

Выявление антител классов М и G к антигенам *T. pallidum* у больных первичным сифилисом

С.В. Ротанов^{1,2}, Ф.А. Эрматова²

¹ ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Представлены результаты исследования 76 образцов сыворотки крови, полученных от больных с клинически установленным диагнозом «сифилис первичный» методом линейного иммуноблоттинга с определением IgM и IgG к антигенам *T. pallidum*, что позволило изучить выраженность гуморального иммунного ответа к отдельным антигенам *T. pallidum* на ранних этапах развития инфекции.

Гуморальный ответ путем синтеза специфических антител класса М при первичном сифилисе в подавляющем большинстве случаев сочетался с выработкой антител класса G. Частота выявления антител классов М и G составила: к антигену ТррА — у 100 и 98,68% больных; к ТрN47 — у 90,79 и 97,37%; к ТрN17 — у 90,79 и 89,47%; к ТрN15 — у 72,37 и 73,69% соответственно; при этом содержание антител класса G к каждому из четырех изученных антигенов *T. pallidum* более чем в 2 раза превосходило уровень антител класса М.

Впервые выявлены и охарактеризованы разные профили гуморального иммунного ответа с участием IgM и IgG, различающиеся более выраженным синтезом антител к какому-либо одному или нескольким антигенам *T. pallidum*. Клиническая чувствительность метода иммуноблоттинга-IgM при диагностике первичного сифилиса составила 85,53%, а иммуноблоттинга-IgG — 92,11%, что характеризует возможности использования метода при диагностике ранних форм сифилиса.

Ключевые слова: сифилис первичный, иммуноблоттинг, антитела класса М и G, антигены ТрN15, ТрN17, ТррА и ТрN47.

Determination of class M and G antibodies to *T. pallidum* antigens in patients with primary syphilis

^{1,2} S.V.Rotanov, ² F.A. Ermatova

¹ State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Korolenko street 3, bldg 6, 107076, Moscow, Russia

² The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (RNRMU)

Ostrovityanova street 1, 117997, Moscow, Russia

The authors present the results of a study of blood serum samples obtained from patients with clinically diagnosed primary syphilis by the linear immunoblotting method to determine IgM and IgG antibodies to *T. pallidum* antigens, which enabled the authors to study the intensity of the humoral immune response to individual *T. pallidum* antigens at early stages of the infection.

The humoral response by means of the synthesis of specific class M antibodies in case of primary syphilis was accompanied by the formation of Class G antibodies in most cases; the frequency of revealing Class M and G antibodies was as follows: TmpA antigen — 100 and 98.68%; TpN47 — 90.79 and 97.37%; TpN17 — 90.79 and 89.47%; TpN15 — 72.37 and 73.69% of all cases, respectively; the content of class G antibodies to each of the four *T. pallidum* antigens exceeded the levels of Class M antibodies by more than twice.

Different profiles of the humoral immune response with the involvement of IgM and IgG antibodies distinguished by a more expressed synthesis of antibodies to any or several of *T. pallidum* antigens were discovered and characterized for the first time.

The clinical sensitivity of the IgM immunoblotting method for diagnosing primary syphilis amounted to 85.53%, IgG immunoblotting — 92.11%, which means that the method can be used to diagnose early forms of syphilis.

Key words: primary syphilis, immunoblotting, Class M and G antibodies, antigens TpN15, TpN17, TmpA and TpN47.

Corresponding author: rotanov@cniivi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2013; 4: 63—72.

■ Реакции адаптивной защиты у человека при инфекционных заболеваниях бактериальной природы осуществляются с преимущественным участием гуморального звена иммунитета, эффекторным проявлением которого служит синтез антител. Антитела к одному и тому же антигену могут относиться к иммуноглобулинам разных классов [1, 2].

Многочисленными исследованиями показано, что на ранних этапах развития бактериальных инфекций у человека осуществляется выработка антител, относящихся преимущественно к иммуноглобулинам класса М, а по мере развития патологического процесса происходит постепенное включение механизмов образования антител классов G и A; при этом напряженность гуморального иммунного ответа с участием антител класса G выражена значительно сильнее, чем первоначальная реакция на чужеродные антигены с участием антител класса М [2—5].

Сифилис является бактериальной инфекцией, вызываемой бледной трепонемой — *Treponema pallidum*. В структуре возбудителя сифилиса выявлено содержание большого количества соединений, обладающих выраженными антигенными свойствами для иммунной системы человека [6—9]. Часть высокоспецифичных для *T. pallidum* антигенов, к числу которых относятся TrpN15, TrpN17, TrpN47 и TmpA, хорошо изучена и в настоящее время используется в лабораторных иммунохимических исследованиях для выявления в биологических образцах (сыворотке и плазме крови или цереброспинальной жидкости) обследуемых лиц соответствующих антител, что играет важную роль при диагностике сифилиса [4, 10—15].

Результаты иммунохимических исследований (иммуноферментный анализ, реакция непрямой агглютинации, реакция иммунофлюоресценции) в подавляющем большинстве случаев оценивают и интерпретируют по выявлению суммы антител к нескольким антигенам возбудителя заболевания одновременно [10—13]. В то же время некоторые из современных медицинских технологий (линейный иммуноблоттинг, исследование с использованием сенсibilизированных калиброванных микросфер и белковых микрочипов) позволяют определять антитела к отдельным антигенам *T. pallidum* дифференцированно и оценивать участие каждого из них в формировании гуморального иммунитета, а также клиническую значимость для диагностики заболевания [13—20].

В доступной научной литературе нами не выявлено сведений о сроках и очередности появления антител разных классов к разным антигенам *T. pallidum*, используемым в составе современных диагностических наборов реагентов для иммуноблоттинга, а также о сравнительной оценке их иммуногенности на ранних этапах развития сифилиса и долевого участия в общем иммунном ответе.

