

## ВАРЬИРОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА НА АНТИГЕНЫ Tr0277, Tr0684, Tr0965 И Tr1038 *TREPONEMA PALLIDUM* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ СИФИЛИСА

© 2017 г. А.В. Рунина\*, А.М. Затевалов\*\*, Г.Л. Катунин\*,  
Д.Г. Дерябин\*, А.А. Кубанов\*\*\*

\*ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» МЗ РФ, Москва, Россия;

\*\*ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

\*\*\*ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного  
профессионального образования» МЗ РФ, Москва, Россия

Поступила: 02.02.2017. Принята: 22.03.2017

Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотках крови больных первичным, вторичным, ранним и поздним скрытым сифилисом оценено присутствие специфических антител (иммуноглобулинов класса G) к рекомбинантным белкам Tr0277, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 *Treponema pallidum*. Наибольшая интенсивность иммунного ответа на антиген Tr0277 зафиксирована при первичном, Tr0965 – вторичном и Tr1038 – раннем скрытом сифилисе, что сопровождалось 100% чувствительностью проводимого диагностического исследования. Интенсивность иммунного ответа на антиген Tr0684 возрастала при позднем скрытом сифилисе, однако чувствительность серологического исследования с его использованием характеризовалась сниженными значениями. Интегральный учет варьирования иммунного ответа на использованные антигены с применением алгоритма дискриминантного анализа позволил разработать классификационные правила отнесения исследуемых сывороток к одной из четырех групп, соответствующих определенной форме заболевания. Достигнутая эффективность предложенной модели составила 44,4–58,9% и была повышена до 75% при проведении попарного межгруппового сравнения. Полученные данные впервые демонстрируют возможность вероятностной дифференциации различных форм сифилиса на основе анализа профиля антигенной специфичности детектируемых антител.

*Ключевые слова:* сифилис, серологическая диагностика, *Treponema pallidum*, диагностические антигены, Tr0277, Tr0684, Tr0965, Tr1038

### ВВЕДЕНИЕ

Сифилис – инфекционное заболевание, вызываемое бледной трепонемой (*Treponema pallidum*) и характеризующееся рядом стадий (форм) со свойственными для каждой из них клиническими проявлениями, спектрами рекомендуемых лабораторных исследований и схемами антибиотикотерапии [1]. Традиционный подход к установлению формы сифилиса базируется на данных анамнеза и объективного осмотра, что в свою очередь определяет перечень микробиологических и иммунологических методов, назначаемых для подтверждения клинического диагноза. Однако, современные особенности клинического течения сифилиса, а именно, увеличение доли скрытых поздних и неуточненных форм инфекции, определяют актуальность разработки дополнительных лабораторных критериев, направленных на

Адрес: 107076 Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6. Дерябин Дмитрий Геннадьевич. Тел. 8(903)221-39-63 (моб.)

E-mail: dgderyabin@yandex.ru

#### Авторы:

**Рунина А. В.**, научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» МЗ РФ, Москва, Россия;

**Затевалов А. М.**, к.х.н., старший научный сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Катунин Г. Л.**, к.м.н., заведующий отделением сифилидологии ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» МЗ РФ, Москва, Россия;

**Дерябин Д. Г.**, д.м.н., профессор, заведующий отделом лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» МЗ РФ, Москва, Россия;

**Кубанов А. А.**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, Москва, Россия.

оптимизацию дифференциальной диагностики между различными формами данного заболевания.

Фундаментальной основой подобного подхода являются представления о дифференцированной экспрессии генов *Treponema pallidum* в динамике длительно текущего инфекционного процесса, «выключение» или «включение» ряда из которых позволяет возбудителю тонко адаптироваться к изменениям в микроокружении, а также уклоняться от иммунного ответа хозяина [2]. Следствием этого является дифференцированный по антигенной специфичности иммунный ответ на различных стадиях сифилитической инфекции, впервые охарактеризованный в работе Brinkman с соавторами [3] на примере 38 из 908 белков протеома *T. pallidum*. Однако, используемые в современной серологической диагностике рекомбинантные белки Trp15 (Trp0171), Trp17 (Trp0435), Trp47 (Trp0574) и TmpA (Trp0768) *T. pallidum* относятся к так называемым «иммунодоминантным» антигенам, то есть индуцируют выраженный иммунный ответ, как правило, при всех формах сифилиса, в связи с чем основанные на них трепонемаспецифические тесты ориентированы исключительно на подтверждение самого факта заболевания. Цитата (англ): «A confirmed serological test result is indicative of the presence of treponemal antibodies but does not indicate the stage of disease» [4].

