

Изучение протеома *T. pallidum* с целью совершенствования лабораторных исследований для диагностики сифилиса

С.В. Ротанов, Р.Ф. Хайруллин, Н.В. Фриго

Studies of *T. pallidum* proteome for the purpose of improving laboratory assessments for the syphilis diagnostics

S.V. ROTANOV, R.F. HAYRULIN, N.V. FRIGO

об авторах: ▶

С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Р.Ф. Хайруллин — к.х.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Н.В. Фриго — д.м.н., заместитель директора по научно-образовательной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

В обзоре рассмотрены проблемы, касающиеся путей развития современных методов лабораторных исследований, применяемых для диагностики сифилиса, на основе использования специфических антигенов возбудителя заболевания.

Представлены результаты исследований отдельных белков из состава иммунопротеома *T. pallidum*.

Приведены данные о возможности их использования для создания новых методов исследования и разработки диагностических наборов реагентов на основе выявления антител к целевым белкам *T. pallidum* в образцах сыворотки крови больных с разными клиническими формами сифилиса.

Ключевые слова: сифилис, антигены, биология *T. pallidum*, лабораторные методы диагностики, иммунологические исследования, иммунопротеом.

The review covers problems related to the ways of development of modern methods of laboratory assessment used for syphilis diagnostics on the basis of the use of specific antigens of the pathogenic agent.

Results of studies of some immune proteome proteins of *T. pallidum* have been provided.

The data on the possibility of their use for the development of new laboratory methods based on the detection of antibodies to *T. pallidum* target proteins in blood serum samples of patients with different clinical forms of syphilis.

Key words: syphilis, antigens, *T. pallidum* biology, laboratory methods of diagnostics, immunological studies, immune proteome.

■ Сифилис относится к антропонозным инфекционным заболеваниям с преимущественно половым путем передачи возбудителя *Treponema pallidum* подвид *pallidum*. Заболевание характеризуется хроническим рецидивирующим течением с постепенным вовлечением в патологический процесс различных тканей и систем органов, что приводит к нарушению жизненно важных функций организма человека.

Лабораторная диагностика сифилиса основана на прямом выявлении возбудителя заболевания из очагов поражения на коже или видимых слизистых оболочках и его визуальной идентификации по морфологическим свойствам при микроскопии в темном поле зрения или выявлении уникальных фрагментов генетического материала молекулярно-биологическими методами (ПЦР, ДНК-гибридизация). Для первичного

скрининга и установления диагноза при латентных клинических формах заболевания определяющую роль играют иммунологические методы исследования, основанные на выявлении антител к наиболее специфичным антигенам *T. pallidum* [1—4]. Результаты иммунологических исследований в ряде случаев позволяют оценивать эффективность специфического лечения, проведенного больным сифилисом, и решать вопросы о необходимости дополнительной терапии или прекращении клинико-серологического наблюдения.

В структуре клетки *T. pallidum* установлено 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 [1, 5]. Для лабораторной диагностики сифилиса необходимы антигены, видоспецифичные для патогенной *T. pallidum*.

Патогенная *T. pallidum* относится к плохо культивируемым на искусственных питательных средах микроорганизмам, при выращивании *in vitro* этот микроорганизм теряет свойство патогенности и некоторые исходные специфические антигенные характеристики [6, 7]. К группе культивируемых на искусственных средах бледных трепонем относятся наиболее широко известные штаммы: Reiter, Kroo, Noguchi, Kazan [6].

Для получения препаративных количеств нативных антигенов *T. pallidum* патогенного штамма Nichols был разработан способ культивирования возбудителя в семенниках 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 материала, инокулируемого лабораторным животным, условий их содержания, длительности инкубационного периода. Получаемый биоматериал представляет собой сложную смесь различных антигенов, включая тканевые белки лабораторного животного [7, 8].

Для лабораторных исследований разработаны также методики культивирования клинических изолятов патогенной бледной трепонемы *in vitro* на клеточных культурах млекопитающих, однако они позволяют поддерживать не более 11 пассажей и при этом не обеспечивают получение значимых количеств биомассы микроорганизма [9—12].

Сведения о белках *T. pallidum* длительное время были ограничены не только вследствие невозможности длительного культивирования возбудителя *in vitro*, но также трудностями проведения непосредственных генетических манипуляций с ними, что не позволяло осуществить прямой анализ функций продуктов индивидуальных генов [13].