Целью настоящего исследования явилось определение частоты обнаружения антител классов М и G к отдельным антигенам *T. pallidum* и выявление особенностей развития гуморального иммунного ответа у больных первичным сифилисом.

Материал и методы

Исследовано 76 образцов сыворотки крови, полученных от больных с установленным клиническим диагнозом сифилиса первичного независимо от локализации первичного аффекта. Основанием для установления диагноза служили: наличие клинических проявлений заболевания, прямое обнаружение возбудителя и/или данные серологического обследования пациентов в соответствии с действующими Протоколом ведения больных «Сифилис» и Клиническими рекомендациями Российского общества дерматовенерологов и косметологов [21, 22].

Все образцы сыворотки крови больных сифилисом были предварительно изучены в иммуноферментном анализе (ИФА) с наборами реагентов «ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М», тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к возбудителю сифилиса по ТУ 9398-201-05941003-2012 (ПУ № РЗН 2013/126 от 26.02.2013 г.; производства ООО «НПО «Диагностические системы», Россия). В составе иммуносорбента для выявления антител в указанном наборе реагентов используются антигены *T. pallidum* с молекулярной массой 17, 41 и 47 кД. Учет результатов ИФА и оценку содержания антител в образцах осуществляли в соответствии с инструкцией к набору по показателю коэффициента позитивности (КП), который представляет собой отношение оптической плотности в реакционной лунке с исследуемым образцом к величине оптической плотности критической.

Дифференцированное определение антител классов М или G к разным антигенам *T. pallidum* проводили методом линейного иммуноблоттинга (Western blot) с набором реагентов «Лайн-Блот Сифилис», тест-система для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов (комплект № 1 — «Лайн-Блот-Сифилис-IgG» для выявления антител класса G к *T. pallidum* и комплект № 2 — «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» для выявления антител класса М к *T. pallidum*) по ТУ 9398-118-70423725-2012 (проходит регистрацию в Российской Федерации; производство ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Указанные комплекты набора реагентов «Лайн-Блот Сифилис» предназначены для отдельного определения антител к четырем рекомбинантным белкам, являющимся аналогами антигенов возбудителя сифилиса: TrpN15, TrpN17, TmpA и TrpN47. Полуколичественный учет результатов исследования в иммуноблоттинге осуществляли в соответствии с указаниями инструкции по применению набора в цифровом выражении в ус-

ловных единицах: минусы — отрицательные (отсутствие окрашивания полос в местах нанесения на нитроцеллюлозный стрип антигенов *T. pallidum*) и плюсы (от 0,5+ до ++++) — положительные результаты (при окрашивании полос с той или иной интенсивностью в местах нанесения антигенов *T. pallidum*). По итогам исследования в иммуноблоттинге представляли общее заключение: отрицательный результат — в случае, если ни с одним из четырех антигенов не получали интенсивности окрашивания полос, равной или превышающей 0,5+ только к одному из антигенов; положительный результат — при выявлении антител и проявлении окрашивания с интенсивностью, равной; неопределенный результат — при выявлении антител и проявлении окрашивания с интенсивностью, равной или превышающей 0,5+ только к одному из антигенов; положительный результат — при выявлении антител и проявлении окрашивания с интенсивностью, равной или превышающей 0,5+ к двум и более антигенам. Для статистической обработки результатов количественного определения антител с интенсивностью менее 0,5+ нами дополнительно введено обозначение 0,3+. Обозначавшее обнаружение следовых количеств антител и низкую интенсивность окрашивания полос с антигенами *T. pallidum*. Данное обозначение не используется производителем наборов реагентов, применение этого обозначения не изменяло формулировку общего заключения по результатам исследования образца крови в иммуноблоттинге.

Результаты и обсуждение

Определение специфических антител класса М к *T. pallidum*

Исследование 76 образцов сыворотки крови больных первичным сифилисом в ИФА_{IgM} позволило определить специфические антитела класса М к антигенам *T. pallidum* в 74 (97,37%) случаях и их отсутствие — в 2 (2,63%) случаях. Показатели КП, рассчитанные для всех положительных образцов, варьировали от 1,20 до 22,18 ($M \pm m = 12,42 \pm 0,62$): с 5 образцами сыворотки крови они определялись в низкой ($1,20 \leq \text{КП} \leq 3,98$), с 15 — в средней ($4,30 \leq \text{КП} \leq 7,69$) и с 54 образцами — в высокой концентрации ($8,03 \leq \text{КП} \leq 22,18$). Значения КП с 2 образцами, показавшими отрицательные результаты исследования в ИФА_{IgM}, составили 0,97 и 0,03 соответственно.

Изучение 76 образцов сыворотки крови больных сифилисом первичным в иммуноблоттинге с набором «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» позволило сделать общие заключения по результатам тестирования: 2 (2,63%) — отрицательных, 9 (10,84%) — неопределенных и 65 (85,53%) — положительных. Полученные результаты характеризуют клиническую чувствительность исследования в иммуноблоттинге-IgM при первичном сифилисе на уровне 85,53%, что несколько ниже данных литературы по оценке величины этого

показателя для метода иммуноблоттинга с использованием IgG (94,8%) у больных всеми формами заболевания [14, 15, 23].

Отрицательные результаты в иммуноблоттинге-IgM были выявлены с 2 образцами сыворотки крови больных первичным сифилисом, в том числе с одним образцом, демонстрировавшим также отсутствие трепонемоспецифических антител в ИФА_{IgM} (КП = 0,03), и с образцом, показавшим в ИФА_{IgM} средний уровень антител (КП = 2,75). При этом с обоими образцами сыворотки крови в иммуноблоттинге-IgM были получены результаты, указывавшие на выявление следовых количеств антител класса М (0,3+) к антигенам TrpA + TrpN15 и TrpA + TrpN47 соответственно; эти показатели были учтены нами при оценке очередности появления антител к разным антигенам *T. pallidum* на ранних этапах развития инфекции.