Совокупность накопленных данных определила задачу поиска и исследования новых диагностически значимых антигенов *T. pallidum*, требования к которым, наряду с высокой видоспецифичностью и выраженной иммуногенностью, включают дифференцированную экспрессию в динамике инфекционного процесса. На основе литературных данных [3, 5] и собственных результатов биоинформатического анализа [6] показана перспектива подобного использования Trp0136, Trp0249, Trp0259, Trp0326, Trp0453, Trp0608, Trp0684 и некоторых других белков *T. pallidum*, ряд из которых в дальнейшем был клонирован и тестирован в иммуноферментном анализе с сыворотками от больных с различными формами сифилиса. В частности, рекомбинантный белок Trp1038 (TrpF1) характеризовался наиболее высоким уровнем серореактивности в группе больных скрытыми формами сифилиса [7]. В свою очередь наиболее высокие значения чувствительности серологических реакций с использованием рекомбинантного

белка Trp0965, напротив, были показаны в группах больных первичным и вторичным сифилисом с некоторым снижением этого показателя в группе пациентов с поздним скрытым сифилисом [8]. Настоящее исследование расширяет панель используемых антигенов за счет включения в него новых рекомбинантных белков Trp0277 и Trp0684 (Mgl-B), а также впервые представляет описание диагностического алгоритма, ориентированного на решение задачи лабораторной дифференциации форм сифилиса на основе исследования интенсивности иммунного ответа в отношении панели из нескольких рекомбинантных белков *T. pallidum*.

Цель работы: исследование варьирования иммунного ответа на антигены Trp0277, Trp0684, Trp0965 и Trp1038 *T. pallidum* при различных формах сифилиса с определением возможностей создания на этой основе лабораторного дифференцирующего алгоритма.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Антигены T. pallidum.* В работе использованы оригинальные рекомбинантные белки Trp0277, Trp0684, Trp0965 и Trp1038 *T. pallidum*, детальное описание процедуры получения которых приведено ранее [7, 8]. Кратко: экспрессионные системы целевых белков из генома *T. pallidum* штамм *Nichols* создавали на основе вектора pET28a и клонировали в клетках *E. coli* BL-21(DE3). Биосинтез рекомбинантных белков индуцировали изопропил- $\beta$ -D-1-тиогактопиранозидом, а их выделение из бактериальных лизатов проводили с использованием металл-хелатной хроматографии. Соответствие полученных продуктов заявленным целевым белкам подтверждали с использованием масс-спектрометрического анализа. В качестве дополнительного рекомбинантного антигена, входящего в систему современной серологической диагностики сифилиса, использовали Trp17 (Trp0435), являющийся одним из иммунодоминантных липопротеинов внутренней мембраны *T. pallidum* [9]. Каждый белок в концентрации 2 нг/мл наносили на 96-луночные планшеты высокой сорбции (Greiner BioOne, Германия), которые в дальнейшем использовали для постановки твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

*Сыворотки крови опытной и контрольной групп.* Материалом для исследования явились 125 сывороток крови больных сифилисом,

в том числе: первичным — 16, вторичным — 36, ранним скрытым — 39 и поздним скрытым сифилисом — 34. Верификация данных образцов была проведена на основании комплекса клинических данных и результатов серологических исследований, в том числе: реакции микропреципитации (РМП), быстрого плазмареагинового теста (RPR), реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и реакции иммунофлюоресценции (РИФ). Контрольная группа включала 37 сывороток здоровых доноров, не имевших в анамнезе указаний на заболевание сифилисом и показавших отрицательные результаты в регламентированных серологических тестах.

**Иммуноферментный анализ.** Перед проведением исследования образцы сывороток разводили 1:100 в 50 мМ фосфатном буфере с 0,05% Tween-20 и 0,1% бычьего сывороточного альбумина, после чего вносили в лунки планшетов в объеме 100 мкл. После 1 часа инкубации при 37 °С на термостатируемом шейкере планшеты промывали, после чего в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата антител к Fc-фрагменту иммуноглобулина человека с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США) и инкубировали еще 1 час в том же режиме. После удаления несвязанных конъюгатов лунки заполняли 100 мкл раствора о-фенилендиамина (Thermo Scientific, США) в цитратном буфере с 0,03% перекиси водорода и инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,1 М HCl, после чего регистрировали оптическое поглощение при длине волны 492 нм (ОП<sub>492</sub>).

