis / Schouls L. M., Ijsselmuiden O. E., Weel J., Van Embden J. D. // *Infection and immunity*. – 1989. – Vol. 57. – № 9. – P. 2612-2623.
146. Seña A. C. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century / Seña A. C., White B. L., Sparling P. F. // *Clinical infectious diseases*. – 2010. – Vol. 51. – №6. – P. 700-708.
147. Setubal J. C. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes / Setubal J. C., Reis M., Matsunaga J., Haake D. A. // *Microbiology*. – 2006. – Vol. 152. – № 1. – P. 113-121.
148. Seurnyck-Servoss S. L. Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays / Seurnyck-Servoss S. L., White A. M., Baird C. L., Rodland K. D., Zangar R. C. // *Analytical biochemistry*. – 2007. – T. 371. – № 1. – C. 105-115.
149. Šmajš D. Transcriptome of *Treponema pallidum*: gene expression profile during experimental rabbit infection / Šmajš D., McKevitt M., Howell J. K., Norris S. J., Cai W. W., Palzkill T., Weinstock, G. M. // *Journal of bacteriology*. – 2005. – Vol. 187. – № 5. – P. 1866-1874.

150. Smith B. C. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis / Smith B. C., Simpson Y., Morshed M. G., Cowen L. L., Hof R., Wetherell C., Cameron, C. E. // *Journal of clinical microbiology*. – 2013. – Vol. 51. – №. 1. – P. 105-111.
151. Stamm L. V. Cloning and expression of *Treponema pallidum* protein antigens in *Escherichia coli*. / Stamm, L. V., Bassford Jr, P. J. // *DNA*. – 1982. – T. 1. – №. 4. – C. 329-333.
152. Stamm L. V. Heat shock response of spirochetes / Stamm L. V., Gherardini F. C., Parrish E. A., & Moomaw C. R. // *Infection and immunity*. – 1991. – Vol. 59. – №. 4. – P. 1572-1575.
153. Stebeck C. E. Identification of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* glycerophospho-diester phosphodiesterase homologue / Stebeck C. E., Shaffer J. M., Arroll T. W., Lukehart S. A., Van Voorhis W. C. // *FEMS microbiology letters*. – 1997. – Vol. 154. – №2. – P. 303-310.
154. Sun A. H. Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum* / Sun A. H. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2009. – Vol. 47. – №3. – P. 321-326.
155. Sun R. *Treponema pallidum*-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis / Ran S. U. N., Lai D. H., Ren R. X., Shi L. I. A. N., Zhang H. P. // *Chinese medical journal*. – 2013. – Vol. 126. – №2. – P. 206-210.
156. Sun E. S. Subfamily I *Treponema pallidum* repeat protein family: sequence variation and immunity / Sun E. S., Molini B. J., Barrett L. K., Centurion-Lara A., Lukehart S. A., Van Voorhis W. C. // *Microbes and infection*. – 2004. – Vol. 6. – №. 8. – P. 725-737.
157. ter Huurne A. A. H. M. Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins / ter Huurne A. A. H., Muir S., van Houten M., van der Zeijst B. A., Gaastra W., Kusters J. G // *Microbial pathogenesis*. – 1994. – Vol. 16. – №4. – P. 269-282.
158. Thumiger A. Crystal structure of antigen TpF1 from *Treponema pallidum* / Thumiger A., Polenghi A., Papinutto E., Battistutta R., Montecucco C., Zanotti G. // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2006. – Vol. 62. – № 3. – P. 827-830.
159. Tjalsma H. Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications / Tjalsma H., Schaeps R. M. J., Swinkels D. W. // *Proteomics–Clinical Applications*. – 2008. – Vol. 2. – № 2. – P. 167-180.
160. Tomson F. L. Assessment of cell-surface exposure and vaccinogenic potentials of *Treponema pallidum* candidate outer membrane proteins / Tomson F. L., Conley P. G., Norgard M. V., Hagman K. E. // *Microbes and infection*. – 2007. – Vol. 9. – №11. – P. 1267-1275.

161. Van Voorhis W. C. Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum* / Van Voorhis W. C., Barrett L. K., Lukehart S. A., Schmidt B., Schriefer M., Cameron C. E. // Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41. – № 8. – P. 3668-3674.
162. Walfield A. M. Expression of *Treponema pallidum* antigens in *Escherichia coli* / Walfield A. M., Hanff P. A., Lovett M. A. // Science. – 1982. – T. 216. – №. 4545. – C. 522-523.
163. Wang Y. Preparation of a visual protein chip for detection of IgG against *Treponema pallidum* / Wang Y., Gao W., Wang H., Luo Y. // Molecular biotechnology. – 2005. – T. 31. – № 2. – C. 121-128.
164. Wassermann A. Eine serodiagnostische reaction bei syphilis / Wassermann A. // Dtsh Med Wochenschr. – 1906. – Vol. 32. – P. 745-746.
165. Weinstock G. M. The genome of *Treponema pallidum*: new light on the agent of syphilis / Weinstock G. M., Hardham J. M., McLeod M. P., Sodergren E. J., Norris, S. J. // FEMS Microbiology Reviews. – 1998. – Vol. 22. – №4. – P. 323-332.
166. Xu M. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis / Xu M., Xie Y., Jiang C., Xiao Y., Kuang X., Zhao F., Wu Y. // International Journal of Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 43. – P. 51-57.
167. Yelton D. B. *Treponema phagedenis* encodes and expresses homologs of the *Treponema pallidum* TmpA and TmpB proteins / Yelton D. B., Limberger R. J., Curci K., Malinosky-Rummell F., Slivienski L., Schouls L. M., Charon N. W. // Infection and immunity. – 1991. – Vol. 59. – №10. – P. 3685-3693.
168. Young H. A new recombinant antigen latex agglutination test (Syphilis Fast) for the rapid serological diagnosis of syphilis / Young H., Moyes A., Mcmillan A. // International journal of STD & AIDS. – 1998. – Vol. 9. – №4. – P. 196-200.
169. Yu C. S. Prediction of protein subcellular localization / Yu C. S., Chen Y. C., Lu C. H., Hwang J. K. // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2006. – Vol. 64. – №. 3. – P. 643-651.
170. Yu N. Y. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes / Yu N. Y., Wagner J. R., Laird M. R., Melli G., Rey S., Lo R., Brinkman F. S. // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. – №. 13. – P. 1608-1615.