Неопределенные результаты в иммуноблоттинге-IgM наблюдали с 9 образцами, включая 2 образца сыворотки крови с низким уровнем IgM по результатам исследования в ИФА_{IgM} ($1,58 \leq \text{КП} \leq 3,98$), 3 — со средним уровнем ($4,67 \leq \text{КП} \leq 5,88$) и 4 — с высоким содержанием IgM ($11,52 \leq \text{КП} \leq 15,73$). При этом в иммуноблоттинге-IgM в указанных образцах в 2 случаях были определены антитела только к TrpN17 (на уровне 0,5+), в 6 — к TrpA (от + до ++++) и в 1 — к TrpN47 (0,5+).

Положительные результаты в иммуноблоттинге-IgM были получены с 65 образцами: с 1 образцом, показавшим отрицательный результат исследования в ИФА_{IgM} (КП = 0,97), и с 64 образцами, демонстрировавшими в ИФА_{IgM}: низкий уровень антител ($1,20 \leq \text{КП} \leq 3,45$) — 4 образца, средний ($4,30 \leq \text{КП} \leq 7,69$) — 10 и высокий ($8,03 \leq \text{КП} \leq 22,18$) — 50 образцов.

Положительные заключения о результатах исследования в иммуноблоттинге-IgM были установлены при выявлении трепонемоспецифических антител на уровне 0,5+ и более с двумя антигенами одновременно в 14 (21,54%) из 65 исследованных образцов, с тремя антигенами — в 30 (46,15%) и с четырьмя антигенами — в 21 (32,31%).

Полученные в иммуноблоттинге-IgM данные были подвергнуты сравнительному статистическому анализу с целью оценки, к каким именно антигенам из числа включенных в состав иммуносорбента (TrpN15, TrpN17, TrpA и TrpN47) у больных первичным сифилисом определялось наиболее высокое содержание антител. Так как при проведении иммуноблоттинга получить значения оптической плотности невозможно, сравнительный анализ проводили путем обработки цифровых показателей (количеств плюсов), отражавших интенсивность окрашивания полос с нанесенными антигенами *T. pallidum* и, соответственно, уровень антител к *T. pallidum* (рис. 1).

При этом было установлено, что в каждом конкретном случае наблюдался более высокий уровень анти-

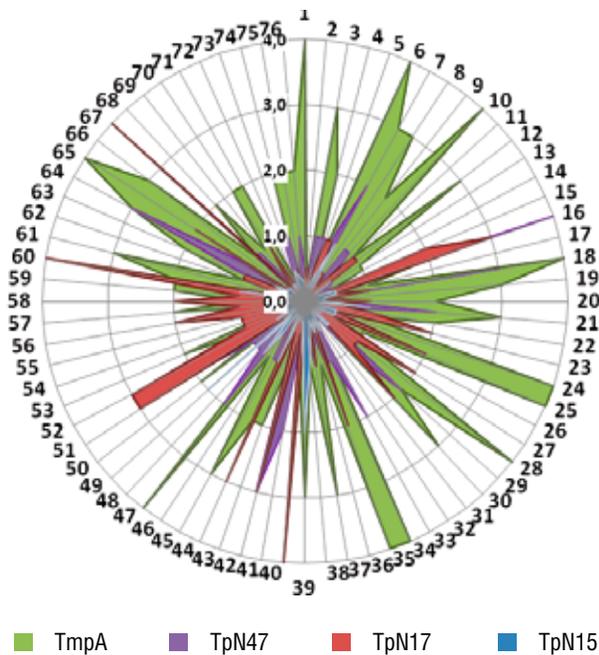


Рис. 1. Содержание антител класса М к антигенам *T. pallidum* в сыворотке крови больных первичным сифилисом

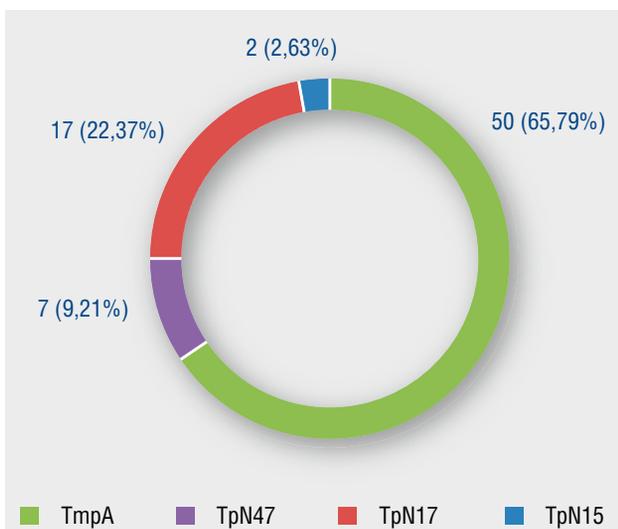


Рис. 2. Соотношение профилей гуморального иммунного ответа у больных первичным сифилисом в зависимости от преобладания синтеза антител класса М к антигенам *T. pallidum*

тел только к одному из изучавшихся антигенов; это позволило определить четыре возможных профиля формирования гуморального иммунного ответа.

Преобладание антител к антигену TrpN15 на уровне + / ++ определено в сыворотке крови 2 (2,63%) из 76 обследованных больных первичным сифилисом, что отражало формирование выраженного гуморального иммунного ответа к этому антигену при менее выраженном ответе на другие антигены в составе набора «Лайн-Блот-Сифилис-IgM».

Формирование профиля с преобладанием содержания антител к антигену TrpN15 на уровне + / ++++ определялось у 17 (22,37%) пациентов; к антигену TmpA на уровне 0,3+ / ++++ у 50 (65,79%); к TrpN47 с интенсивностью 0,3+ / ++++ у 7 (9,21%) пациентов (рис. 2).