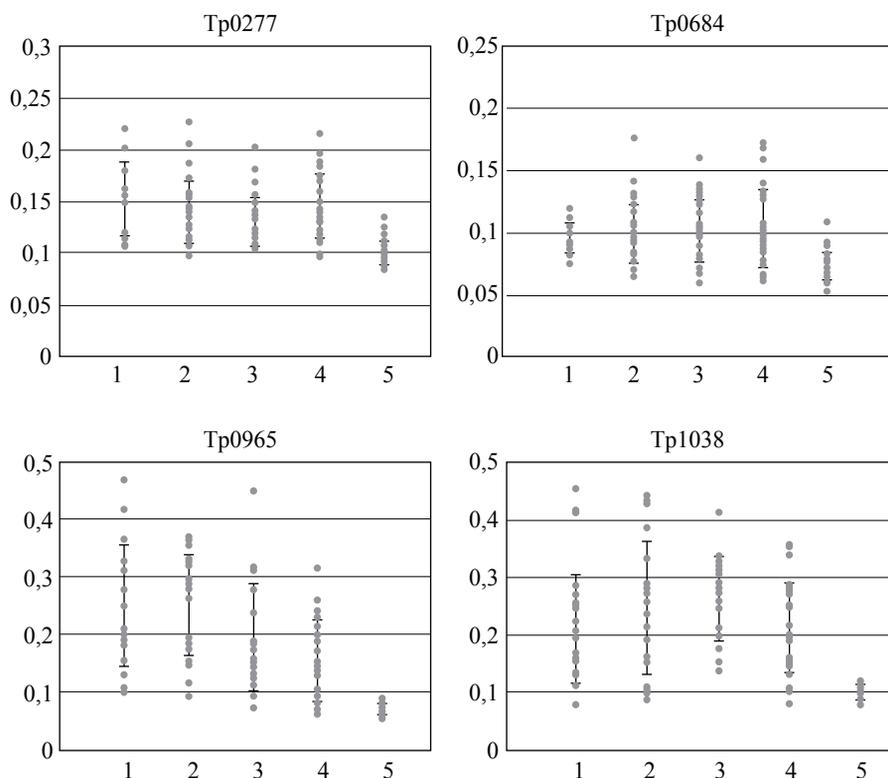
**Статистический анализ.** Оценку результатов ИФА проводили с использованием программного обеспечения AtteStat по критерию Манна–Уитни для непарных выборок с поправкой на множественное сравнение. Чувствительность серологических реакций с использованием каждого рекомбинантного антигена рассчитывали как процент истинно положительных результатов ИФА при исследовании сывороток больных сифилисом. Построение алгоритма дифференциации форм сифилиса с учетом интенсивности иммунного ответа на интегральную совокупность исследованных антигенов *T. pallidum* проводили методом дискриминантного анализа с использованием пакета статистических программ «Statistica 8.0».

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Критерии оценки результатов ИФА.** С целью корректной интерпретации результатов ИФА для каждой использованной серии планшетов с иммобилизованным на них рекомбинантным антигеном *T. pallidum* был рассчитан пороговый уровень оптического поглощения при 492 нм (ОП<sub>порог</sub>), соответствующий экспериментально определенному среднему значению ОП<sub>492</sub> при тестировании сывороток крови здоровых доноров с поправкой +3σ (квадратичное отклонение для данной выборки). Так, в случае проведения подобного анализа с использованием рекомбинантного антигена Tr0277 значение ОП<sub>порог</sub> было установлено на уровне 0,113 о.е. (0,101 + 3 × 0,004), для Tr0684 оно составило 0,087 о.е. (0,074 + 3 × 0,004), а для Tr0965 равнялось 0,075 о.е. (0,0683 + 3 × 0,0024) и 0,105 о.е. (0,100 + 3 × 0,0156) для Tr1038, соответственно. В свою очередь, при проведении ИФА с использованием известного рекомбинантного белка Tr17 (Tr0435) *T. pallidum* значение ОП<sub>порог</sub> соответствовало 0,133 о.е. (0,101 + 3 × 0,011). При последующей интерпретации результатов исследования сывороток крови больных сифилисом «положительными» считались значения ОП<sub>492</sub>, превышающие указанные пороговые уровни более чем на 10%; «отрицательными» — значения, составляющие менее 90% от порогового значения оптической плотности; а случаи со значениями ±10% расценивались как сомнительные («серая зона» диагностического исследования).