Развитие методов молекулярной биологии в конце XX века, в том числе разработка технологии получения рекомбинантных белков, а также методов функциональной геномики и протеомики открыло широкие перспективы в изучении функций белкового комплекса возбудителя и дало основу для широкомасштабного поиска новых потенциальных антигенов для диагностики сифилитической инфекции [14—17]. 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 [18, 19]. Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в гомогенном состоянии любой индивидуальный антиген [1, 16].

Для обозначения отдельных белков *T. pallidum* была предложена специальная номенклатура, в соответствии 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) [20, 21]. 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 способные кодировать белок) с префиксом Tr (например, Tr0136). Таким образом, некоторые белки могут одновременно иметь несколько обозначений (например, TmpA, TrN41—42 или Tr0768).

Возбудитель сифилиса *T. pallidum* отличается от других бактерий особенностями физиологии и строения клетки. Используя метод электронной микроскопии, Н.М. Овчинников и В.В. Делекторский (1974) установили, что важнейшим структурным компонентом бледной трепонемы является клеточная стенка: она состоит из прозрачного чехла, внешней трехслойной (двух электронно-плотных листков, разделенных электронно-прозрачным слоем) и цитоплазматической мембран [22]. Клеточная стенка предохраняет трепонему от воздействия антител и антибиотиков, а также обеспечивает способность бактериальной клетки к избирательному транспорту и переносу веществ.

Внешняя мембрана *T. pallidum*, в отличие от мембран других грамотрицательных бактерий, лишена липополисахаридов и эндотоксинов, а количество белков на ее поверхности примерно в 100 раз меньше, чем у других бактерий [23, 24]. Это свойство приводит к тому, что возбудитель сифилиса может персистировать в организме хозяина в течение длительного времени, оставаясь малозаметным для иммунной системы [23, 25].

Качественный скачок в области изучения антигенного состава *T. pallidum* произошел после расшифровки генома возбудителя сифилиса, осуществленного группой американских исследователей в 1998 г. [17]. Геном микроорганизма представлен кольцевой двуцепочечной молекулой ДНК размером 1 138 012 пар оснований (1,14 млн пар оснований — м.п.о.). Это значительно меньше генома других грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (например, геном *E. coli* содержит 4,6 м.п.о., а геном *B. subtilis* — 4,2 м.п.о.). Как высокоспециализированный патоген, *T. pallidum* не имеет в своем геноме генов, отвечающих за синтез ферментов, расщепляющих жирные кислоты, она использует сахара, содержащиеся в жидких средах организма хозяина [26].

Геном *T. pallidum* насчитывает 1090 генов, из них 1039 кодируют белки, открытые рамки их считывания составляют 92,9% генома [12]. Молекулярная масса белков *T. pallidum* варьирует от 3,2 до 172,8 кД (средняя 37,7 кД).

Анализ *in silico* транслированного генома *T. pallidum* показал, что протеом микроорганизма представлен в основном положительно заряженными белками, среднее значение изоэлектрической точки (pI) которых составляет 8,1; при этом 66% белков микроорганизма обладают pI > 7,0 [27]. Установлено, что преобладание положительно заряженных белков характерно для протеомов паразитических микроорганизмов, и это свойство облегчает взаимодействие микроорганизма с хозяином [28]. На основании исследования сходства аминокислотных последовательностей в белках разных микроорганизмов для 55% открытых рамок считывания в структуре генома *T. pallidum* была предсказана биологическая функция кодируемых ими белков, для 17% установлена аналогия с белками с гипотетическими или с неизвестными функциями, в 28% случаев наблюдаемые последовательности не обладали значимым сходством с белками других микроорганизмов [12].

Следует отметить, что за исключением белка Tr0326/Tr92 [33, 41] в геноме бледной трепонемы не обнаружены аналоги известных белков внешней мембраны других грамотрицательных микроорганизмов [17].

Состав белков *T. pallidum* в настоящее время изучается методами протеомики — современного направления молекулярной биологии, занимающего

сравнительным изучением белков, которые могут быть экспрессированы микроорганизмом в определенную фазу жизнедеятельности [29, 30], предсказанием функциональной роли отдельных белков путем экспериментального сопоставления их качественного и количественного составов в разных клетках, а также установлением взаимосвязи структуры белка и его функций [31].

После расшифровки генома *T. pallidum* появилась серия работ по изучению протеома возбудителя сифилиса с целью выявления новых белков, представляющих интерес для создания вакцины или диагностики на их основе.