Отсутствие IgM к антигену TrpN15 в иммуноблоттинге определено у больных первичным сифилисом в 21 (28,63%) случае, наличие следовых значений (0,3+) — в 28 (36,84%) и положительные результаты (от 0,5+ до ++ — в 27 (35,53%) случаях.

Отсутствие антител к антигену TrpN17 было установлено в 7 (9,21%) образцах сыворотки крови, выявление следовых значений (0,3+) — в 15 (19,74%) и положительные результаты (от 0,5+ до ++++) — в 54 (71,05%).

При исследовании специфических антител к антигену TmpA отрицательные значения не наблюдали (0%), следовые уровни антител (0,3+) были установлены в 7 (9,91%) образцах и положительные результаты (от 0,5+ до ++++) — в 69 (90,79%).

В иммуноблоттинге-IgM антитела к антигену TrpN47 не были выявлены у 7 (9,21%) больных первичным сифилисом, следовые значения наличия антител (0,3+) определены у 12 (15,79%) и положительные результаты (от 0,5+ до ++++) — у 57 (75,00%) пациентов (табл. 1).

Средние показатели содержания антител ($M \pm m$) составили для антигенов TrpN15, TrpN17, TmpA и TrpN47 соответственно $0,4 \pm 0,03$; $1,0 \pm 0,1$; $1,9 \pm 0,1$ и $0,9 \pm 0,1$ (рис. 3).

Антиген TmpA является периплазматическим белком, участвующим в транспорте металлов через цитоплазматическую мембрану клетки *T. pallidum*; TrpN17 — «величайший мембранный белок» — липопротеин, высокое содержание его обнаруживается во внутренней мембране протоплазматического комплекса, и в небольших количествах он присутствует в структуре наружной мембраны; TrpN47 — фермент (цинкзависимая карбоксипептидаза), который относится также к пенициллинсвязывающим белкам, в больших количествах продуцируется патогенной *T. pallidum*. Белок TrpN15 выявляется в структуре наружной мембраны *T. pallidum ssp. pallidum*, а также *ssp. pertenue* (возбудитель фрамбезии), но не обнаруживается у непатогенной *T. pallidum biotype Reiter* [12, 24—27].

Таблица 1

Результаты определения в иммуноблоттинге антител класса М к антигенам *T. pallidum* у больных сифилисом первичным

Результаты исследования	Результаты выявления антител к антигенам, абс. (%)			
	ТрN15	ТрN17	ТррА	ТрN47
Отрицательный, –	21 (27,63)	7 (9,21)	0 (0)	7 (9,21)
Отрицательный, 0,3+ («следовые» антитела)	28 (36,84)	15 (19,74)	7 (9,21)	12 (15,79)
Всего	49 (64,47)	22 (28,95)	7 (9,21)	19 (25,00)
Положительный, 0,5+	19 (25,00)	18 (23,68)	6 (7,90)	16 (21,05)
Положительный, +	6 (7,90)	19 (25,00)	19 (25,00)	27 (35,53)
Положительный, ++	2 (2,63)	9 (11,84)	20 (26,32)	10 (13,15)
Положительный, +++	0 (0)	5 (6,58)	13 (17,10)	3 (3,95)
Положительный, ++++	0 (0)	3 (3,95)	11 (14,47)	1 (1,32)
Всего	27 (35,53)	54 (71,05)	69 (90,79)	57 (75,00)
Итого	76 (100)	76 (100)	76 (100)	76 (100)

Общими свойствами изучавшихся антигенов *T. pallidum* являются: локализация в структуре мембран наружной клеточной стенки или протоплазматического комплекса, а также их высокое содержание в клетке. Эти характеристики, вероятно, обеспечивают более раннее распознавание указанных соединений в качестве чужеродных антигенов антигенпредставляющими клетками и представление их иммунокомпетентным клеткам в региональных лимфатических узлах организма хозяина, что обуславливает более раннее начало и выраженность синтеза антител к этим антигенам.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что у больных первичным сифилисом исследование в иммуноблоттинге-IgM имеет клиническую чувствительность на уровне 85,53%. Первичный гуморальный иммунный ответ при участии IgM различной степени выраженности на антиген ТррА выявляли в 100% случаев, на ТрN47 и ТрN17 — по 90,79%, а на ТрN15 — только в 72,37% случаев. На начальных этапах развития сифилиса показано преобладание выработки антител, направленных преимущественно к какому-либо одному из четырех изучавшихся антигенов. Так, приоритет антителообразования у больных сифилисом первичным на антиген ТррА наблюдали в 65,79% случаев, в то время как максимальную выраженность иммунного ответа к другим антигенам отмечали существенно реже: к ТрN17 — в 22,37%, к ТрN47 — в 9,21% и к ТрN15 — в 2,63% случаев.

Полученные данные позволили предположить, что на начальном этапе развития инфекции в подавляю-

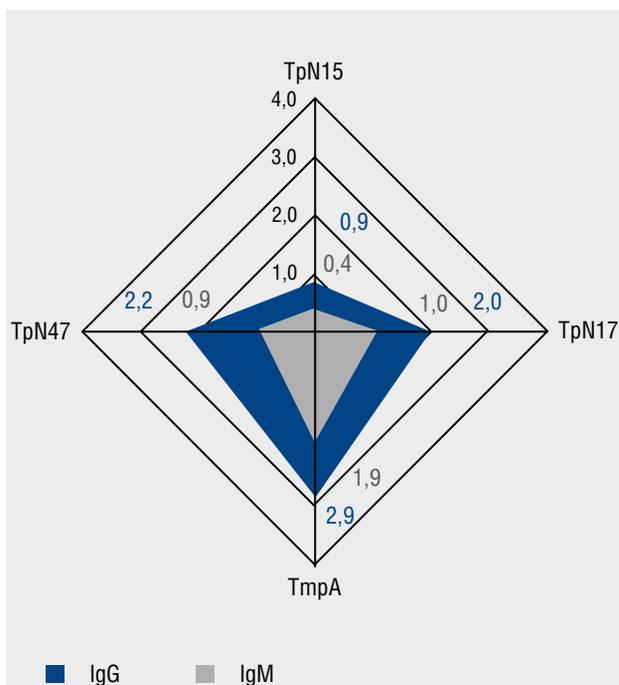


Рис. 3. Средние показатели содержания антител классов М и G к четырем антигенам *T. pallidum*, рассчитанные для следовых (0,3+) и положительных (от 0,5+ до ++++) результатов