Результаты ИФА (значения ОП<sub>492</sub>), полученные при тестировании индивидуальных сывороток крови пациентов с различными формами сифилиса в отношении рекомбинантных белков Tr0277, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 *T. pallidum* приведены на **рис. 1**. При этом на фоне универсальной тенденции к росту значений оптического поглощения достигаемые средние значения ОП<sub>492</sub> значительно варьировали между группами больных с различными формами сифилиса, а также имели разные степени отличий от группы здоровых доноров.

**Особенности иммунного ответа на отдельные антигены *T. pallidum*.** При анализе иммунореактивности исследуемых сывороток в отношении рекомбинантного белка Tr0277 наиболее существенное превышение значений ОП<sub>492</sub> зафиксировано в группах пациентов с первичным и поздним скрытым сифилисом: в 1,51 и 1,45 раза выше аналогичных значений в группе



**Рис. 1.** Распределение значений оптического поглощения ( $OP_{492}$ ; по оси ординат) при иммуноферментном анализе сывороток крови больных первичным (1), вторичным (2), ранним скрытым (3) и поздним скрытым сифилисом (4), а также здоровых доноров (5) в отношении рекомбинантных антигенов Tr0277, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 *T. pallidum*.

здоровых доноров. В соответствии же с представленными выше критериями все исследуемые сыворотки больных первичным, вторичным и ранним скрытым сифилисом были оценены как положительные, в то время как 2 из 34 тестированных сывороток от пациентов с поздним скрытым сифилисом при сравнении с  $OP_{\text{порог}}$  интерпретировались как отрицательные (в контексте проводимого исследования «ложноотрицательные»).

Особенностью реагирования исследуемых сывороток с рекомбинантным белком **Tr0684** являлось последовательное увеличение средних значений  $OP_{492}$ , начиная с 1,15-кратного превышения данного показателя у больных первичным сифилисом в сравнении с группой здоровых доноров до 1,41-кратного превышения в группе больных поздним скрытым сифилисом. Однако, умеренное отличие от  $OP_{\text{порог}}$ , а также варьирование значений  $OP_{492}$  индивидуальных сывороток при разных формах заболевания приводило к тому, что 1 из 16 в группе первичного, 5 из 36 вторичного, 6 из 39 раннего скрытого и 8 из 34 в группе позднего скрытого сифилиса были оценены как «ложноотрицательные».

Наиболее высокие значения  $OP_{492}$  были зафиксированы при использовании рекомбинантного белка **Tr0965** с достижением более чем 3,5-кратного превышения среднего значения данного показателя у больных первичным и вторичным сифилисом, а также однозначной интерпретацией всех тестированных сывороток как «положительных». В свою очередь в группе больных ранним скрытым сифилисом среднее значение  $OP_{492}$  превышало контрольные значения в 3,13 раза, а при позднем скрытом сифилисе уже только в 2,35 раза, что начинало статистически значимо отличаться от результатов, полученных в группах больных первичным и вторичным сифилисом ( $P = 0,04$  и  $P = 0,003$ , соответственно). При этом сравнение с  $OP_{\text{порог}}$  заставило интерпретировать 1 из 34 сывороток в группе пациентов с поздним скрытым сифилисом как отрицательную («ложноотрицательную») с оценкой остальных как истинно положительных.

Рекомбинантный белок **Tr1038** наиболее активно реагировал с сыворотками больных ранним скрытым сифилисом (2,6-кратное превышение средних значений  $OP_{492}$ ; оценка всех исследованных образцов как истинно положительных). Сходное 2,43-кратное превышение

**Таблица 1.** Чувствительность ИФА (%) с использованием рекомбинантных белков *T. pallidum* при диагностике различных форм сифилиса

Формы заболевания	Рекомбинантные белки				
	Tr0277	Tr0684	Tr0965	Tr1038	Tr17
Первичный сифилис	<b>100</b>	88,9	<b>100</b>	95,0	<b>100</b>
Вторичный сифилис	95,4	79,1	<b>100</b>	88,9	<b>100</b>
Ранний скрытый сифилис	<b>100</b>	80,0	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Поздний скрытый сифилис	92,0	69,2	95,2	94,7	<b>100</b>
В целом:	96,0	77,5	98,8	93,6	<b>100</b>

зафиксировано и при исследовании сывороток больных вторичным сифилисом, однако сравнение с ОП<sub>порог</sub> заставляло оценивать 2 из 36 как «ложноотрицательные». В свою очередь, у больных первичным и поздним скрытым сифилисом средние значения ОП<sub>492</sub> превышали контрольные только в 2,08 и 2,10 раза, что сопровождалось выявлением по 1 «ложноотрицательному» результату в каждой из этих групп.