Для поиска новых антигенов *T. pallidum* в настоящее время используются следующие методы протеомики и функциональной геномики, взаимно дополняющие друг друга: серологический скрининг нативных белков *T. pallidum*, разделенных методом двумерного электрофореза [16], серологический скрининг рекомбинантных экспрессионных библиотек *T. pallidum* [14, 15, 32], изучение набора белков, полученных из отдельных частей клетки возбудителя (например, протеом белков наружной мембраны — OMom — outer membrane proteome) [33, 34], изучение профиля экспрессии мРНК *T. pallidum* в процессе развития инфекции [35], исследование взаимодействий белков возбудителя с помощью дрожжевой двугибридной системы [36]. Преимущества сочетанного применения методов протеомики и функциональной геномики в поиске новых антигенов состоит в том, что одновременно определяется широкий набор иммуногенных белков, экспрессируемых на различных стадиях заражения [37].

Данные о полногеномной последовательности ДНК *T. pallidum* позволили провести широкомасштабное клонирование белков, в том числе ранее неизвестных. Так, М. McSevitt и соавт. (2003) создали экспрессионную библиотеку, содержащую 882 из 1039 белков, предсказанных по последовательности ДНК *T. pallidum*. Авторами также было проведено скрининговое исследование антигенных свойств полученных рекомбинантных белков на модели лабораторного животного, при этом было выявлено 106 антигенов (в том числе 84 ранее не описанных), в отношении которых наблюдалась иммунная активность сыворотки крови зараженных сифилисом кроликов [14].

Для выявления белков *T. pallidum*, в отношении которых выявляется иммунный ответ у человека, М. Brinkman и соавт. (2006) был проведен серологический скрининг рекомбинантных экспрессионных библиотек *T. pallidum* с использованием образцов сыворотки крови, полученных от больных сифилисом [32]. Изучение обширного набора рекомбинантных белков *T. pallidum* проводили в два этапа. На первом этапе для определения иммунологически активных белков был проведен скрининг 908 рекомбинантных белков

T. pallidum в отношении сывороток крови, полученных у больных с сифилисом скрытым ранним. При этом было выявлено 34 белка, проявляющих выраженную иммунную активность; для этих белков ранее уже была показана реактивность в отношении сыворотки крови зараженных сифилисом кроликов [14].

На втором этапе работы авторы изучали иммунные свойства белков возбудителя сифилиса на разных стадиях сифилитической инфекции: первичной, вторичной и скрытой ранней. Для этого было отобрано 90 белков *T. pallidum* с ранее описанной реактивностью в отношении сыворотки крови экспериментальных лабораторных животных и проведено исследование их индивидуальной активности в отношении сыворотки человека хемилюминесцентным методом. При дифференцированном исследовании было выявлено 38 белков, проявляющих антигенные свойства на разных (одной или нескольких) стадиях течения сифилитической инфекции; 14 из них проявляли активность с образцами крови, полученными от больных на всех изученных стадиях заболевания [32]. Совокупность белков возбудителя сифилиса, проявляющих иммуногенные свойства, была названа авторами иммунопротеомом *T. pallidum* [36].

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 [16]. С другой стороны, неэффективная экспрессия и/или фолдинг рекомбинантных белков *T. pallidum* в клетках *E. coli* могут приводить к ложноотрицательным результатам исследования.

Для верификации знаний об иммунопротеоме *T. pallidum* с учетом вышеперечисленных особенностей проведения исследований М. McGill и соавт. (2010) было проведено изучение белков бледной спирохеты в ходе экспериментальной инфекции лабораторных кроликов на основе двумерного электрофореза и масс-спектрометрии [16]. Клетки *T. pallidum* были выделены из тестикул зараженных кроликов, лизаты клеток возбудителя разделены с помощью двумерного электрофореза с последующей окраской гелей нитратом серебра и идентификацией обнаруженных полипептидов *T. pallidum* методом масс-спектрометрии с матрично-активированной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF). Для анализа иммуногенности обнаруженных белков был проведен иммуноблоттинг с образцами сыворотки крови зараженных кроликов и больных сифилисом, полученных на разных стадиях инфекционного процесса [16]. Для этого белки лизированных клеток *T. pallidum* разделяли методом двумерного электрофореза, переносили на нейтральную реакционную мембрану и инкубировали с образцами сыворотки крови. Образование иммунных комплексов выявлялось с помощью моноклональных анти-