щем большинстве случаев у больных сифилисом формирование гуморального иммунного ответа происходит к антигену ТрпА как к обладающему максимально выраженной иммуногенностью, в связи с чем содержание антител к нему в сыворотке крови превалирует над уровнем антител к трем другим изучавшимся антигенам *T. pallidum*. По мере развития заболевания у больных начинается синтез антител к антигенам ТрN47 и ТрN17 при существенном отставании продукции антител к ТрN15.

Определение трепонемоспецифических антигенов класса G

Исследование 76 образцов сыворотки крови больных сифилисом первичным в иммуноблоттинге с набором «Лайн-Блот-Сифилис-IgG» позволило получить общее заключение по результатам определения антител класса G к антигенам *T. pallidum*: 1 (1,31%) — отрицательных, 5 (6,58%) — неопределенных и 70 (92,11%) — положительных результатов. Полученные данные показали более высокую клиническую чувствительность иммуноблоттинга-IgG (92,11%) в сравнении с иммуноблоттингом-IgM (85,53%).

Отрицательное заключение в иммуноблоттинге-IgG было сделано по результатам исследования 1 образца сыворотки крови, так как в данном образце не было выявлено даже следовых значений содержания антител ни к одному из четырех изучавшихся антигенов. С этим образцом отрицательные результаты были также получены в ИФА_{IgM} (КП = 0,03) и иммуноблоттинге-IgM (по отношению к ТрпА и ТрN15 — по 0,3+).

Неопределенные результаты в иммуноблоттинге-IgG наблюдали с 5 образцами сыворотки крови: одним образцом, показавшим положительный результат в ИФА_{IgM} (со средним уровнем антител, КП = 2,75) и отрицательный — в иммуноблоттинге-IgM (по отношению к ТрпА и ТрN47 — по 0,3+), и с четырьмя образцами сыворотки с положительными результатами исследования в ИФА_{IgM} (два образца сыворотки со средним содержанием IgM, КП = 4,75 и 5,87 соответственно и 2 — с высоким содержанием IgM, КП = 9,82 и 16,71 соответственно) и иммуноблоттинге-IgM. В образцах с неопределенными результатами исследования в иммуноблоттинге-IgG в 3 случаях выявляли антитела к ТрпА и в 2 случаях — к ТрN47.

Положительные результаты в иммуноблоттинге-IgG были получены с 70 образцами, в том числе: с одним образцом, показавшим отрицательный результат исследования в ИФА_{IgM} (КП = 0,97) и положительный в иммуноблоттинге-IgM, с 7 образцами, демонстрировавшими в ИФА_{IgM} положительные результаты и неопределенные в иммуноблоттинге-IgM, и с 62 образцами с положительными результатами исследования как в ИФА_{IgM}, так и в иммуноблоттинге-IgM.

Положительные заключения о результатах исследования в иммуноблоттинге-IgG были установлены при выявлении в образцах антител к двум антигенам

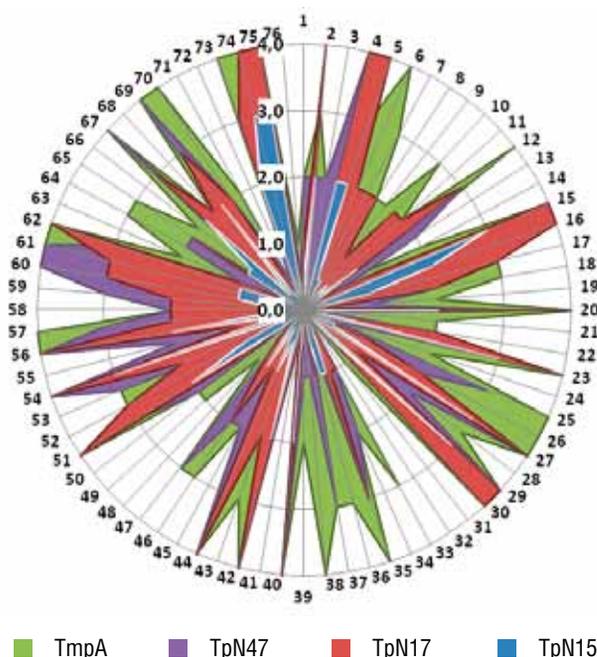


Рис. 4. Содержание антител класса G (в усл. ед. — плюсах) к антигенам *T. pallidum* в сыворотке крови 76 больных первичным сифилисом