Наконец, результаты аналогичных исследований с использованием рекомбинантного белка Tr17 (Tr0435) существенно превышали контрольные значения ОП<sub>492</sub> в группах пациентов с первичным и вторичным сифилисом в 3,6 и 4,2 раза, а в группах раннего и позднего скрытого сифилиса в 4,3 и 4,1 раза, с идентификацией всех тестированных сывороток как истинно положительных.

Полученные данные явились основой для расчета диагностической эффективности ИФА с использованием рекомбинантных белков Tr0277, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 *T. pallidum*, результаты которого представлены в **табл. 1**. При этом описанное выше варьирование интенсивности иммунного ответа на исследуемые рекомбинантные белки нашло свое отражение в значениях

чувствительности, характеризующих долю выявляемых случаев заболевания. В частности, максимальная (100%) чувствительность серологических реакций с использованием известного рекомбинантного белка Tr17 (Tr0435) была дополнительно показана при диагностике первичного сифилиса с использованием антигенов Tr0277 и Tr0965; вторичного сифилиса – Tr0965; раннего скрытого сифилиса – Tr0277, Tr0965 и Tr1038. Тем самым подобное «мозаичное» распределение интенсивности иммунного ответа на определенные антигены и связанные с этим различия их диагностической эффективности на различных стадиях заболевания частично подтверждало гипотезу Brinkman с соавторами [3]. Однако, преимущественный иммунный ответ на белок Tr0277 при первичном и Tr0965 при вторичном сифилисе, а на белки Tr1038 и Tr0684 при раннем и позднем скрытом сифилисе, соответственно, не имел исключительного характера, в связи с чем антитела данной специфичности в большей или меньшей степени выявлялись при всех формах сифилитической инфекции. Указанное обстоятельство явилось ограничением изолированного использования рекомбинантных белков

**Таблица 2.** Распределение анализируемых образцов сыворотки крови по формам сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты ИФА с рекомбинантными белками *T. pallidum*

Дифференцируемые группы и их численность: первичные данные	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием дифференцирующего алгоритма					Эффективность дифференциации, %
	(1)*	(2)*	(3)*	(4)*	(5)*	
(1) Первичный сифилис; n = 16	<b>8</b>	3	2	2	1	50,0
(2) Вторичный сифилис; n = 36	4	<b>16</b>	7	6	3	44,4
(3) Ранний скрытый сифилис; n = 39	2	4	<b>23</b>	10	0	58,9
(4) Поздний скрытый сифилис; n = 34	1	4	4	<b>18</b>	7	52,9
(5) Здоровые; n = 37	0	0	0	0	<b>37</b>	100

\*Примечание: обозначения 1–5 в колонках аналогичны обозначениям в строках.

*T. pallidum* в системе серологической диагностики сифилиса, одновременно определив задачу интегральной оценки интенсивности иммунного ответа на всю совокупность тестируемых антигенов как возможного подхода к лабораторной дифференциации форм данного заболевания.