тел к IgG, меченных щелочной фосфатазой. Высокая воспроизводимость исследований с использованием двумерных гелей позволяла сопоставлять белковые пятна на иммунном блоте и двумерном геле, окрашенном серебром, и идентифицировать серореактивные белки *T. pallidum*. Всего было изучено 148 белковых пятен, относящихся к 88 полипептидам *T. pallidum*, 63 из которых ранее не были описаны на белковом уровне. Среди иммуногенных полипептидов были выявлены 29 уже известных и ряд новых, ранее не описанных белков. Для пяти белков (бактериоферритин TrF1, интегральный мембранный белок TP0453, предполагаемый мембранный белок TP0965, гипотетические белки TP0584 и TP0608) была показана иммуногенность в отношении как кроличьих сывороток, так и сывороток, полученных у больных сифилисом первичным. Указанные белки, выявленные методом двумерного электрофореза и методом масс-спектрометрии, могут представлять интерес для разработки методов ранней диагностики сифилитической инфекции [16].

Данные по экспрессии белковых продуктов в клетках *T. pallidum* согласовывались с результатами изучения профиля экспрессии мРНК в процессе сифилитической инфекции на экспериментальной модели сифилиса [35]. На двумерном геле выявлялись почти все белки, для мРНК которых была показана высокая экспрессия при анализе транскриптома *T. pallidum* [16].

Особый интерес для понимания патогенеза и разработки новых методов диагностики сифилитической инфекции представляет протеом белков наружной мембраны *T. pallidum* [33]. Внешняя мембрана клетки возбудителя сифилиса содержит малое количество интегральных мембранных белков, которые могут служить мишенями для иммунной системы хозяина [38, 39]. Определение последовательностей нуклеиновых кислот в геноме *T. pallidum* предоставило исследователям возможность использования методов биоинформатики для полногеномного поиска белков с потенциальной локализацией на внешней мембране [33, 40]. Для выявления потенциальных белков наружной мембраны бледной спирохеты используют алгоритмы, учитывающие вероятность образования бета-складчатых структур [33].

В работе D. Cox и соавт. (2010) был использован метод перекрестной проверки принадлежности белков *T. pallidum* к белкам внешней оболочки с использованием нескольких биоинформатических алгоритмов [33]. Для предсказания структуры белков по последовательности кодирующих их генов авторы использовали различные серверы. При скрининге потенциальных белков внешней мембраны *T. pallidum* использовалось определение их субклеточной локализации с помощью программ предсказания образования бета-складчатой конфигурации белков по последовательности кодирующих их генов (CELLO, PSORTb 3.0, TMBETADISC-Position-Specific Scoring Matrix (PSSM),

TMBETADISC amino acid composition (AAC), BOMP, Hhomp, PRED-TMBB); проводилась фильтрация общих по происхождению немембранных белков, липопротеинов и белков с предсказанными трансмембранными альфа-спиральными участками, отличными от сигнальных, и дополнительный поиск отщепляемых сигнальных последовательностей с использованием серверов TMHMM и PHOBIUS. Применение многоуровневой фильтрации позволило составить список потенциальных белков внешней мембраны *T. pallidum*, причем для части белков уже получено экспериментальное подтверждение их локализации. Тем не менее, несмотря на достигнутые успехи в геномике бледной спирохеты, знания о протеоме белков наружной мембраны *T. pallidum* неполны [33].

Как отмечает D. Нааке (2000), для установления принадлежности определяемых белков к наружной мембране микроорганизма обязательна экспериментальная проверка участков их локализации [42]. При исследовании локализации белков, экспонированных на поверхности возбудителя, основная проблема заключается в трудности их отделения от белков подлежащих слоев клеточной оболочки — периплазмы и цитоплазматической мембраны. Для решения этой задачи применяют различные молекулярно-биологические и физические методики (методы фазового разделения с помощью детергентов) [33,43]. 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* [44, 45]. Однако применение технологии получения рекомбинантных антигенов дает только косвенные данные об их поверхностном расположении вследствие различий в архитектуре клеточной оболочки *E. coli* и *T. pallidum*, и не всегда данные, полученные на модели кишечной палочки, можно переносить на возбудитель сифилиса. Так, 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 [23], что было наиболее убедительно подтверждено экспериментальными данными [42].