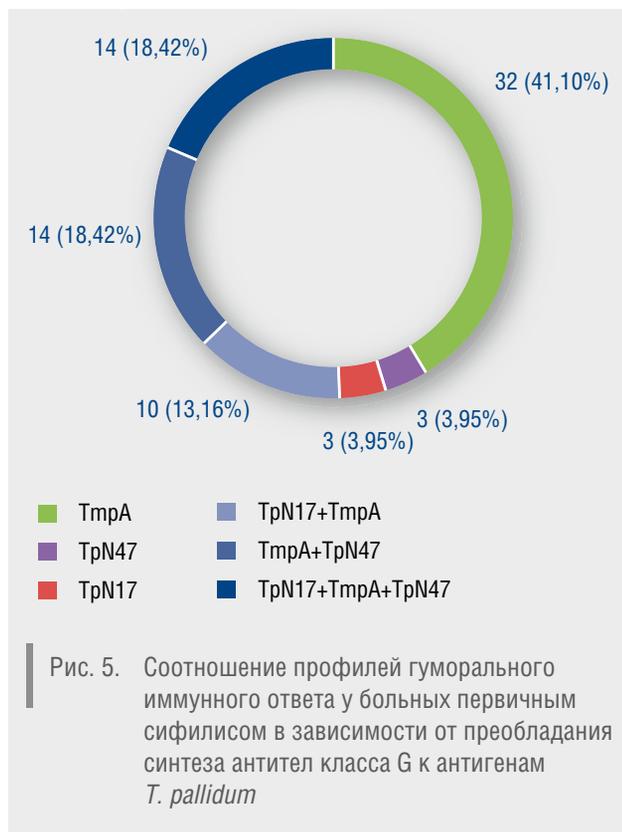
T. pallidum на уровне 0,5+ и более в 9 (12,86%) из 70 случаев, с тремя антигенами — в 18 (25,71%) и с четырьмя антигенами — в 43 (61,43%) случаях.

Результаты исследования в иммуноблоттинге-IgG также были сопоставлены с целью определения приоритетов антителообразования к изучавшимся антигенам возбудителя заболевания (рис. 4).

Превалирование гуморального ответа изолированно на антиген ТрN15 по сравнению с другими антигенами, нанесенными на стрипы в составе набора «Лайн-Блот-Сифилис-IgG», не наблюдали ни в одном случае (0%) из 76 обследованных больных сифилисом первичным.

По максимальной выраженности образования антител класса G у больных первичным сифилисом было выделено 6 возможных профилей гуморального иммунного ответа:

- 1) наиболее высокое содержание антител только к антигену ТрN17 на уровне ++++ в 3 (3,95%) случаях;
- 2) наиболее высокое содержание антител только к антигену ТрпА на уровне + / ++++ в 32 (42,10%) случаях;
- 3) наиболее высокое содержание антител только к антигену ТрN47 на уровне 0,5+ / ++ — в 3 (3,95%) случаях;



4) наиболее высокое содержание антител к двум антигенам одновременно (TrpN17 и TrpA) на уровне ++ / ++++ в 10 (13,16%) случаях;

5) наиболее высокое содержание антител к двум антигенам одновременно (TrpA и TrpN47) на уровне ++ / ++++ в 14 (18,42%) случаях;

6) наиболее высокое содержание антител к трем антигенам одновременно (TrpN17, TrpA и TrpN47) на уровне ++ / ++++ в 14 (18,42%) случаях (рис. 5).

Отсутствие антител к антигену TrpN15 у больных первичным сифилисом наблюдали в 20 (26,31%) случаях, следовые значения (0,3+) выявили в 12 (15,79%) и положительные результаты (от 0,5+ до ++) — в 44 (57,90%) случаях.

Отсутствие антител к антигену TrpN17 было установлено в 8 (10,53%) образцах сыворотки крови, следовые значения (0,3+) — в 8 (10,53%) и положительные результаты (от 0,5+ до ++++) — в 60 (78,95%).

При исследовании специфических антител к антигену TrpA отрицательные значения наблюдали в 1 (1,32%) случае, следовые уровни (0,3+) — в 2 (2,63%) и положительные (от 0,5+ до ++++) — в 73 (96,05%) случаях.

Антитела к антигену TrpN47 не были выявлены у 2 (2,63%) больных первичным сифилисом, следовые значения (0,3+) наблюдали у 3 (3,95%) и положительные результаты (от 0,5+ до ++++) — у 71 (93,42%) пациента (табл. 2).

Таблица 2 Результаты определения в иммуноблоттинге антител класса G к антигенам *T. pallidum* у больных сифилисом первичным

Результаты исследования	Результаты выявления антител к антигенам, абс. (%)			
	TrpN15	TrpN17	TrpA	TrpN47
Отрицательный, —	20 (26,31)	8 (10,53)	1 (1,32)	2 (2,63)
Отрицательный, 0,3+	12 (15,79)	8 (10,53)	2 (2,63)	3 (3,95)
Всего	32 (42,10)	16 (21,05)	3 (3,95)	5 (6,58)
Положительный, 0,5+	13 (17,11)	2 (2,63)	0 (0)	7 (8,22)
Положительный, +	12 (15,79)	13 (17,11)	4 (5,26)	10 (13,15)
Положительный, ++	12 (15,79)	17 (22,37)	21 (27,63)	24 (31,58)
Положительный, +++	7 (9,21)	9 (11,84)	19 (25,00)	16 (21,05)
Положительный, ++++	0 (0)	19 (25,00)	29 (38,16)	14 (18,42)
Всего	44 (57,90)	60 (78,95)	73 (96,05)	71 (93,42)
Итого	76 (100)	76 (100)	76 (100)	76 (100)

Средние показатели ($M \pm m$) содержания IgG антител составили: для антигенов ТрN15, ТрN17, ТрpA и ТрN47 соответственно: $0,9 \pm 0,1$; $2,0 \pm 0,1$; $2,9 \pm 0,1$ и $2,2 \pm 0,1$ (рис. 3).

Как следует из диаграммы, представленной на рис. 3, у больных на начальных этапах развития сифилитической инфекции наблюдалась высокая степень аналогии в приоритетах (последовательности появления и выраженности) синтеза антител классов М и G к антигенам, включенным в исследование. При этом интенсивность гуморального ответа с участием антител класса G превосходила таковую с участием антител класса М; в ряде случаев наблюдалось нивелирование различия в количестве выявляемых антител по отношению к разным антигенам *T. pallidum* путем «выравнивания» интенсивности гуморального ответа по верхней границе (++++), определяемой методом иммуноблоттинга. Высокий уровень антителообразования с участием IgG при первичном сифилисе обеспечивал более высокий показатель клинической чувствительности иммуноблоттинга-IgG по сравнению с иммуноблоттингом-IgM (92,11 и 85,53% соответственно).