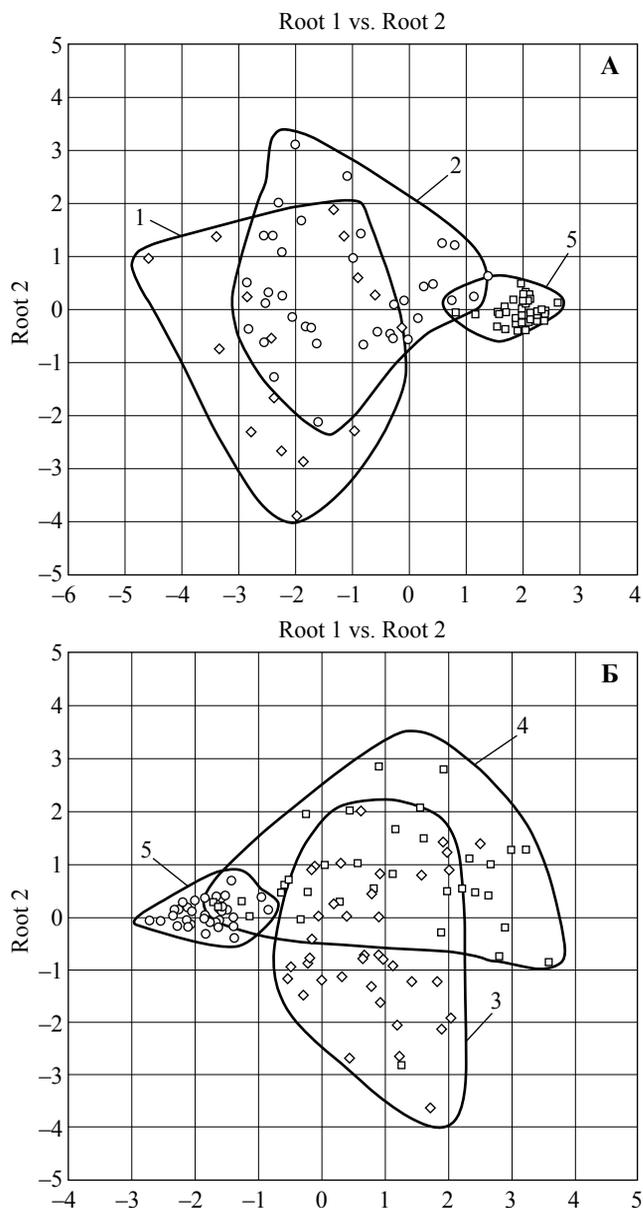
**Алгоритм лабораторной дифференциации форм сифилиса.** Проведение корреляционного анализа позволило констатировать отсутствие выраженных взаимозависимостей (значений более 0,66 или менее  $-0,66$ ) в иммунном реагировании на исследуемые рекомбинантные белки *T. pallidum*. В свою очередь расчет еще одного статистического показателя (т.н. «лямбды Уилкса»), характеризующего потенциальный вклад каждого антигена в дифференциацию отдельных форм сифилиса, свидетельствовал о достаточном уровне значимости ( $P < 0,01$ ) каждого из них, что определило возможность использования всей совокупности полученных данных на следующем этапе многомерного статистического анализа.

Последующее применение алгоритма линейного дискриминантного анализа позволило рассчитать коэффициенты классификационных уравнений, позволяющих отнести каждую сыворотку с присущим ей спектром антител к одной из четырех дифференцируемых групп, соответствующих определенной форме заболевания, а также группе здоровых индивидуумов (табл. 2).

Важным результатом проведенного исследования представляется достижение однозначного (100%) соответствия при анализе сывороток здоровых доноров, что свидетельствует о высокой специфичности предложенного диагностического алгоритма. В свою очередь его использование для дифференциации сывороток, полученных от больных с различными формами сифилиса, в каждой группе сравнения вело к высокой (максимальной в ряду наблюдения) вероятности совпадения истинного и прогнозируемого результата, однако итоговая эффективность дифференциации оказывалась относительно невысокой, варьируя от 44,4 до 58,9%.

Проведение попарного межгруппового сравнения несколько повысило эффективность разрабатываемого алгоритма, а также позволило оценить вклад каждого из использованных рекомбинантных белков *T. pallidum* в решение задачи дифференциации определенных форм сифилиса.

Так, сравнение характера иммунного ответа на рекомбинантные белки Tr0277, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 *T. pallidum* при первичном и вторичном сифилисе свидетельствовало об отсутствии



**Рис. 2.** Распределение сывороток больных первичным и вторичным сифилисом (А), а также ранним и поздним скрытым сифилисом (Б) в проекции двух дискриминантных функций (Root 1, Root 2), описывающих результаты ИФА с рекомбинантными белками *T. pallidum*.

Обозначения 1–5 аналогичны рис. 1.

дифференцирующей значимости антител к белку Tr0684 ( $P = 0,12$ ). В то же время исследование антител к прочим тестируемым белкам, а также антигену Tr17 (Tr0435) позволило сформировать неидентичные области распределения для групп больных первичным и вторичным сифилисом (рис. 2А). При этом итоговая эффективность дифференциации повышалась до 56,3–77,8% с сохранением 100% отличий от группы здоровых доноров.