Наружная мембрана *T. pallidum* является очень хрупкой; для предотвращения ее повреждения при иммунофлюоресцентном окрашивании была разработана техника заключения клеток возбудителя в микрокапсулы из легкоплавкой агарозы [43] и фазового разделения мембран микроорганизма обработкой детергентами. Для контроля целостности внешней мембраны используют технологию двойного окрашивания антителами к белкам филаментов FlaA. Данная техника позволила экспериментально проверить клеточную локализацию некоторых белков *T. pallidum*. Показано, что широко используемые в клинической лабораторной диагностике белки *T. pallidum* с молекулярной массой 15, 17 и 47 кД взаимодействовали с иммунной сывороткой кроликов только при обработке клеток *T. pallidum* детергентом, который растворяет внешнюю мембрану клетки. Проведенные исследования позволили экспериментально подтвердить локализацию этих белков на цитоплазматической мембране клетки [33, 43].

Как следует из представленного обзора, на каждом последующем этапе развития методов научного исследования постепенно происходит пополнение и уточнение комплекса научных представлений о составе, локализации, функциональном предназначении и иммунной реактивности протеома возбудителя сифилитической инфекции *T. pallidum*.

В этой связи создание новых, высокочувствительных и специфичных методов лабораторного исследования для выявления сифилиса должно базироваться на глубоком, детальном изучении свойств отдельных целевых белков из состава иммупротеома *T. pallidum*. ■

Литература

1. Черешнев В.А., Патрушева Н.Б., Бейкин Я.Б. и др. Сифилис: Иммунология и лабораторная диагностика. Екатеринбург: УрО РАН, 2006.
2. Соколовский Е., Фриго Н., Ротанов С. и др. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы. Вестн. дерматол. и венерол. 2008; 5: 87—96.
3. Китаева Н.В., Фриго Н.В., Мелехина Л.Е. Актуальные проблемы сифилидологии. Современные технологии диагностики сифилитической инфекции. Вестн. дерматол. и венерол. 2008; 5: 51—59.
4. Гуцин А.Е., Фриго Н.В., Дударева Л.А. и др. Перспективы применения полимеразной цепной реакции для диагностики ранних форм сифилиса. Вестн. дерматол. и венерол. 2009; 1: 45—46.
5. Китаева Н.В., Фриго Н.В., Ротанов С.В. и др. Перспективы диагностического использования протеомных технологий в диагностике ИППП и заболеваний кожи. Вестн. дерматол. и венерол. 2010; 4: 17—27.
6. Turner T.B., Hollander D.H. Biology of the treponematoses. WHO, 1957.
7. Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. М.: Медицина; 1987.
8. Овчинников Н.М. Экспериментальный сифилис. М.: Медгиз; 1955.
9. Fieldsteel A.H., Cox D.L., Moeckli R.A. Cultivation of virulent *Treponema pallidum* in tissue culture. Infect and Immunity 1981; 32(2): 908—915.
10. Fieldsteel A.H., Cox D.L., Moeckli R.A. Further studies on replication of virulent *Treponema pallidum* in tissue cultures of Sf1Ep cells. Infect and Immunity 1982; 35(2): 449—455.

11. Norris S.J. In vitro cultivation of *Treponema pallidum*: Independent confirmation. *Infect and Immun* 1982; 36(1): 437—439.
12. Norris S.J., Cox D.L., Weinstock G.M. Biology of *Treponema pallidum*: Correlation of functional activities with genome sequence data. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3(1): 37—62.
13. Cameron C.E., Kuroiwa J.M., Yamada M., et al. Heterologous expression of the *Treponema pallidum* laminin-binding adhesin Tp0751 in the culturable spirochete *Treponema phagedenis*. *J Bacteriol* 2008; 190(7): 2565—2571.
14. McKeivitt M., Patel K., Smajs D. et al. Systematic cloning of *Treponema pallidum* open reading frames for protein expression and antigen discovery. *Genome research* 2003; 13(7): 1665—1674.
15. McKeivitt M., Brinkman M.B., McLoughlin M. et al. Genome scale identification of *Treponema pallidum* antigens. *Infect and Immun* 2005; 73 (7): 4445—4450.
16. McGill M.A., Edmondson D.G., Carroll J.A. et al. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. *Infect and Immun* 2010; 78 (6): 2631—2643.
17. Fraser C.M., Norris S.J., Weinstock G.M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 1998; 281(5375): 375—388.
18. Stamm L.V., Bassford P.J., Jr. Cloning and expression of *Treponema pallidum* protein antigens in *Escherichia coli*. *DNA* 1982; 1(4): 329—333.
19. Walfield A.M., Haniff P.A., Lovett M.A. Expression of *Treponema pallidum* antigens in *Escherichia coli*. *Science* 1982; 216(4545): 522—523.
20. Norris S. Polypeptides of *Treponema pallidum*: Progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema pallidum* polypeptide research group. *Microbiological reviews* 1993; 57(3): 750.
21. Gross G., Tying S.K. Sexually transmitted infections and sexually transmitted diseases. Springer, 2011.
22. Овчинников Н.М., Делекторский В.В. Атлас электронной микроскопии некоторых представителей рода трепонем, рода нейссерия и трихомонад. М.: Медицина; 1974.
23. Lafond R.E., Lukehart S.A. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 29—49.
24. Hardy P.H., Levin J. Lack of endotoxin in *Borrelia hispanica* and *Treponema pallidum*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Soc for Exp Biol and Medicine (N.Y.)* 1983; 174(1): 47—52.
25. Brinkman M.B., McGill M.A., Pettersson J. et al. A novel *Treponema pallidum* antigen, Tp0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin. *Infect and Immun* 2008; 76(5): 1848—1857.
26. Schiller N.L., Cox C. Catabolism of glucose and fatty acids by virulent *Treponema pallidum*. *Infect and Immun* 1977; 16(1): 60—68.
27. Nally J.E., Whitelegge J.P., Carroll J.A. Proteomic strategies to elucidate pathogenic mechanisms of spirochetes. *Proteom Clin Applicat* 2007; 1(9): 1185—1197.
28. Knight C.G., Kassen R., Hebestreit H., Rainey P.B. Global analysis of predicted proteomes: Functional adaptation of physical properties. *Proceedings of the Nat Acad of Scien of the USA* 2004; 101(22): 8390.
29. Liebler D.C. Introduction to proteomics: Tools for the new biology. Humana Press, 2001.
30. Mishra N.C., Blobel G. Introduction to proteomics: Principles and applications. John Wiley & Sons, 2010.
31. Humphery Smith I., Cordwell S.J., Blackstock W.P. Proteome research: Complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 1997; 18(8): 1217—1242.
32. Brinkman M.B., McKeivitt 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.
33. 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*. *Infect and Immun* 2010; 78(12): 5178—5194.
34. Tomson F.L., Conley P.G., Norgard M.V., Haggman K.E. Assessment of cell-surface exposure and vaccinogenic potentials of *Treponema pallidum* candidate outer membrane proteins. *Microbes and infection* 2007; 9(11): 1267—1275.
35. Šmajš D., McKeivitt M., Howell J.K. et al. Transcriptome of *Treponema pallidum*: Gene expression profile during experimental rabbit infection. *J of bacteriol* 2005; 187(5): 1866—1874.
36. Tjalsma H., Schaeps R.M.J., Swinkels D.W. Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications. *PROTEOMICS — Clinical Applicat* 2008; 2(2): 167—180.
37. Sanchez J.C., Corthals G.L., Hochstrasser D.F. Biomedical applications of proteomics. John Wiley & Sons, 2006.
38. Radolf J.D., Lukehart S.A. Pathogenic treponema: Molecular and cellular biology. Caister Academic, 2006.
39. Radolf J.D. *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins. *Molecular microbiol* 1995; 16(6): 1067—1073.
40. Cullen P.A., Haake D.A., Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; 28(3): 291—318.
41. Cameron C.E., Lukehart S.A., Castro C. et al. Oposonic potential, protective capacity, and sequence conservation of the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Tp92. *J of Inf Dis* 2000; 181(4): 1401—1413.
42. Haake D.A.; Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 2000; 146(7): 1491—1504.
43. Cox D.L., Akins D.R., Porcella S.F. et al. *Treponema pallidum* in gel microdroplets: A novel strategy for investigation of treponemal molecular architecture. *Molecular microbiol* 1995; 15(6): 1151—1164.
44. Baughn R., Jiang A., Abraham R. et al. 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. *The J of Immunol* 1996; 157(2): 720—731.
45. Blanco D.R., Giladi M., Champion C.I. et al. Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* genes encoding signal peptides and membrane-spanning sequences using a novel alkaline phosphatase expression vector. *Mol Microbiol* 1991; 5(10): 2405—2415.
46. Riviere G.R., Wagoner M.A., Baker-Zander S.A. et al. Identification of spirochetes related to *Treponema pallidum* in necrotizing ulcerative gingivitis and chronic periodontitis. *N Engl J Med* 1991; 325(8): 539—543.
47. Matsumoto M., Ishikawa F. Purification of *Treponema pallidum*, Nichols strain, by two-step column chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 663(2): 217—224.