171. Zhang R. L. Tp17 membrane protein of *Treponema pallidum* activates endothelial cells in vitro / Zhang R. L., Wang Q. Q., Zhang J. P., Yang L. J. // International immunopharmacology. – 2015. – Vol. 25. – №2. – P. 538-544.
172. Zhang R. L. Recombinant *Treponema pallidum* protein Tp0965 activates endothelial cells and increases the permeability of endothelial cell monolayer / Zhang R. L., Zhang J. P., Wang Q. Q. // PloS One. – 2014. – Vol. 9. – №12. – P.1-20.

## Книги

173. Зверев В. В. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. В 2-х т. / Зверев В. В., Бойченко М. Н. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Т. 2. – 480 с.
174. Кубанова А. А. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи / Кубанова А. А., Кубанов А. А., Волнухин В. А. – М.: Инфекции, передаваемые половым путем, 2016. – 786 с.
175. Овчинников Н. М. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем / Овчинников Н. М., Беднова В. Н., Делекторский В. В. – М.: Медицина, 1987. – 304с.
176. Пальцев М.А. Патология человека. В 2-х т. Том 2, часть 1. / Пальцев М.А., Аничков Н.М., Литвицкий П.Ф. – М.: Медицина, 2009. – 576 с.
177. Рубинс А. Дерматовенерология / Рубинс А. Под ред. Кубановой А.А. – М.: Издательство Панфилова, 2011. – 368 с.
178. Скрипкин Ю.К. Кожные и венерические болезни / Скрипкин Ю. К., Кубанова А. А., Акимов В. Г. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 544 с.
179. Gross G. Sexually transmitted infections and sexually transmitted diseases / Gross G., Tying S. K. – Springer, 2011. – 925 p.
180. Radolf J. D. Pathogenic Treponema: molecular and cellular biology / Radolf J. D., Lukehart S. A. – Horizon Scientific Press, 2006. – 466 p.
181. Sanchez J. C. Biomedical applications of proteomics / Sanchez J. C., Corthals G. L., Hochstrasser D. F. – John Wiley & Sons, 2006. – 452 p.
182. Turner T. B. Biology of the treponematoses / Turner, T. B., Hollander, D. H. – World Health Organization, 1957. – 278 p.

## Диссертации

183. McGill M. A. Characterization of humoral immune responses against *Treponema pallidum* antigens. PhD thesis / McGill M. A. – The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston. – 2008. – 96 p.

## Патенты

184. Патент РФ «Композиция для иммобилизации биологических макромолекул в гидрогелях, способ приготовления композиции, биочип, способ проведения ПЦР на биочипе» / Мирзабеков А. Д., Рубина А. Ю., Паньков С. В., Перов А. Н., Чупеева В. В. – Бюл. №2206575; опубликовано 20.06.2003; приоритет от 25.07.2001.
185. Мировой патент «*Treponema pallidum* antigens for vaccine development and diagnostic tests» / Mckevitt M., Palzkill T., Norris S. J. – WO 2006138324 A2, опубликовано 28.12.2006; приоритет от 14.06.2006.

## Интернет-ресурсы

186. Всемирная организация здравоохранения (WHO, *World Health Organization*), отчеты о распространении инфекций, передаваемых половым путем [Электронный ресурс].  
<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stis-surveillance-2015/en/>  
<https://www.who.int/reproductivehealth/publications/stis-surveillance-2018/en/>
187. Американский Центр контроля и профилактики заболеваний Министерства здравоохранения США (CDC, *Centres for Disease Control and Prevention*), статистические данные заболеваемости сифилисом [Электронный ресурс].  
<https://www.cdc.gov/std/stats16/syphilis.htm>  
<https://www.cdc.gov/std/stats17/syphilis.htm>
188. Европейский центр профилактики и контроля заболеваний, (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*), отчет по эпидемиологии сифилиса [Электронный ресурс].  
<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/syphilis-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>

189. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ (Роспотребнадзор), статистические данные заболеваемости сифилисом [Электронный ресурс].  
[http://rospotrebnadzor.ru/activities/statisticalmaterials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=5525](http://rospotrebnadzor.ru/activities/statisticalmaterials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=5525)
190. Клинические рекомендации ВОЗ по лечению сифилиса (*WHO guidelines for the treatment of Treponema pallidum (syphilis)*). 2016) [Электронный ресурс].  
<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/syphilis-treatment-guidelines/en/>
191. Клинические рекомендации по лечению ИППП американского Центра контроля и профилактики заболеваний Министерства здравоохранения США (*Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. Syphilis*. 2015) [Электронный ресурс].  
<https://www.cdc.gov/std/tg2015/syphilis.htm>
192. База данных Национальной лаборатории Лос-Аламоса, США (*Sexual Transmitted Diseases Sequence databases*), информация о белках *T. pallidum* с Tr0001 по Tr1041 [Электронный ресурс].  
<http://stdgen.northwestern.edu/>
193. Сборник статистических материалов «Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и заболеваниями кожи» за 2017-2018 г.г. [Электронный ресурс].  
<http://www.demoscope.ru/weekly/2019/0829/biblio05.php>