Таким образом, данные проведенного исследования позволили установить, что в подавляющем большинстве случаев при первичном сифилисе гуморальный ответ с участием антител класса М к антигенам *T. pallidum* сочетается с выработкой антител класса G. У больных первичным сифилисом преобладала частота выявления и интенсивность образования антител класса G к антигенам ТрpA и ТрN47 — в 98,68% ($M \pm m = 2,9 \pm 0,1$) и 97,37% ($M \pm m = 2,2 \pm 0,1$) случаев соответственно, по сравнению с которыми менее часто и несколько слабее был выражен синтез антител к антигенам ТрN17 — в 89,47% ($M \pm m = 2,0 \pm 0,1$) и к ТрN15 — в 73,69% ($M \pm m = 0,8 \pm 0,1$) случаев.

Заключение

Проведенное исследование сыворотки крови больных первичным сифилисом с применением метода иммуноблоттинга позволило изучить последовательность обнаружения антител к отдельным антигенам *T. pallidum* на ранних этапах развития инфекционного процесса:

- впервые выявлены и охарактеризованы разные профили первичного гуморального ответа с уча-

стием антител класса М, различающиеся более выраженным синтезом антител к какому-либо одному антигену *T. pallidum*: максимальную выраженность иммунного ответа наблюдали на антиген ТрpA — у 65,79% больных при значении содержания антител ($M \pm m$) $1,9 \pm 0,1$ (условных единиц), на ТрN17 — у 22,37% ($M \pm m = 1,0 \pm 0,1$), на ТрN47 — у 9,21% ($M \pm m = 0,9 \pm 0,1$) и на ТрN15 — у 2,63% ($M \pm m = 0,4 \pm 0,1$);

- частота определения в сыворотке крови больных первичным сифилисом антител класса М составила: к антигену ТрpA — 100% случаев, к ТрN47 и ТрN17 — по 90,79% и к ТрN15 — только 72,37% случаев;
- в подавляющем большинстве случаев при первичном сифилисе гуморальный ответ с участием антител класса М сочетался с выработкой антител класса G; при этом содержание в крови антител класса G к каждому из четырех изученных антигенов *T. pallidum* более чем в 2 раза превосходило уровень антител класса М;
- охарактеризована частота выявления в сыворотке крови трепонемоспецифических антител класса G: к антигену ТрpA — у 98,68% больных, к ТрN47 — у 97,37%, к ТрN17 — у 89,47% и к ТрN15 — у 73,69%;
- выраженность гуморального ответа с участием антител класса G по отношению к разным антигенам повторяет последовательности, установленные в отношении антител класса М: приоритет иммунного ответа на антиген ТрpA наблюдали в 42,10% случаев ($M \pm m = 1,9 \pm 0,1$), на ТрN17 — в 3,95% ($M \pm m = 2,0 \pm 0,1$), на ТрN47 — в 3,95% ($M \pm m = 2,2 \pm 0,1$), одновременно на ТрN17 и ТрpA — в 10,16% случаев, одновременно на ТрpA и ТрN17 — в 18,42%, одновременно на ТрN17, ТрpA и ТрN47 — в 18,42%.

Клиническая чувствительность иммуноблоттинга при диагностике первичного сифилиса составила: при выявлении специфических антител к *T. pallidum* класса М — 85,53%, а при определении антител класса G — 92,11%.

Авторы выражают признательность руководителям ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск Московской области, Россия) и ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» (Нижний Новгород, Россия) за предоставленные для проведения настоящего исследования диагностические наборы реагентов. ■

Литература

1. Kashkin K.P. Immunologicheskie issledovaniya v klinike infektsionnykh zabolevaniy. Novosti prikladnoy immunologii i allergologii 2004; 8: 1—10. [Кашкин К.П. Иммунологические исследования в клинике инфекционных заболеваний. Новости прикладной иммунологии и аллергологии 2004; 8: 1—10.]
2. Yarilin A.A. Immunologiya. M: GEOTAR-Media, 2010. [Ярилин А.А. Иммунология. М: ГЭОТАР-Медиа, 2010.]
3. Merlin S., Andre J., Alacoque B. et al. Importance of specific IgM antibodies in 116 patients with various stages of syphilis. Genitourin Med 1985; 61 (2): 82—87.
4. Lyakhov V.F., Borisenko K.K., Potekaev N.S. i dr. Dinamika treponemospetsificheskoy immunoglobulinemii pri rannikh formakh sifilisa. Vestn dermatol i venerol 1990; 8: 38—42. [Ляхов В.Ф., Борисенко К.К., Потеекаев Н.С. и др. Динамика трепонемоспецифической иммуноглобулинемии при ранних формах сифилиса. Вестн дерматол и венерол 1990; 8: 38—42.]