В свою очередь решение аналогичной задачи на примере групп раннего и позднего скрытого сифилиса вело к отрицанию дифференцирующего эффекта рекомбинантного белка Tr0965 ( $P = 0,75$ ), в то время как использование других антигенов вновь позволяло формировать неидентичные распределения (**рис. 2Б**) с достижением итоговой эффективности дискриминации на уровне 61,7–71,8 и 100% отличием от группы здоровых доноров.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупность полученных результатов подтвердила исходно выдвинутое предположение о варьировании иммунного ответа на отдельные антигены *T. pallidum* в динамике сифилитической инфекции. Так, оценка специфических антител к белку Tr0277 (периплазматической С-концевой протеазе), согласуясь с представлениями о целесообразности его включения в состав диагностических антигенных композиций [10], свидетельствовала о перспективе использования в первую очередь для подтверждения диагноза первичного сифилиса. Ранее охарактеризованный антиген Tr0965 (локализованный на внутренней цитоплазматической мембране белок с транспортной функцией) [11] 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 [12]. В свою очередь функционирование белка Tr1038 (TrF1) в качестве железосвязывающего трансферрина [13], одновременно играющего важную роль в подавлении Т-клеточного иммунного ответа через стимуляцию выброса специфических цитокинов, в частности — трансформирующего ростового фактора TGF- $\beta$  [14], 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 [15] является наиболее вероятной причиной устойчивого роста интенсивности иммунного ответа на данный антиген при поздней скрытой форме сифилиса.

Выявленные особенности реагирования на антигены Tr0277, Tr0684, Tr0965 и Tr1038 *T. pallidum* позволили приблизиться к решению задачи вероятностной серологической

дифференциации различных форм сифилиса, имеющей теоретическое и экспериментальное обоснование [3, 5], но до последнего времени находящейся вне поля зрения клинических иммунологов. Однако, показанное в настоящем исследовании варьирование иммунного ответа на антигены *T. pallidum* при различных формах сифилиса носило не качественный, но количественный характер, в связи с чем ни один из них по отдельности не мог быть использован для создания лабораторного дифференцирующего алгоритма. Предложенным решением стало использование метода многомерной статистики — дискриминантного анализа, позволяющего учесть всю совокупность полученных данных и превратить «малые» отличия в профилях антигенной специфичности детектируемых антител в интегральные дифференцирующие критерии. Достигнутая с использованием подобного подхода дифференциация сывороток больных сифилисом и здоровых доноров могла быть оценена как успешная (эффективность дискриминации достигала 100%), однако при сравнении отдельных форм сифилиса она позволила приблизиться лишь к 75%.

Таким образом, 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 пока еще недостаточно высока, 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.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России на 2015 год и плановый период 2016 и 2017 гг. по Государственному контракту 114/БУ-2015-051 от 16.01.2015 г.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных сифилисом. М., РОДVK, 2015, 45 с. [Federal guidelines for the management of patients with syphilis. M., RODVK, 2015, 45 p.]
2. Peeling R.W., Hook E. W. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. *J. Pathol.* 2006, 208(2), 224–232.
3. Brinkman M.B., McKevitt M., McLoughlin M., Perez C., Howell J., Weinstock G. M., Norris S. J., Palzkill T. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44(3), 888–891.
4. <https://microbeonline.com/laboratory-diagnosis-of-syphilis/>
5. McGill M.A., Edmondson D. G., Carroll J. A., Cook R. G., Orkiszewski R. S., Norris S. J. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. *Infect. Immun.* 2010, 78(6), 2631–2643.
6. Хайруллин Р.Ф., Ротанов С. В., Фриго Н. В., Белоусова А. В. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*. Вестник дерматологии и венерологии. 2012, 5, 56–64. [Khairullin R. F., Rotanov S. V., Frigo N. V., Belousova A. V. Bioinformatic analysis of the specific antigens of *T. pallidum*. *Journal of Dermatology and Venereology.* 2012, 5, 56–64.]
7. Рунина А.В., Рог К. В., Васильев М. М. ТрF1 – новый потенциальный антиген для серодиагностики скрытых форм сифилитической инфекции. Вестник дерматологии и венерологии. 2014, 6, 86–92. [Runina A. V., Rog K. V., Vasiliev M. M. ТрF1 – new potential antigen for serodiagnosis of latent forms of syphilis infection. *Journal of Dermatology and Venereology.* 2014, 6, 86–92.]
8. Рунина А.В., Старовойтова А. С., Дерябин Д. Г., Кубанов А. А. Рекомбинантный белок Тр0965 *Treponema pallidum* как перспективный антиген для совершенствования серологической диагностики сифилиса. Вестник Российской академии медицинских наук. 2016, 71(2), 109–113. [Runina A. V., Starovoitova A. S., Deryabin D. G., Kubanov A. A. Evaluation of the recombinant protein Тр0965 of *Treponema pallidum* as candidate antigen for serological diagnosis of syphilis. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2016, 71(2), 109–113.]
9. Chamberlain N. R., Brandt M. E., Erwin A. L., Radolf J. D., Norgard M. V. Major integral membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids. *Infection and immunity.* 1989, 57(9), 2872–2877.
10. Patent WO 2006138324 A2. *Treponema pallidum* antigens for vaccine development and diagnostic tests.
11. Long F., Zhang J., Shang G., Shang S., Gong K., Wang Q. Seroreactivity and immunogenicity of Тр0965, a hypothetical membrane protein of *Treponema pallidum*. *Chinese medical journal.* 2012, 125(11), 1920–1924.
12. Zhang R.-L., Zhang J.-P., Wang Q.-Q. Recombinant *Treponema pallidum* protein Тр0965 activates endothelial cells and increases the permeability of endothelial cell monolayer. *PloS one.* 2014, 9(12): e115134.
13. Thumiger A., Polenghi A., Papinutto E., Battistutta R., Montecucco C., Zanotti G. Crystal structure of antigen ТрF1 from *Treponema pallidum*. *Proteins.* 2006, 62(3), 827–830.
14. Babolin C., Amedei A., Ozolins D., Zilevica A., D'Elia M.M., de Bernard M. ТрF1 from *Treponema pallidum* activates inflammasome and promotes the development of regulatory T-cells. *J. Immunol.* 2011, 187(3), 1377–1384.
15. Brautigam C.A., Deka R. K., Liu W. Z., Norgard M. V. The Тр0684 (MglB-2) lipoprotein of *Treponema pallidum*: A glucose-binding protein with divergent topology. *PLoS one.* 2016, 11(8): e0161022.

## VARIATION OF IMMUNE RESPONSE TO Тр0277, Тр0684, Тр0965 AND Тр1038 *TREPONEMA PALLIDUM* ANTIGENS IN DIFFERENT SYPHILIS STAGES

A. V. Runina\*, A. M. Zatevalov\*\*, G. L. Katunin\*,  
D. G. Deryabin\*, A. A. Kubanov\*\*\*

\*State Scientific Centre of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia;

\*\*G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology Moscow, Russia;

\*\*\*Russian Medical Academy of Post-Graduate Education Moscow, Russia

Received: 02.02.2017. Accepted: 22.03.2017

The level of IgG antibodies against recombinant proteins Тр0277, Тр0684, Тр0965, Тр1038 of *T. pallidum* was measured in ELISA assay using blood serum of patients with primary, secondary, early latent and late latent syphilis. We observed certain variations of ELISA diagnostic efficiency with above noted proteins depending on the form of the disease. 100% sensitivity in serodiagnostics of

primary syphilis was observed in assays with Tp0277, secondary syphilis – with Tp0965, and early latent syphilis – with Tp1038 recombinant proteins. The highest antibody level against Tp0684 was observed in the group of late latent syphilis patients, but revealed a decreased sensitivity of the assay. The statistical discriminative analysis of the results enabled the development of classification rules for the differentiation of serum samples into four groups according to the stages of syphilis. The efficiency of the proposed classification model revealed 44.4–58.9%, and can be even higher up to 75% using pair-wise comparison of sample groups. To summarize, this approach gives the opportunity for syphilis stage differentiation based on the analysis of antibodies against *Treponema pallidum* antigens panel.

*Key words:* syphilis, serological diagnostics, *Treponema pallidum*, diagnostic antigens, Tp0277, Tp0684, Tp0965, Tp1038

#### Authors:

**Runina A. V.**, research fellow, State Scientific Centre of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia;

**Zatevalov A. M.**, senior research fellow, PhD, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology Moscow, Russia;

**Katunin G. L.**, PhD, Head of Syphilidology Department, State Scientific Centre of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health Moscow, Russia;

**Deryabin D. G.**,  M.D., Prof., Head of the Department of STD and Dermatoses Laboratory Diagnostics, State Scientific Centre of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health Moscow, Russia. 107076 Moscow, Korolenko Str., 3/6. Tel. +7(903)221-39-63 (mob.). **E-mail:** dgderabin@yandex.ru

**Kubanov A. A.**, M.D., Prof., corresponding member of RAS, Head of Dermatovenereology and Cosmetology Department, Russian Medical Academy of Post-Graduate Education Moscow, Russia.