5. Muller F., Hagedorn H.J. Syphilis. In: Thomas L. (Editor) Clinical Laboratory Diagnostics. TH Books Frankfurt, 1998: 1203—1212.
6. Haake D.A.; Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology 2000; 146 (7): 1491—1504.
7. Brinkman M.B., Mckevitt M., McLoughlin M. et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. J Clin Microbiol 2006; 44 (3): 888—891.
8. McGill M.A., Edmondson D.G., Carroll J.A. et al. Characterization and Serologic Analysis of the *Treponema pallidum* Proteome. Infect Immun 2010; 78 (6): 2631—2643.
9. Rotanov S.V., Khayrullin R.F., Frigo N.V. Изучение протеома *T. pallidum* с целью совершенствования лабораторных исследований для диагностики сифилиса. Vestn dermatol i venerol 2012; 4: 10—15. [Ротанов С.В., Хайруллин Р.Ф., Фриго Н.В. Изучение протеома *T. pallidum* с целью совершенствования лабораторных исследований для диагностики сифилиса. Vestn dermatol i venerol 2012; 4: 10—15.]
10. Eggstone S.I., Turner A.J. PHLS Syphilis Serology Working Group. Commun Dis Public Health 2000; 3 (3): 158—162.
11. Goh B.T. Syphilis in adults. Sex Transm Infect 2005; 81: 448—452.
12. Seña A.C., White B.L., Sparling P.F. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. Clin Infect Dis 2010; 51: 700—708.
13. Ho E.L., Lukehart S.A. Syphilis: using modern approaches to understanding an old disease. J Clin Invest 2011; 121 (12): 4584—4592.
14. Kubanova A.A., Frigo N.V., Rotanov S.V. et al. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса. Vestn dermatol venerol 2006; 2: 4—11. [Кубанова А.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В. и др. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса. Vestn dermatol i venerol 2006; 2: 4—11.]
15. Frigo N.V., Rotanov S.V., Nesterenko V.G. et al. Rezul'taty izucheniya diag-nosticheskoy effektivnosti novoy test-sistemy lineynogo immunofermentnogo analiza «Inno-Lia™ Syphilis Score». Klin lab diagn 2006; 3: 36—41. [Фриго Н.В., Ротанов С.В., Нестеренко В.Г. и др. Результаты изучения диагностической эффективности новой тест-системы линейного иммуноферментного анализа «Inno-Lia™ Syphilis Score». Клиническая лабораторная диагностика 2006; 3: 36—41.]
16. Cheruchenko N.V., Gladysheva M.V., Obryadina A.P. Novye vozmozhnosti ispol'zovaniya rekombinantnykh antigenov v serodiagnostike sifilisa. Klin dermatol venerol 2006; 2: 28—31. [Черученко Н.В., Гладышева М.В., Обрядина А.П. Новые возможности использования рекомбинантных антигенов в серодиагностике сифилиса. Клиническая дерматология и венерология 2006; 2: 28—31.]
17. Gomez E., Jespersen D.J., Harring J.A., Binnicker M.J. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 syphilis multiplex flow immunoassay for the detection of IgM- and IgG-class antitreponemal antibodies. Clin Vaccine Immunol 2010, 17 (6): 966—968.
18. Rotanov S.V., Osmanova S.R. Primenenie immunokhromatograficheskikh issledovaniy dlya diagnostiki sifiliticheskoy infektsii. Sovrem probl dermatovenerol immunol vrach kosmetol 2011; 5: 16—23. [Ротанов С.В., Османова С.Р. Применение иммунохроматографических исследований для диагностики сифилитической инфекции. Современная дерматовенерология и косметология 2011; 5: 16—23.]
19. Rotanov S.V., Frigo N.V., Manuk'yan T.E. et al. Otsenka klinicheskoy informativnosti metoda immunokhemiiluminestsentsii pri diagnostike sifiliticheskoy infektsii. Vestn dermatol i venerol 2012; 1: 49—55. [Ротанов С.В., Фриго Н.В., Манукьян Т.Е. и др. Оценка клинической информативности метода иммунохемилюминесценции при диагностике сифилитической инфекции. Vestn dermatol i venerol 2012; 1: 49—55.]
20. Frigo N.V., Rotanov S.V., Manuk'yan T.E. et al. Laboratornaya diagnostika sifilisa: vchera, segodnya, zavtra. Vestn dermatol i venerol 2012; 4: 16—23. [Фриго Н.В., Ротанов С.В., Манукьян Т.Е. и др. Лабораторная диагностика сифилиса: вчера, сегодня, завтра. Vestn dermatol i venerol 2012; 4: 16—23.]
21. Prikaz Minzdrava Rossii № 327 от 25.07. 2003 года «Ob utverzhdenii Protokola vedeniya bol'nykh «SIFILIS»». [Приказ Минздрава России № 327 от 25.07. 2003 года «Об утверждении Протокола ведения больных «Сифилис»».]
22. Klinicheskie rekomendatsii po vedeniyu bol'nykh infektsiyami, peredavaemymi polovym putem, i urogenital'nymi infektsiyami (Russian Public Organization «Russian Society of Dermatovenereologists and Cosmetologists»). Pod red. A.A. Kubanovoy. M.: «DELOVOY EKSPRESS», 2012: 34—68. [Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями (Российское общество дерматовенерологов и косметологов). Под ред. А.А. Кубановой. М.: «ДЕЛОВОЙ ЭКСПРЕСС», 2012: 34—68.]
23. Hagedorn H.J., Kraminer-Hagedorn A., De Bosschere K. et al. Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. J Clin Microbiol 2002; 40(3): 973—978.
24. LaFond R.E., Lukehart S.A. Biological basis for syphilis. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 29—49.
25. Tomson F.L., Conley P.G., Norgard M.V., Hagman K.E. Assessment of cell surface exposure and vaccinogenic potentials of *Treponema pallidum* candidate outer membrane proteins. Microbes Infect 2007; 9 (11): 1267—1275.
26. Cox D.L., Luthra A., Dunham-Ems S. et al. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. Infection Immun 2010; 78 (12): 5178—5194.
27. Lazarev V.N., Shkarupeta M., Levitski S. et al. Ekspressiya potentsial'nykh antigenov T. pallidum v E. coli. Biotekhnologiya. Teoriya i praktika 2010; 4: 80—87. [Лазарев В.Н., Шкарупета М., Левицкий С. и др. Экспрессия потенциальных антигенов *T. pallidum* в *E. coli*. Биотехнология. Теория и практика 2010; 4: 80—87.]

об авторах:

Ротанов С.В. — д.м.н., доцент, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики инфекций, передаваемых половым путем, и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России», профессор кафедры дерматовенерологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Эрматова Ф.А. — аспирант кафедры дерматовенерологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва