Lek. Konrad Kaminiów

Udział „host immune response” w indukcji zjawiska surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej

Rozprawa na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Maciej Pastuszczak

Katedra Chorób Wewnętrznych, Dermatologii i Alergologii
Oddział Kliniczny Dermatologii w Zabrzu,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrzu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Promotor pomocniczy: prof. dr hab. n. med. Bogusław Okopień

Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Katowice 2026

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Panu dr hab. n. med. Maciejowi Pastuszczakowi,
za życzliwość, opiekę naukową, nieustanne wsparcie, poświęcony czas
oraz stworzenie warunków do rozwoju naukowego i klinicznego

Dziękuję również mojemu Promotorowi Pomocniczemu,
Panu prof. dr hab. n. med. Bogusławowi Okopieniowi,
za okazywaną przychylność, życzliwe zaangażowanie
oraz wszelką pomoc w rozwoju naukowym

W szczególny sposób dziękuję moim najbliższym:

Narzeczonej Izabelli
za miłość, codziennie okazywane zrozumienie i wsparcie,
motywację i wiarę w moje możliwości

oraz Rodzicom
Mamie Małgorzacie i Tacie Dariuszowi
za trud włożony w moje wychowanie, bezwarunkową miłość,
poświęcenie oraz wsparcie
okazywane na każdym etapie edukacji i rozwoju.
Dziękuję za przekazane wartości oraz stworzenie warunków,
dzięki którym mogłem realizować swoje cele i pasje

Niniejszą Rozprawę Doktorską
dedykuję Babci Emilii i Dziadkowi Stefanowi
W podziękowaniu za piękne, beztroskie lata dzieciństwa
i pierwsze, dziecięce etapy mojej edukacji

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW 5

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 7

WYKAZ TABEL 8

WYKAZ RYCIN 9

1. WSTĘP 10

2. CELE PRACY 14

2.1. Cel główny 14

2.2. Cele szczegółowe 14

3. MATERIAŁY I METODY 16

3.1. Charakterystyka badań i populacja badana 16

3.2. Ocena odpowiedzi serologicznej i definicja stanu surowiczooporności 17

3.3. Pobieranie materiału biologicznego 18

3.4. Oznaczenia immunologiczne i genetyczne 18

3.5. Badania serologiczne 20

3.6. Analiza statystyczna 20

3.7. Aspekty etyczne 21

4. WYNIKI 22

4.1. Związek polimorfizmów genu IFN-γ ze stanem surowiczooporności 22

4.2. Charakterystyka odpowiedzi komórkowej i humoralnej u pacjentów z surowiczoopornością 30

5. DYSKUSJA 39

6. WNIOSKI 47

7. PIŚMIENNICTWO 49

8. STRESZCZENIE 54

9. ABSTRACT 56

10. ZAŁĄCZNIKI 58

10.1. Publikacje wchodzące w skład doktoratu 58

10.2. Oświadczenia współautorów o merytorycznym udziale w powstaniu publikacji 77

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

aCL – (ang. anticardiolipin antibodies) – przeciwciała antykardiolipinowe

anti-β2GPI – przeciwciała przeciw β2-glikoproteinie I

aPL – (ang. antiphospholipid antibodies) – przeciwciała antyfosfolipidowe

CD – (ang. cluster of differentiation) – antygen różnicowania komórkowego

CDC – (ang. Centers for Disease Control and Prevention) – Centrum Kontroli i Prewencji Chorób

CI – (ang. confidence interval) – przedział ufności

CRP – (ang. C-reactive protein) – białko C-reaktywne

DNA – (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy

EDTA – (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) – kwas etylenodiaminotetraoctowy

ELISA – (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny

GPL – (ang. IgG phospholipid units) – jednostki przeciwciał antyfosfolipidowych klasy IgG

HIV – (ang. human immunodeficiency virus) – ludzki wirus niedoboru odporności

IFN-γ – (ang. interferon gamma) – interferon gamma

IgG – immunoglobulina klasy G

IgM – immunoglobulina klasy M

IL – interleukina

IL-10 – interleukina 10

IL-12 – interleukina 12

IL-17A – interleukina 17A

i.m. – (łac. intramuscularis) – domięśniowo

j.m. – jednostka międzynarodowa

MHC – (ang. major histocompatibility complex) – główny układ zgodności tkankowej

MPL – (ang. IgM phospholipid units) – jednostki przeciwciał antyfosfolipidowych klasy IgM

NK – (ang. natural killer cells) – komórki natural killer

NKT – (ang. natural killer T cells) – limfocyty NKT

OR – (ang. odds ratio) – iloraz szans

PCR – (ang. polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PCR-RFLP – (ang. polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism) – reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych

RPR – (ang. Rapid Plasma Reagin) – niekrętkowy test serologiczny stosowany w diagnostyce kiły

SGU – (ang. standard IgG units) – standardowe jednostki przeciwciał klasy IgG

SMU – (ang. standard IgM units) – standardowe jednostki przeciwciał klasy IgM

SNP – (ang. single nucleotide polymorphism) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

T. pallidum – *Treponema pallidum*

Th1 – (ang. T helper type 1 cells) – limfocyty T pomocnicze typu 1

TNF-α – (ang. tumor necrosis factor alpha) – czynnik martwicy nowotworów alfa

TPHA – (ang. *Treponema pallidum* hemagglutination assay) – test hemaglutynacji krętkowej

TprK – (ang. *Treponema pallidum* repeat protein K) – białko powtórzeniowe *Treponema pallidum* K

Treg – (ang. regulatory T cells) – limfocyty T regulatorowe

VDRL – (ang. Venereal Disease Research Laboratory) – niekrętkowy test serologiczny stosowany w diagnostyce kiły

WHO – (ang. World Health Organization) – Światowa Organizacja Zdrowia

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF): 11,8

Łączna punktacja MNiSW: 280 pkt

1. Praca oryginalna

IFN-γ gene polymorphisms +874 T/A and +2109 A/G are associated with the serofast state after early syphilis treatment: a prospective observational study

Konrad Kaminiów, Martyna Kiołbasa, Maciej Pastuszczak

Frontiers in Immunology, 2025

IF: 5,9 | MNiSW: 140 pkt | Q1

2. Praca oryginalna

Cytotoxic T-cell deficiency and sustained B-cell activation in serofast syphilis: a prospective observational study

Konrad Kaminiów, Martyna Kiołbasa, Katarzyna Napiórkowska-Baran, Maciej Pastuszczak

Frontiers in Immunology, 2026

IF: 5,9 | MNiSW: 140 pkt | Q1

WYKAZ TABEL

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów włączonych do badania polimorfizmów genu IFN-γ 23

Tabela 2. Częstość występowania polimorfizmów genu IFN-γ 27

Tabela 3. Stężenia IFN-γ przed leczeniem w zależności od genotypu i haplotypu 29

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna pacjentów, przy włączeniu do badania i po 6 miesiącach od zastosowania leczenia 32

Tabela 5. Wyniki parametrów immunologicznych oznaczanych u pacjentów, przy włączeniu do badania i po 6 miesiącach od zastosowania leczenia 34

WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Stężenia IFN-γ w surowicy u pacjentów z kiłą w zależności od polimorfizmów genu IFN-γ 25

Rycina 2. Podstawowe subpopulacje limfocytów u pacjentów ze surowiczoopornością oraz u pacjentów z adekwatną odpowiedzią serologiczną 35

Rycina 3. Wykresy typu waterfall przedstawiające zmiany stężenia przeciwciał antykardiolipinowych (aCL) po leczeniu kiły wczesnej 38

1. WSTĘP

Kiła jest bakteryjną chorobą zakaźną wywołaną przez krętka bladego (*Treponema pallidum*) i przenoszoną głównie poprzez kontakty seksualne [1,2]. Zakażenie to charakteryzuje się złożonym przebiegiem klinicznym oraz zdolnością patogenu do długotrwałego przetrwania w organizmie gospodarza, co czyni je jednym z najbardziej intrygujących problemów współczesnej medycyny zakaźnej [3]. Począwszy od 2010 roku, zarówno w Polsce, jak i na świecie obserwuje się systematyczny wzrost liczby zachorowań na kiłę, co wskazuje na ponowną intensyfikację transmisji zakażenia w populacji [4,5]. WHO szacuje, iż w 2022 roku na całym świecie na kiłę zachorowało 8 milionów dorosłych w wieku od 15 do 49 lat, przy czym największy wzrost zachorowań obserwuje się w krajach rozwiniętych, w tym w Europie i Ameryce Północnej [2,4-6].

Zakażenie *T. pallidum* podejrzewa się na podstawie wywiadu i objawów klinicznych, a potwierdza się je poprzez stwierdzenie dodatnich wyników badań serologicznych krwi (przynajmniej jednego odczynu niekrętkowego - np. RPR lub VDRL i przynajmniej jednego odczynu krętkowego - np. TPHA). Diagnostyka serologiczna stanowi podstawę rozpoznania kiły, ponieważ jak dotychczas nie opracowano laboratoryjnych metod hodowli tego patogenu, które mogłyby zostać wykorzystane w powszechnej diagnostyce [7].

Do tej pory nie stwierdzono oporności krętków bladych na penicylinę, przez co podanie długodziałającej penicyliny benzatynowej G w dawce 2,4 mln j.m. (jednorazowo i.m.) pozostaje leczeniem pierwszego wyboru we wszystkich stadiach kiły wczesnej [8,9]. Odpowiedź na leczenie kiły uznaje się za prawidłową, gdy można zaobserwować ustąpienie objawów klinicznych zakażenia oraz co najmniej 4-krotne obniżenie się miana odczynu niekrętkowego w 6. miesiącu od zakończenia leczenia [9,10].

Pomimo wysokiej skuteczności terapii, według aktualnej literatury u około 15–20% prawidłowo leczonych pacjentów dochodzi do rozwoju surowiczooporności (ang. serofast syphilis), czyli sytuacji, w której mimo ustąpienia objawów klinicznych

zakażenia, miano odczynu niekrętkowego nie ulega oczekiwanemu obniżeniu [10-12]. Zjawisko to, obserwowane jest w niektórych badaniach nawet u 20–30% pacjentów, szczególnie w określonych grupach klinicznych [13-15]. Surowiczooporność po leczeniu kiły jest jednym z najsłabiej poznanych zagadnień współczesnej syfilidologii i dotychczas nie sformułowano jednoznacznych standardów postępowania diagnostycznego i leczniczego.

Za surowiczooporność wydają się być odpowiedzialne zjawiska immunologiczne pojawiające się już w początkowym okresie zakażenia i utrzymujące się nawet po zakończeniu jego leczenia. Jednak dotychczas jednoznacznie nie wyjaśniono, czy stwierdzana stała produkcja przeciwciał jest wyrazem przetrwania żywych bakterii w organizmie, czy raczej skutkiem dysregulacji układu immunologicznego i przewlekłej stymulacji antygenowej. W literaturze podkreśla się, że brak jednoznacznych dowodów na obecność żywych krętków u pacjentów z surowiczoopornością przemawia za istotną rolą mechanizmów immunologicznych w patogenezie tego zjawiska [16,17].

Z tego względu zjawisko surowiczooporności jest szczególnie niepokojące dla klinicystów, gdyż nie istnieje jednoznaczna odpowiedź na pytanie, czy pacjent z utrzymującą się reaktywnością serologiczną może zostać uznany za wyleczonego. Tym samym nie jest jasne, czy pacjent ten stanowi potencjalne źródło zakażenia dla swoich partnerów seksualnych oraz czy pozostaje w grupie ryzyka rozwoju późnych powikłań kiły, takich jak kiła ośrodkowego układu nerwowego czy kiła sercowo-naczyniowa. Niepewność ta prowadzi w praktyce klinicznej do niejednolitych decyzji terapeutycznych, obejmujących zarówno wielokrotne stosowanie antybiotykoterapii, jak i niewystarczające monitorowanie pacjentów.

Podczas zakażenia *T. pallidum* i rozsiewu bakterii dochodzi do indukcji odpowiedzi komórkowej, która odgrywa kluczową rolę w kontroli zakażenia [18]. Namnażające się bakterie powodują tworzenie nacieków zapalnych w tkankach, składających się z makrofagów, plazmocytów oraz limfocytów T i B [18,19]. Odpowiedź typu Th1, z dominującą rolą interferonu gamma (IFN-γ), stanowi

podstawowy mechanizm eliminacji patogenu. IFN-γ produkowany przez aktywowane limfocyty CD4+ oraz CD8+ zwiększa napływ i aktywność makrofagów, które poprzez fagocytozę i produkcję reaktywnych form tlenu uczestniczą w skutecznej eliminacji krętków bladych z tkanek [7]. W badaniach wykazano, że efektywna odpowiedź typu Th1 koreluje z ograniczeniem namnażania i rozsiewu bakterii, natomiast jej osłabienie może sprzyjać przetrwaniu patogenu oraz przejściu zakażenia w fazę utajoną [7,19,20]

W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się również na czynniki modulujące odpowiedź immunologiczną gospodarza w przebiegu zakażenia *Treponema pallidum*, które mogą wpływać zarówno na przebieg kliniczny choroby, jak i skuteczność leczenia. W tym zakresie w literaturze wskazuje się na zmienność osobniczą w zakresie produkcji cytokin, w tym IFN-γ, TNF-α oraz IL-10, których różnice w stężeniach w organizmie w odpowiedzi na zakażenie mogą wpływać na przebieg infekcji, jej dynamikę oraz odpowiedź na leczenie [21-24]. Zmienność ta może prowadzić do różnic w efektywności odpowiedzi komórkowej, a tym samym do zróżnicowanej zdolności eliminacji patogenu pomiędzy pacjentami.

Coraz więcej danych literaturowych wskazuje, że obserwowana zmienność osobnicza w zakresie odpowiedzi immunologicznej na zakażenie może mieć podłoże genetyczne, związane m.in. z występowaniem polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach kodujących cytokiny. Szczególne znaczenie przypisuje się polimorfizmom genu interferonu gamma (IFN-γ), takim jak +874 T/A (rs2430561) oraz +2109 A/G (rs1861494), które wpływają na poziom ekspresji IFN-γ i tym samym modulują efektywność odpowiedzi typu Th1 [25-28]. W badaniach dotyczących innych chorób zakaźnych, takich jak gruźlica czy wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, wykazano, że warianty genetyczne związane z niższą produkcją IFN-γ korelują ze zwiększoną podatnością na zakażenie, cięższym przebiegiem choroby oraz mniej efektywną eliminacją patogenu [25,28-30]. Analogiczne mechanizmy mogą odgrywać rolę w przebiegu zakażenia *Treponema pallidum*, gdzie skuteczność odpowiedzi komórkowej warunkuje eliminację bakterii. W świetle tych danych zasadne wydaje się założenie, że predyspozycja do rozwoju stanu surowiczooporności może być częściowo również uwarunkowana genetycznie.

Zaburzenia równowagi pomiędzy odpowiedzią komórkową a humoralną stanowią jeden z istotnych elementów patogenezy nieprawidłowej odpowiedzi na leczenie. Niewystarczająca aktywacja mechanizmów komórkowych, przy jednoczesnym utrzymywaniu się odpowiedzi humoralnej, może prowadzić do przedłużonej obecności przeciwciał w surowicy pomimo skutecznej antybiotykoterapii. Zjawisko to obserwowane jest w badaniach dotyczących kiły, w których wykazano utrzymywanie się reaktywności serologicznej u części pacjentów pomimo braku cech aktywnego zakażenia [13,14].

Jednocześnie należy podkreślić, że *Treponema pallidum* wykazuje zdolność do długotrwałej modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz liczne mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej, w tym niską immunogenność antygenów powierzchniowych, zdolność do zmienności antygenowej (np. białko TprK) czy ograniczoną ekspresję struktur rozpoznawanych przez receptory wrodzonej odporności [7,31]. Te cechy *T. pallidum* również mogą sprzyjać utrzymywaniu się bakterii w organizmie oraz modyfikować charakter odpowiedzi immunologicznej [3,7,31]. W konsekwencji odpowiedź immunologiczna może mieć charakter nie w pełni efektywny, co sprzyja utrzymywaniu się przewlekłej stymulacji antygenowej.

W świetle powyższych danych podejrzewa się, że stan surowiczooporności nie jest zjawiskiem jednorodnym, lecz wynikiem złożonej interakcji pomiędzy właściwościami patogenu a odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Zarówno niewystarczająca eliminacja antygenu, jak i utrzymująca się aktywacja układu odpornościowego mogą prowadzić do przedłużonej obecności przeciwciał w surowicy pomimo skutecznego leczenia. Lepsze zrozumienie tych mechanizmów ma kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia patogenezy surowiczooporności oraz opracowania bardziej precyzyjnych strategii diagnostycznych i terapeutycznych w leczeniu kiły.

2. CELE PRACY

2.1. Cel główny

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była kompleksowa ocena roli odpowiedzi immunologicznej gospodarza, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów komórkowych oraz uwarunkowań immunogenetycznych, w patogenezie zjawiska surowiczooporności (ang. serofast syphilis) u pacjentów z kiłą wczesną po zastosowaniu rekomendowanego leczenia penicyliną benzatynową.

2.2. Cele szczegółowe

I. Ocena częstości występowania zjawiska surowiczooporności (stanu serofast) u pacjentów z kiłą wczesną po zastosowaniu standardowego leczenia penicyliną benzatynową oraz analiza jego dynamiki w okresie obserwacji.

II. Określenie różnic w zakresie odpowiedzi immunologicznej pomiędzy pacjentami, u których uzyskano prawidłową odpowiedź serologiczną, a pacjentami, u których rozwinął się stan surowiczooporności, ze szczególnym uwzględnieniem: liczebności subpopulacji limfocytów (limfocytów T, w tym CD4+ i CD8+, limfocytów B oraz komórek NK) oraz stężeń IFN-γ.

III. Ocena zmian w parametrach odpowiedzi immunologicznej w czasie (przed leczeniem oraz 6 miesięcy po jego zakończeniu) oraz określenie ich związku z uzyskaną odpowiedzią serologiczną.

IV. Określenie związku pomiędzy występowaniem stanu surowiczooporności a polimorfizmami genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, w szczególności polimorfizmami genu interferonu gamma (IFN-γ) (+874 T/A oraz +2109 A/G).

V. Charakterystyka zmian w zakresie odpowiedzi humoralnej u pacjentów z kiłą wczesną, ze szczególnym uwzględnieniem obecności i dynamiki przeciwciał antykardiolipinowych oraz ich potencjalnego związku z odpowiedzią na leczenie.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Charakterystyka badań i populacja badana

Rozprawa doktorska opiera się na dwóch prospektywnych badaniach obserwacyjnych przeprowadzonych w Oddziale Klinicznym Dermatologii w Zabrzu, Katedry Chorób Wewnętrznych, Dermatologii i Alergologii, Wydziału Nauk Medycznych w Zabrzu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, w latach 2022–2025. Do badań włączano dorosłych pacjentów z nowo rozpoznaną kiłą wczesną, spełniających kryteria włączenia i niespełniających kryteriów wyłączenia, którzy byli diagnozowani oraz leczeni w niniejszym ośrodku.

Do udziału w badaniach po uzyskaniu świadomej, pisemnej zgody (poprzedzonej udzieleniem dokładnej informacji na temat prowadzonych badań) kwalifikowano pacjentów w wieku ≥ 18 lat, z pierwszym w życiu rozpoznaniem kiły wczesnej (obejmującej kiłę II okresu oraz kiłę utajoną wczesną), potwierdzonym na podstawie obrazu klinicznego, wywiadu oraz dodatnich wyników badań serologicznych. Rozpoznanie kiły opierano na jednoczesnej reaktywności co najmniej jednego odczynu niekrętkowego (RPR lub VDRL) oraz odczynu krętkowego (TPHA), zgodnie z obowiązującymi standardami diagnostycznymi i wytycznymi CDC [9].
Kiłę utajoną wczesną rozpoznawano u pacjentów z dodatnimi odczynami krętkowymi i niekrętkowymi, bez klinicznych objawów zakażenia, przy współistnieniu przesłanek wskazujących na nabycie infekcji w ciągu poprzednich 12 miesięcy, takich jak: udokumentowana serokonwersja, co najmniej czterokrotny wzrost miana odczynu niekrętkowego, przebycie objawów odpowiadających kile pierwotnej lub wtórnej albo wywiad niedawnego narażenia seksualnego wysokiego ryzyka.
Kryteria wykluczenia obejmowały: kiedykolwiek wcześniej rozpoznana kiła, wcześniejsze stosowanie leczenia przeciwdrobnoustrojowego lub immunosupresyjnego w okresie 6 miesięcy poprzedzających włączenie do badania, zakażenie HIV, obecność przewlekłych chorób zapalnych lub autoimmunologicznych, stosowanie

leków przeciwzakrzepowych lub przeciwpłytkowych w okresie co najmniej 6 tygodni przed rozpoczęciem obserwacji.

Wszyscy pacjenci otrzymywali standardowe leczenie kiły wczesnej w postaci pojedynczej dawki 2,4 mln j.m. penicyliny benzatynowej G podanej domięśniowo, zgodnie z aktualnymi rekomendacjami [8,9,32]. Leczenie było podawane pod nadzorem personelu medycznego, co zapewniało pełną zgodność z protokołem terapeutycznym.

W badaniu dotyczącym polimorfizmów genu IFN-γ włączono grupę kontrolną złożoną z 50 zdrowych ochotników, dobranych do grupy pacjentów pod względem wieku i płci (w przybliżeniu w stosunku 1:2) oraz rekrutowanych na podstawie zaproszeń skierowanych do personelu szpitala. W badaniu dotyczącym subpopulacji limfocytów i przeciwciał antykardiolipinowych uwzględniono dodatkowo 12 zdrowych ochotników jako grupę odniesienia dla oznaczeń przeciwciał antyfosfolipidowych.

Wszystkie osoby włączone do grup kontrolnych nie miały w wywiadzie zakażenia *Treponema pallidum*, innych chorób przenoszonych drogą płciową, przewlekłych chorób zapalnych ani autoimmunologicznych. U wszystkich uczestników przeprowadzono ustrukturyzowany wywiad medyczny w celu weryfikacji kryteriów kwalifikacji do badania. Rekrutacja odbywała się w jednym ośrodku klinicznym w Polsce, a badana populacja była stosunkowo jednorodna pod względem etnicznym i obejmowała głównie osoby pochodzenia środkowo- lub wschodnioeuropejskiego.

3.2. Ocena odpowiedzi serologicznej i definicja stanu surowiczooporności

Oceny odpowiedzi na leczenie dokonywano po 6 miesiącach od zakończenia terapii, na podstawie zmian miana odczynów niekrętkowych względem wartości wyjściowych. Pacjentów kwalifikowano do jednej z dwóch grup: (I) grupy z prawidłową odpowiedzią serologiczną, definiowaną jako co najmniej czterokrotny spadek miana odczynu niekrętkowego w stosunku do wartości wyjściowej; (II) grupy ze stanem surowiczooporności (serofast syphilis), definiowanym jako brak co najmniej czterokrotnego spadku miana odczynu niekrętkowego po 6 miesiącach od zakończenia leczenia.

Przyjęta definicja surowiczooporności była zgodna z kryteriami opublikowanymi przez Seña i wsp. [10] oraz stosowanymi w aktualnych badaniach klinicznych dotyczących odpowiedzi serologicznej po leczeniu kiły.

W badaniu oceniającym subpopulacje limfocytów krwi obwodowej oraz obecność przeciwciał antykardiolipinowych u pacjentów z kiłą wczesną obserwację kliniczną i serologiczną kontynuowano do 12 miesięcy po leczeniu. U pacjentów zakwalifikowanych do grupy serofast w dalszym okresie obserwacji utrzymywały się stabilne miana odczynów niekrętkowych, bez cech serologicznego nawrotu zakażenia.

3.3. Pobieranie materiału biologicznego

Materiał do badań pobierano z krwi żylnej obwodowej. W badaniu dotyczącym polimorfizmów genu IFN-γ oraz stężenia IFN-γ próbki pobierano w momencie rozpoznania zakażenia, przed rozpoczęciem leczenia. W badaniu oceniającym subpopulacje limfocytów oraz obecność przeciwciał antykardiolipinowych materiał pobierano dwukrotnie: przed leczeniem oraz po 6 miesiącach od zakończenia terapii.

Krew przeznaczoną do analiz serologicznych i immunologicznych pobierano do probówek zawierających odpowiedni antykoagulant. Próbki osocza przygotowywano zgodnie z przyjętym protokołem laboratoryjnym, a w razie braku możliwości natychmiastowej analizy przechowywano w temperaturze –80°C do czasu wykonania oznaczeń.

3.4. Oznaczenia immunologiczne i genetyczne

3.4.1. Oznaczenie stężenia interferonu gamma (IFN-γ)

Stężenie IFN-γ w surowicy krwi oznaczano u pacjentów przed rozpoczęciem leczenia, w aktywnym okresie zakażenia. Oznaczenia wykonywano metodą immunoenzymatyczną ELISA z zastosowaniem wysokoczułego zestawu komercyjnego

(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), zgodnie z instrukcją producenta. Wszystkie oznaczenia wykonywano w duplikatach.

3.4.2. Analiza polimorfizmów genu IFN-γ

DNA genomowe izolowano z krwi pełnej przy użyciu zestawu GenElute Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), zgodnie z protokołem producenta.

Analizie poddano dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w genie IFN-γ +874 T/A (rs2430561) oraz +2109 A/G (rs1861494).

Genotypowanie przeprowadzono metodą dyskryminacji allelicznej z użyciem testów TaqMan SNP Genotyping Assays (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) na platformie 7900HT Fast Real-Time PCR.

3.4.3. Oznaczenie przeciwciał antykardiolipinowych i przeciwciał przeciw β2-glikoproteinie I

Oznaczenia stężenia przeciwciał antyfosfolipidowych, obejmujących: przeciwciała antykardiolipinowe klasy IgG i IgM (aCL) i przeciwciała przeciw β2-glikoproteinie I (anti-β2GPI) wykonywano metodą ELISA z użyciem komercyjnych zestawów QUANTA Lite® (Inova Diagnostics/Diasorin). Wyniki wyrażano odpowiednio w jednostkach GPL, MPL oraz SGU/SMU. Za wynik dodatni uznawano wartości ≥ 40 GPL/MPL lub przekraczające 99. percentyl zgodnie z przyjętymi kryteriami międzynarodowymi.

Oznaczenia wykonywano przed leczeniem oraz po 6 miesiącach od jego zakończenia. W grupie kontrolnej przeprowadzano oznaczenia przeciwciał aCL IgG i IgM według tego samego protokołu laboratoryjnego.

3.4.4. Ocena subpopulacji limfocytów krwi obwodowej

Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej oznaczano w krwi pełnej pobranej na EDTA metodą wielokolorowej cytometrii przepływowej z wykorzystaniem aparatu FACSCanto II (BD Biosciences). Analizie poddano następujące populacje komórkowe: limfocyty T całkowite (CD3+), limfocyty T pomocnicze (CD3+CD4+), limfocyty T cytotoksyczne (CD3+CD8+), limfocyty T podwójnie dodatnie (CD3+CD4+CD8+), limfocyty B (CD19+), komórki NK (CD3−CD56+), komórki NKT (CD3+CD56+).
Bezwzględne liczby komórek uzyskiwano metodą dual-platform z równoczesnym uwzględnieniem wyników morfologii krwi obwodowej. Otrzymane dane analizowano przy użyciu dedykowanego oprogramowania FACSDiva.

3.5. Badania serologiczne

Niekrętkowe testy serologiczne wykonywano metodą: RPR (Rapid Plasma Reagin) i VDRL (Venereal Disease Research Laboratory). Miana odczynów oznaczano ilościowo poprzez seryjne rozcieńczenia dwukrotne. Badania krętkowe wykonywano z użyciem testu TPHA (Treponema pallidum hemagglutination assay), zgodnie z zaleceniami producenta. Do analizy kwalifikowano wyłącznie pacjentów z jednocześnie dodatnimi wynikami odczynów krętkowych i niekrętkowych.

3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programów: GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) i Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).
Zmienne ciągłe przedstawiano jako mediany oraz wartości minimalne i maksymalne lub mediany i rozstępy międzykwartylowe, zależnie od charakteru analizy. Zmienne jakościowe prezentowano jako liczby i odsetki.
W analizach porównawczych stosowano test U Manna–Whitneya dla zmiennych ciągłych, test χ^2 lub dokładny test Fishera dla zmiennych jakościowych,

testy nieparametryczne dla analiz porównujących wartości przed i po leczeniu, gdy było to zasadne.

W badaniu dotyczącym polimorfizmów dodatkowo oceniano zgodność częstości genotypów z równowagą Hardy'ego-Weinberga. Obliczano również ilorazy szans (OR) wraz z 95% przedziałami ufności (95% CI) dla oceny związku pomiędzy poszczególnymi wariantami genetycznymi a ryzykiem wystąpienia surowiczooporności. Za istotne statystycznie uznawano wartości $p < 0,05$.

3.7. Aspekty etyczne

Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Uczestnicy przed włączeniem do badania wyrażali dobrowolną, świadomą, pisemną zgodę na udział w projekcie.

Badanie dotyczące polimorfizmów genu IFN-γ, subpopulacji limfocytów i przeciwciał antykardiolipinowych uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (BNW/NWN/0052/KB1/13/I/24).

4. WYNIKI

4.1. Związek polimorfizmów genu IFN-γ ze stanem surowiczooporności

Do badania włączono 97 pacjentów w wieku od 18 do 57 lat z pierwszym epizodem kiły wczesnej. W analizowanej grupie 73,5% pacjentów spełniało kryteria kiły II okresu, natomiast u 26,5% rozpoznano jako kiłę utajoną wczesną. Po 6 miesiącach od zakończenia standardowego leczenia penicyliną benzatynową G 18 pacjentów (18,5%) nie uzyskało oczekiwanego co najmniej 4-krotnego spadku miana odczynu RPR w porównaniu z wartością wyjściową i zostało zakwalifikowanych do grupy ze stanem surowiczooporności. Pozostałych 79 pacjentów (81,5%) osiągnęło prawidłową odpowiedź serologiczną i utworzyło grupę pacjentów serologicznie wyleczonych. Charakterystykę kliniczną i demograficzną obu grup przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów włączonych do badania polimorfizmów genu IFN-γ.

Cecha pacjenta	Grupa serofast (n=18)	Grupa z prawidłową odpowiedzią serologiczną (n=79)	Wartość p
wiek, lata; (min–max)	26 (19–55)	22 (18–57)	0,514
mężczyźni; n (%)	16 (89)	73 (92)	0,597
wyjściowe miano RPR; (min–max)	32 (16–256)	64 (4–128)	0,422
kiła II okresu; n (%)	13 (72)	58 (73)	0,541
osutka plamista na tułowiu; n (%)	13 (72)	58 (73)	0,541
osutka grudkowa na dłoniach i stopach; n (%)	4 (22)	20 (25)	0,778
kiła utajona wczesna; n (%)	5 (28)	21 (26,5)	0,862
stężenie IFN-γ w surowicy przed leczeniem; pg/ml (min–max)	0,5 (0,1–2,1)	1,6 (0,1–4,3)	0,012

Dane przedstawiono jako medianę (min–max), o ile nie zaznaczono inaczej.

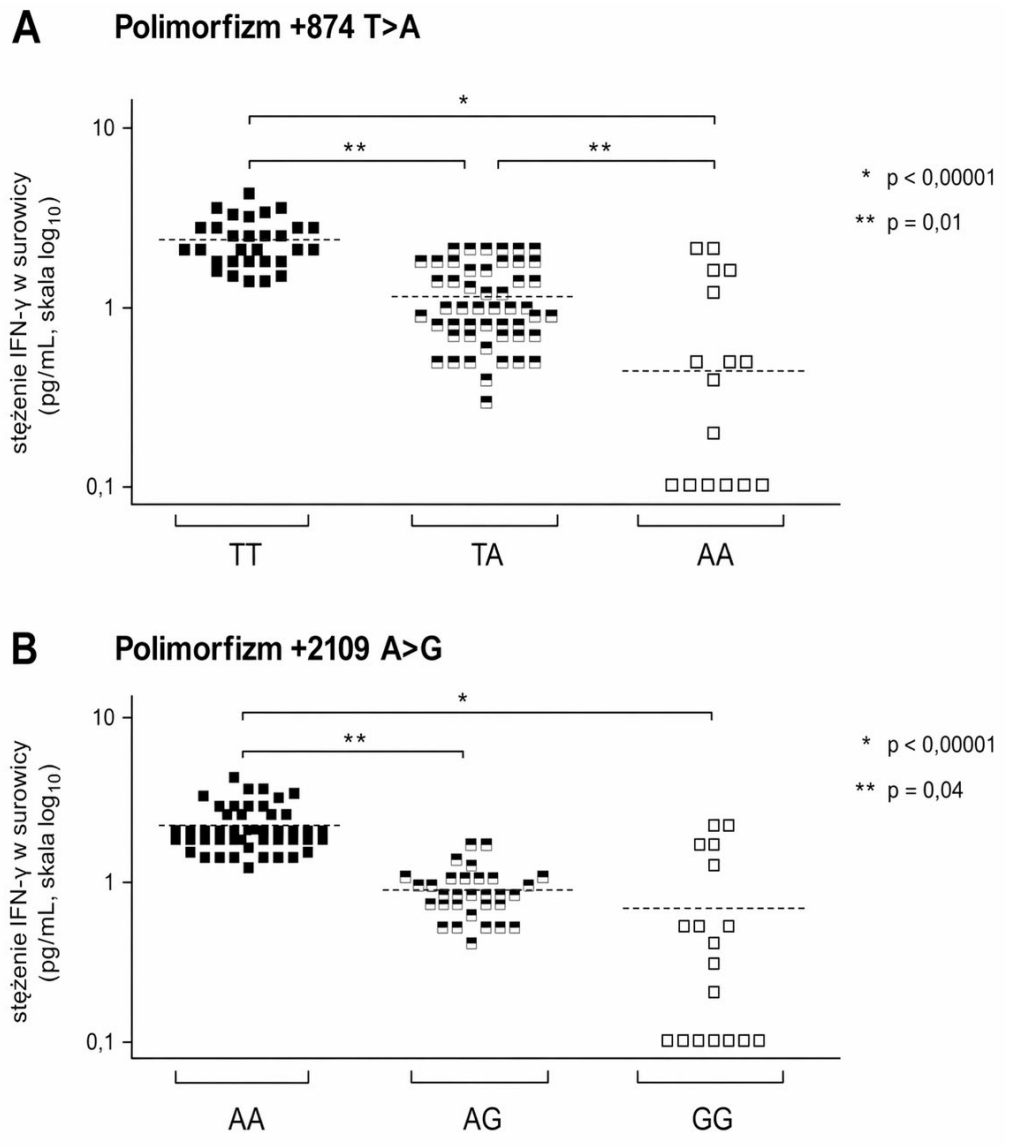
Porównanie obu grup nie wykazało istotnych statystycznie różnic w zakresie podstawowych parametrów klinicznych i demograficznych. Mediana wieku wynosiła 26 lat w grupie serofast oraz 22 lata w grupie z prawidłową odpowiedzią serologiczną (p = 0,5). W obu grupach dominowali mężczyźni - odpowiednio 89% i 92% (p = 0,6). Nie stwierdzono również różnic w wyjściowym mianie RPR, które wynosiło odpowiednio 32 (16–256) i 64 (4–128) (p = 0,4). Podobny był również rozkład postaci klinicznych zakażenia: kiłę II okresu rozpoznano u 72% pacjentów z grupy serofast i 73% pacjentów z grupy serologicznie wyleczonej, natomiast kiłę utajoną wczesną odpowiednio u 28% i 26,5% badanych. Częstość występowania poszczególnych objawów, takich jak osutka plamista na tułowiu czy zmiany grudkowe na dłoniach

i stopach, również nie różniła się istotnie pomiędzy grupami. Uzyskane dane wskazują więc, że sama odpowiedź serologiczna po leczeniu nie była zależna od podstawowych cech klinicznych pacjentów włączonych do badania.

Istotną różnicę stwierdzono natomiast w zakresie wyjściowego stężenia IFN-γ w surowicy krwi. Pacjenci, u których rozwinął się stan surowiczooporności, charakteryzowali się znamiennie niższym stężeniem tej cytokiny przed rozpoczęciem leczenia w porównaniu z pacjentami, którzy uzyskali prawidłową odpowiedź serologiczną. Mediana wyjściowego stężenia IFN-γ wynosiła 0,5 pg/ml (0,1–2,1) w grupie serofast oraz 1,6 pg/ml (0,1–4,3) w grupie serologicznie wyleczonej ($p = 0,01$). Warto podkreślić, że u wszystkich zdrowych osób z grupy kontrolnej stężenie IFN-γ pozostawało poniżej progu wykrywalności zastosowanego testu. Wynik ten wskazuje, że wyjściowa intensywność odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego może mieć istotne znaczenie dla późniejszej odpowiedzi serologicznej na leczenie.

W kolejnym etapie przeanalizowano częstość występowania dwóch polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genie IFN-γ: +874 T>A (rs2430561) oraz +2109 A>G (rs1861494). Częstości alleli mniejszych w całej badanej kohorcie wynosiły 0,45 zarówno dla allelu A w pozycji +874, jak i dla allelu G w pozycji +2109. Rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy'ego-Weinberga. W celu wykluczenia wpływu stratyfikacji populacyjnej porównano także częstości genotypów i haplotypów pomiędzy pacjentami z kiłą a zdrowymi osobami z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono w tym zakresie różnic istotnych statystycznie, co przemawia za porównywalnością obu grup pod względem genetycznym. Przykładowo, dla polimorfizmu +874 T>A genotyp TT występował u 30,9% pacjentów i 30,0% kontroli, genotyp TA u 52,6% i 50,0%, a genotyp AA u 16,5% i 20,0%. Analogicznie, dla polimorfizmu +2109 A>G rozkład genotypów również był zbliżony między pacjentami a kontrolami.

Następnie oceniono zależność pomiędzy genotypem a wyjściowym stężeniem IFN-γ w całej grupie chorych na kiłę. Stwierdzono, że osoby z genotypem AA dla polimorfizmu +874 T>A miały istotnie niższe stężenia IFN-γ przed leczeniem w porównaniu z nosicielami genotypów TA i TT. Podobnie pacjenci z genotypem GG dla polimorfizmu +2109 A>G charakteryzowali się niższym stężeniem IFN-γ niż osoby z genotypami AG i AA. Zależności te zilustrowano na Rycinie 1. Wyniki te potwierdzają, że badane warianty genetyczne są funkcjonalnie związane z osłabieniem odpowiedzi cytokinowej.



Rycina 1. Stężenia IFN-γ w surowicy u pacjentów z kiłą w zależności od polimorfizmów genu IFN-γ. Panel A - Polimorfizm +874 T>A; Panel B - polimorfizm +2109 A>G.

Najistotniejszą część analizy stanowiła ocena związku badanych polimorfizmów z ryzykiem rozwoju stanu surowiczooporności. Wykazano, że genotyp AA w pozycji +874 T>A, związany z niską produkcją IFN-γ, występował istotnie częściej u pacjentów ze stanem serofast niż u pacjentów z prawidłową odpowiedzią serologiczną: 44,4% vs 10,1% (OR = 7,1; 95% CI: 2,2–23,2; p = 0,0004). Analogicznie, genotyp GG w pozycji +2109 A>G obserwowano u 44,4% pacjentów serofast oraz u 12,7% pacjentów serologicznie wyleczonych (OR = 5,5; 95% CI: 1,8–17,3; p = 0,002). Również haplotyp +874A/+2109G, łączący oba warianty związane z niską produkcją IFN-γ, był istotnie częstszy w grupie serofast (77,8% vs 44,3%; OR = 4,4; 95% CI: 1,3–14,6; p = 0,01). Szczegółowe dane przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Częstość występowania polimorfizmów genu IFN-γ.

Genotyp/Haplotyp	Grupa serofast (n=18)	Grupa z prawidłową odpowiedzią serologiczną (n=79)	Wartość p	OR (95% CI)
+874 T>A genotyp TT; n (%)	2 (11,1)	28 (35,4)	0,042	0,2 (0,1–1,1)
+874 T>A genotyp TA; n (%)	8 (44,4)	43 (54,4)	0,414	0,7 (0,2–1,9)
+874 T>A genotyp AA; n (%)	8 (44,4)	8 (10,1)	< 0,001	7,1 (2,2–23,2)
+2109 A>G genotyp AA; n (%)	4 (22,2)	44 (55,7)	0,012	0,2 (0,1–0,8)
+2109 A>G genotyp AG; n (%)	6 (33,3)	25 (31,6)	0,894	1,1 (0,4–3,2)
+2109 A>G genotyp GG; n (%)	8 (44,4)	10 (12,7)	0,002	5,5 (1,8–17,3)
Haplotyp +874 T/ +2109A; n (%)	5 (27,8)	69 (87,3)	< 0,001	0,1 (0,02–0,2)
Haplotyp +874 A/ +2109G; n (%)	14 (77,8)	35 (44,3)	0,014	4,4 (1,3–14,6)

OR – iloraz szans (odds ratio); 95% CI – 95% przedział ufności, określający prawdopodobieństwo wystąpienia stanu serofast u pacjentów z danym genotypem/haplotypem w porównaniu z pozostałymi genotypami łącznie.

Z kolei genotypy związane z wyższą produkcją IFN-γ warunkowały prawidłową odpowiedź immunologiczną. Genotyp TT dla +874 T>A stwierdzano istotnie częściej u pacjentów z prawidłową odpowiedzią serologiczną niż u pacjentów ze stanem serofast (35,4% vs 11,1%; OR = 0,23; 95% CI: 0,05–0,82; p = 0,03). Podobnie genotyp AA dla +2109 A>G był częstszy w grupie serologicznie wyleczonej (55,7% vs 22,2%; OR = 0,23; 95% CI: 0,07–0,76; p = 0,01). Najsilniejszy efekt ochronny wykazywał haplotyp +874T/+2109A, którego obecność wiązała się z istotnie mniejszym ryzykiem rozwoju stanu serofast (OR = 0,06; 95% CI: 0,02–0,19; p < 0,0001).

W analizie uzupełniającej oceniono wyjściowe stężenia IFN-γ w zależności od genotypu i odpowiedzi na leczenie. We wszystkich analizowanych układach pacjenci, którzy uzyskali serologiczne wyleczenie, wykazywali tendencję do wyższych stężeń IFN-γ niż pacjenci z surowiczoopornością. Trend ten obserwowano zarówno dla poszczególnych genotypów obu polimorfizmów, jak i dla analizowanych haplotypów, chociaż nie wszystkie różnice osiągały poziom istotności statystycznej. Szczegółowe zestawienie tych danych zamieszczono w Tabeli 3.

Tabela 3. Stężenia IFN-γ przed leczeniem w zależności od genotypu i haplotypu.

Genotyp/Haplotyp	Grupa serofast (n=18)	Grupa z prawidłową odpowiedzią serologiczną (n=79)	Wartość p
IFN-γ +874 T>A (pg/mL) TT	1,9 (1,6–2,1)	2,3 (1,4–4,3)	0,313
IFN-γ +874 T>A (pg/mL) TA	1,2 (0,5–1,6)	1 (0,1–2,1)	0,931
IFN-γ +874 T>A (pg/mL) AA	0,1 (0,1–0,5)	1,4 (0,5–2,1)	0,061
IFN-γ +2109 A>G (pg/mL) AA	1,4 (0,5–2,1)	2,1 (1,4–4,3)	0,317
IFN-γ +2109 A>G (pg/mL) AG	1,3 (0,5–1,6)	0,8 (0,4–1,0)	0,846
IFN-γ +2109 A>G (pg/mL) GG	0,1 (0,1–0,5)	0,9 (0,1–2,1)	0,119
Haplotyp +874 T/+2109A	1 (0,5–2,1)	1,8 (0,5–4,3)	0,563
Haplotyp +874 A/+2109G	0,5 (0,1–1,6)	0,8 (0,1–2,1)	0,714

Dane przedstawiono jako medianę (min–max).

Podsumowując, wyniki pierwszego badania wykazały, że stan surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej wiąże się zarówno z niższym wyjściowym stężeniem IFN-γ, jak i z częstszym występowaniem określonych wariantów genetycznych genu IFN-γ związanych z obniżoną produkcją tej cytokiny. Wyniki te przemawiają za istotną rolą uwarunkowań immunogenetycznych w modulowaniu odpowiedzi serologicznej po leczeniu kiły.

4.2. Charakterystyka odpowiedzi komórkowej i humoralnej u pacjentów z surowiczoopornością

Do drugiego badania włączono 41 pacjentów z kiłą wczesną, spośród których 9 osób (22%) rozwinęło stan surowiczooporności, natomiast 32 osoby (78%) uzyskały prawidłową odpowiedź serologiczną. Dodatkowo zbadano 12 zdrowych ochotników, którzy stanowili grupę odniesienia dla oznaczeń przeciwciał antyfosfolipidowych. Wszyscy zdrowi ochotnicy mieli ujemne wyniki zarówno odczynów krętkowych, jak i niekrętkowych.

Analiza podstawowych cech demograficznych i klinicznych nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupą serofast a grupą pacjentów z prawidłową odpowiedzią serologiczną. Mediana wieku wynosiła 31,5 roku w grupie surowiczooporności oraz 34,0 lata w grupie z prawidłową odpowiedzią serologiczną ($p = 0,2$). Udział kobiet w obu grupach był zbliżony i wynosił odpowiednio 22,2% i 21,9% ($p = 1,0$). Kiłę II okresu rozpoznano odpowiednio u 66,7% i 62,5% pacjentów, natomiast kiłę utajoną wczesną u 33,3% i 37,5% badanych. Nie stwierdzono istotnych różnic w wyjściowym mianie VDRL, które wynosiło medianę 64 zarówno w grupie serofast, jak i w grupie z prawidłową odpowiedzią serologiczną. Uzyskane wyniki wskazują, że odpowiedź serologiczna nie była zależna od podstawowych cech klinicznych chorych.

Przed leczeniem obie grupy były również porównywalne pod względem większości rutynowych parametrów laboratoryjnych. Nie wykazano istotnych różnic w zakresie stężenia hemoglobiny, liczby erytrocytów, neutrofili, eozynofili, monocytów, płytek krwi ani w stężeniach CRP oraz składowych dopełniacza C3 i C4. Istotne różnice dotyczyły jedynie liczby limfocytów oraz bazofilów, które były niższe w grupie pacjentów serofast (odpowiednio $p = 0,04$ i $p = 0,04$). Wynik ten sugeruje, że już na etapie wyjściowym u części pacjentów występowały subtelne różnice immunologiczne mogące wpływać na późniejszą odpowiedź na leczenie.

Po 6 miesiącach od zakończenia terapii większość parametrów hematologicznych i biochemicznych nadal pozostawała porównywalna pomiędzy grupami. Nie obserwowano różnic w zakresie hemoglobiny, liczby erytrocytów, całkowitej liczby leukocytów, liczby limfocytów, neutrofili, płytek krwi, CRP ani stężeń C3 i C4. Istotnie wyższa w grupie serofast była natomiast liczba monocytów [0,75 $\times 10^3/\mu L$ (0,53–1,21) vs 0,52 $\times 10^3/\mu L$ (0,21–0,73); p = 0,007], a niższa liczba bazofilów [0,02 $\times 10^3/\mu L$ (0,01–0,03) vs 0,03 $\times 10^3/\mu L$ (0,01–0,06); p = 0,04]. Utrzymywanie się różnic w niektórych populacjach komórkowych po leczeniu może wskazywać na odmienny profil aktywacji układu odpornościowego w grupie surowiczooporności.

Dokładne wyniki cech demograficznych, klinicznych oraz parametrów laboratoryjnych podczas włączenia pacjentów do badania i po 6 miesiącach od zastosowania leczenia przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna pacjentów, przy włączeniu do badania i po 6 miesiącach od zastosowania leczenia.

Parametr	Grupa serofast (n=9)	Grupa z prawidłową odpowiedzią serologiczną (n=32)	Wartość p
Kobiety; n (%)	2 (22,2)	7 (21,9)	0,971
Wiek; lata	31,5 (28,0–45,0)	34,0 (22,0–69,0)	0,214
Kiła wtórna; n (%)	6 (66,7)	20 (62,5)	0,913
Kiła wczesna utajona; n (%)	3 (33,3)	12 (37,5)	0,871
Wyjściowe VDRL	64 (8–128)	64 (2–256)	0,437
Hb przed leczeniem; g/dL	14,1 (12,7–16,7)	14,7 (11,6–17,9)	0,971
Erytrocyty; $\times 10^6/\mu L$	5,08 (4,4–5,4)	5,04 (3,8–5,6)	0,979
Leukocyty; $\times 10^3/\mu L$	6,7 (4,2–10,7)	7,0 (3,8–9,0)	0,744
Limfocyty; $\times 10^3/\mu L$	1,3 (0,6–1,8)	1,6 (0,9–2,8)	0,042
Neutrofile; $\times 10^3/\mu L$	5,1 (2,1–8,1)	4,5 (2,1–6,8)	0,783
Eozynofile; $\times 10^3/\mu L$	0,08 (0,01–0,2)	0,09 (0,03–0,5)	0,674
Monocyty; $\times 10^3/\mu L$	0,5 (0,3–1,1)	0,56 (0,2–0,9)	0,891
Bazofile; $\times 10^3/\mu L$	0,02 (0,01–0,03)	0,03 (0,01–0,06)	0,044
Płytki; $\times 10^3/\mu L$	260,5 (207,0–340,0)	259,0 (149,0–460,0)	0,773
CRP; mg/dL	2,5 (1,3–33,0)	6,2 (0,00–23,4)	0,581
C3; mg/dL	1,3 (1,1–1,5)	1,3 (0,9–1,6)	0,849
C4; mg/dL	0,2 (0,1–0,35)	0,2 (0,1–0,5)	0,792
VDRL po leczeniu	64 (8–128)	4,00 (0,00–16,00)	< 0,001
Hb po leczeniu; g/dL	14,7 (12,9–17,2)	15,3 (13,0–17,5)	0,851
Erytrocyty po leczeniu; $\times 10^6/\mu L$	5,07 (4,5–5,7)	5,02 (4,1–5,8)	0,789
Leukocyty po leczeniu; $\times 10^3/\mu L$	7,2 (4,1–11,0)	6,2 (3,5–8,5)	0,134
Limfocyty po leczeniu; $\times 10^3/\mu L$	1,95 (1,6–2,2)	1,9 (1,2–3,1)	0,824
Neutrofile po leczeniu; $\times 10^3/\mu L$	4,3 (1,7–7,9)	3,5 (1,9–5,7)	0,219

Eozynofile po leczeniu; ×10³/μL	0,17 (0,12–0,27)	0,1 (0,03–0,4)	0,051
Monocyty po leczeniu; ×10³/μL	0,75 (0,53–1,21)	0,52 (0,21–0,73)	0,007
Bazofile po leczeniu; ×10³/μL	0,02 (0,01–0,03)	0,03 (0,01–0,06)	0,043
Płytki po leczeniu; ×10³/μL	267,0 (210,0–323,0)	248,0 (137,0–350,0)	0,562
CRP po leczeniu; mg/dL	1,95 (0,00–3,5)	0,98 (0,00–22,6)	0,975
C3 po leczeniu; mg/dL	1,1 (0,96–1,4)	1,2 (0,92–1,42)	0,952
C4 po leczeniu; mg/dL	0,28 (0,14–0,29)	0,2 (0,09–0,4)	0,274

Dane przedstawiono jako medianę (min–max), o ile nie zaznaczono inaczej.

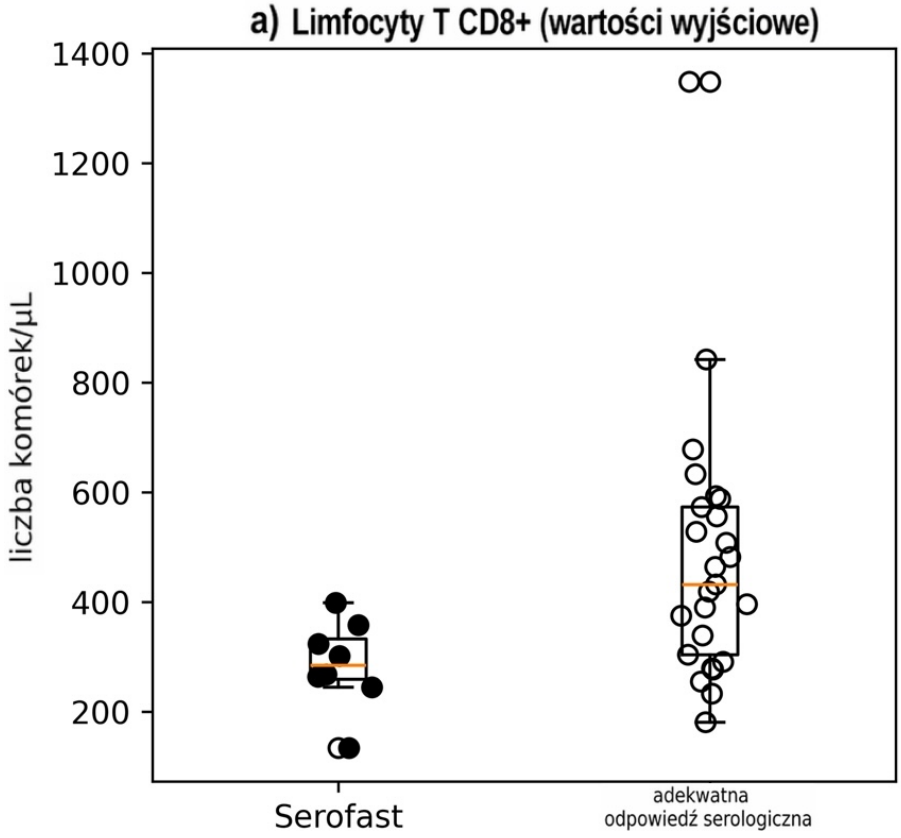
Najważniejszą część badania stanowiła analiza subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. Już w punkcie wyjściowym pacjenci, u których później rozwinęła się surowiczooporność, charakteryzowali się wyraźnie odmiennym profilem odpowiedzi komórkowej. W grupie serofast stwierdzono znamiennie niższą liczbę limfocytów T całkowitych CD3+ [876,0/μL (435,0–1079,0) vs 1180,0/μL (665,0–2137,0); p = 0,00009], limfocytów T pomocniczych CD4+ [430,5/μL (213,0–726,0) vs 612,0/μL (289,0–1173,0); p = 0,02] oraz limfocytów T cytotoksycznych CD8+ [285,0/μL (134,0–399,0) vs 432,0/μL (181,0–1348,0); p = 0,01]. Obniżona była również liczba komórek podwójnie dodatnich CD4+CD8+ [0,40/μL (0,30–0,50) vs 0,50/μL (0,20–1,30); p = 0,04]. Jednocześnie pacjenci z grupy serofast mieli istotnie wyższą liczbę limfocytów B [356,0/μL (246,0–606,0) vs 215,0/μL (72,0–582,0); p = 0,002]. Nie stwierdzono natomiast różnic w stosunku CD4/CD8 oraz liczbie komórek NK, a dla komórek NKT obserwowano jedynie trend do wyższych wartości w grupie serofast (p = 0,08). Szczegółowe dane przedstawiono w Tabeli 5, a kluczowe różnice wizualizuje Rycina 2.

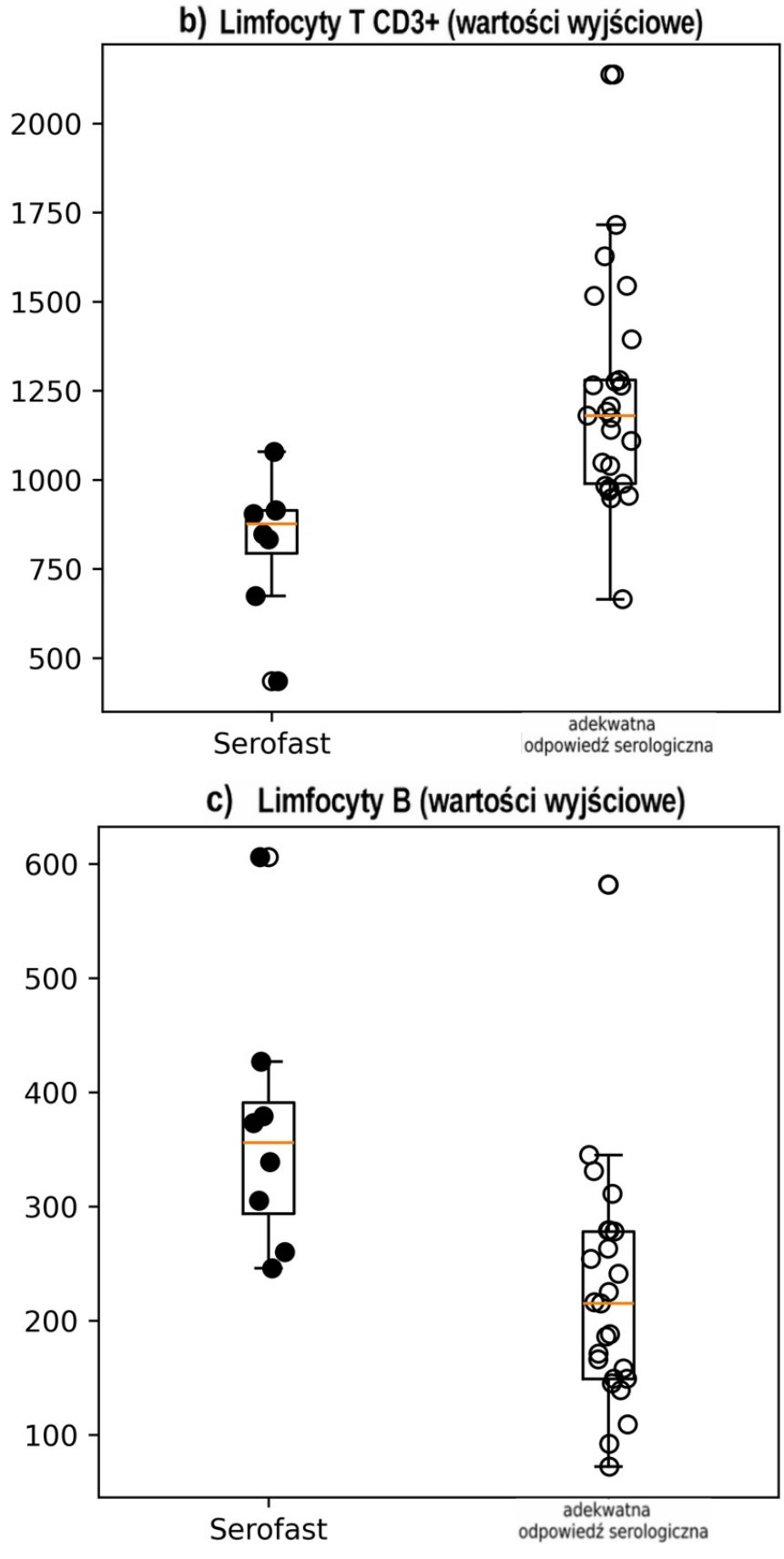
Tabela 5. Wyniki parametrów immunologicznych oznaczanych u pacjentów, przy włączeniu do badania i po 6 miesiącach od zastosowania leczenia.

Parametr	Grupa serofast (n=9)	Grupa z prawidłową odpowiedzią serologiczną (n=32)	Wartość p
Wiek; lata	31,5 (28,0–45,0)	34,0 (22,0–69,0)	0,213
CD3+ limfocyty T przed leczeniem (/µL)	876,0 (435,0–1079,0)	1180,0 (665,0–2137,0)	< 0,001
CD4+ limfocyty T przed leczeniem (/µL)	430,5 (213,0–726,0)	612,0 (289,0–1173,0)	0,022
CD8+ limfocyty T przed leczeniem (/µL)	285,0 (134,0–399,0)	432,0 (181,0–1348,0)	0,014
CD4+CD8+ limfocyty T przed leczeniem (/µL)	0,40 (0,30–0,50)	0,50 (0,20–1,30)	0,039
Stosunek CD4/CD8 przed leczeniem	1,75 (0,50–2,80)	1,40 (0,20–4,10)	0,892
Komórki NK przed leczeniem (/µL)	158,0 (51,0–592,0)	173,5 (83,0–465,0)	0,613
Komórki NKT przed leczeniem (/µL)	5,9 (2,8–16,0)	3,55 (0,9–14,5)	0,084
Limfocyty B przed leczeniem (/µL)	356,0 (246,0–606,0)	215,0 (72,0–582,0)	0,002
aCL IgM przed leczeniem (U/mL)	22,86 (0,00–67,51)	10,19 (0,00–120,00)	0,951
aCL IgG przed leczeniem (U/mL)	17,48 (0,00–61,66)	11,46 (0,00–120,00)	0,916
anti-β2GPI przed leczeniem (U/mL)	2,61 (2–4,2)	2,58 (2–3,8)	0,889
CD3+ limfocyty T po leczeniu (/µL)	1143,0 (984,0–1594,0)	1296,0 (826,0–3066,0)	0,491
CD4+ limfocyty T po leczeniu (/µL)	582,0 (465,0–1081,0)	680,0 (395,0–1924,0)	0,614
CD8+ limfocyty T po leczeniu (/µL)	347,0 (290,0–582,0)	432,0 (215,0–1554,0)	0,487
CD4+CD8+ limfocyty T po leczeniu (/µL)	0,4 (0,2–0,4)	0,4 (0,4–0,7)	0,023
Stosunek CD4/CD8 po leczeniu	1,6 (1,0–2,8)	1,5 (0,4–4,0)	0,536

Komórki NK po leczeniu (/µL)	403,0 (175,0–745,0)	236,0 (139,0–630,0)	0,149
Komórki NKT po leczeniu (/µL)	4,8 (3,1–6,5)	2,7 (0,2–17,4)	0,117
Limfocyty B po leczeniu (/µL)	380,0 (197,0–497,0)	235,0 (118,0–584,0)	0,013
aCL IgM po leczeniu (U/mL)	0,00 (0,00–6,72)	0,00 (0,00–14,00)	0,976
aCL IgG po leczeniu (U/mL)	0,00 (0,00–6,16)	0,00 (0,00–5,37)	0,669
anti-β2GPI po leczeniu (U/mL)	2,78 (2–3,7)	2,58 (2–4,1)	0,834

Dane przedstawiono jako medianę (min–max), o ile nie zaznaczono inaczej.





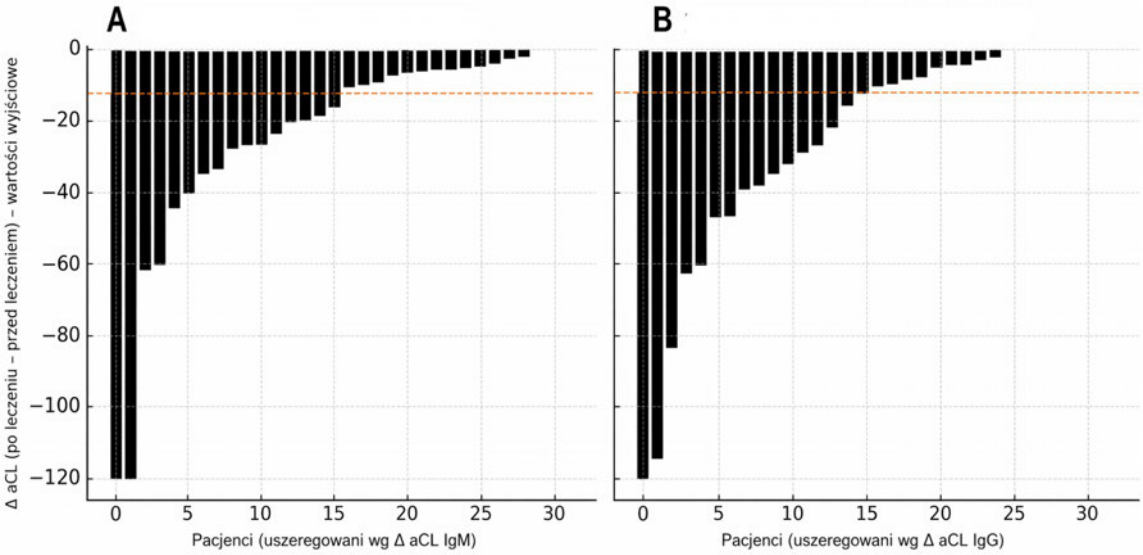
Rycina 2. Podstawowe subpopulacje limfocytów u pacjentów ze stanem serofast oraz u pacjentów z adekwatną odpowiedzią serologiczną.

Panel a) limfocyty T CD8+; Panel b) limfocyty T CD3+; Panel c) limfocyty B.

Po 6 miesiącach od zakończenia leczenia większość analizowanych subpopulacji limfocytów nie różniła się już istotnie pomiędzy grupami. Liczba komórek CD3+, CD4+ i CD8+ uległa częściowemu wyrównaniu, choć w grupie serofast wartości te nadal pozostawały liczbowo niższe. Istotne różnice utrzymywały się dla komórek CD4+CD8+, które nadal były niższe w grupie serofast [0,4/μL (0,2–0,4) vs 0,4/μL (0,4–0,7); p = 0,02], oraz dla limfocytów B, których liczba pozostawała istotnie wyższa u pacjentów serofast [380,0/μL (197,0–497,0) vs 235,0/μL (118,0–584,0); p = 0,01]. Wynik ten sugeruje utrzymywanie się aktywacji odpowiedzi humoralnej pomimo zakończonego leczenia i braku cech aktywnego zakażenia.

W dalszej części badania oceniono obecność przeciwciał antykardiolipinowych klasy IgM i IgG oraz przeciwciał przeciw β2-glikoproteinie I. Przed leczeniem niskie stężenia przeciwciał aCL IgM i IgG były wykrywalne u większości pacjentów w obu grupach, jednak mediany pozostawały poniżej progu dodatniości laboratoryjnej. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy pacjentami z surowiczoopornością a grupą z prawidłową odpowiedzią serologiczną w zakresie aCL IgM [22,86 U/mL (0,00–67,51) vs 10,19 U/mL (0,00–120,00); p = 0,95], aCL IgG [17,48 U/mL (0,00–61,66) vs 11,46 U/mL (0,00–120,00); p = 0,92] ani anti-β2GPI [2,61 U/mL (2,0–4,2) vs 2,58 U/mL (2,0–3,8); p = 0,89]. Jednocześnie wszystkie osoby z grupy kontrolnej miały niewykrywalne stężenia przeciwciał antykardiolipinowych, co wskazuje na infekcyjny charakter tych przeciwciał u pacjentów z kiłą.

Po leczeniu stężenia aCL IgM i aCL IgG uległy wyraźnemu obniżeniu i stały się niewykrywalne niemal u wszystkich pacjentów, niezależnie od uzyskanej odpowiedzi serologicznej. Nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami dla aCL IgM (p = 0,98), aCL IgG (p = 0,67) ani przeciwciał anti-β2GPI (p = 0,83). Zmiany te przedstawiono na Rycinie 3 w postaci wykresów waterfall, które obrazują jednokierunkowy, wyraźny spadek stężeń przeciwciał antykardiolipinowych po leczeniu. U niemal wszystkich pacjentów wartości Δ (posttreatment – baseline) były ujemne, a mediany zmian dla obu klas przeciwciał znajdowały się poniżej zera.



Rycina 3. Wykresy typu waterfall przedstawiające zmiany stężenia przeciwciał antykardiolipinowych (aCL) po leczeniu kiły wczesnej.

Panel A - wartości Δ aCL IgM (po leczeniu – przed leczeniem); Panel B wartości Δ aCL IgG (po leczeniu - przed leczeniem) przedstawiono dla każdego pacjenta, uporządkowane od największego do najmniejszego spadku.

Wyniki drugiego badania wskazują więc, że stan surowiczooporności wiąże się z odmiennym profilem immunologicznym, obejmującym upośledzenie odpowiedzi komórkowej już w punkcie wyjściowym oraz utrzymującą się aktywację odpowiedzi humoralnej po leczeniu. Jednocześnie nie uzyskano danych przemawiających za istotną rolą przeciwciał antykardiolipinowych i przeciwciał anty-β2GPI w utrzymywaniu się reaktywności serologicznej po leczeniu kiły.

5. DYSKUSJA

Stan surowiczooporności po adekwatnym leczeniu kiły wczesnej jest od dawna znanym, lecz nadal nierozwiązanym problemem klinicznym. Pomimo ustąpienia objawów klinicznych po prawidłowo przeprowadzonej terapii, u części pacjentów nie dochodzi do co najmniej 4-krotnego spadku miana odczynów niekrętkowych w oczekiwanym czasie 6–12 miesięcy, co rodzi niepewność, czy zjawisko to odzwierciedla przetrwałe zakażenie, czy raczej utrzymującą się aktywację odpowiedzi humoralnej [10,11]. W ostatnich latach podkreśla się, że mechanizmy leżące u podłoża stanu serofast pozostają niewystarczająco poznane i mogą różnić się pomiędzy poszczególnymi pacjentami [15,16]. Co istotne, przedłużane lub ponowne leczenie penicyliną nie prowadzi do poprawy odpowiedzi serologicznej u pacjentów z surowiczoopornością, co sugeruje, że utrzymująca się reaktywność odczynów niekrętkowych raczej nie odzwierciedla trwającej replikacji bakterii, lecz stan przedłużonej produkcji przeciwciał mimo eliminacji patogenu [10,33].

W przeprowadzonych badaniach własnych stan surowiczooporności stwierdzono u 18,5% pacjentów w badaniu dotyczącym polimorfizmów genu IFN-γ oraz u 22% pacjentów w badaniu oceniającym subpopulacje limfocytów i odpowiedź humoralną. Wyniki te pozostają zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których częstość występowania stanu serofast po leczeniu kiły wczesnej mieściła się w szerokim zakresie od 9,4% do 44,4%, co częściowo może wynikać z różnic w stadium zakażenia w chwili rozpoznania i leczenia (13-15,34). W piśmiennictwie wskazywano również, że kiła utajona wczesna może wiązać się z większym ryzykiem rozwoju stanu serofast w porównaniu z kiłą pierwotną lub kiłą II okresu [14]. W niniejszej rozprawie nie wykazano jednak istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie podstawowych cech demograficznych i klinicznych, takich jak wiek, płeć czy stadium zakażenia, co sugeruje, że o późniejszej odpowiedzi serologicznej mogą decydować przede wszystkim czynniki immunologiczne i immunogenetyczne.

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie *Treponema pallidum* od dawna uznawana jest za rozległą i złożoną, przy kluczowej roli odporności komórkowej.

We wczesnych stadiach choroby mechanizmy odpowiedzi komórkowej ułatwiają eliminację bakterii w miejscu wniknięcia, często prowadząc do samoistnego ustąpienia objawów miejscowych, a odpowiedź typu Th1 pozostaje szczególnie istotna dla kontroli zakażenia i ograniczenia jego progresji [35,36]. Z kolei upośledzenie odporności komórkowej może prowadzić do nieefektywnej eliminacji bakterii, utrzymywania się stanu zapalnego oraz rozwoju surowiczooporności po leczeniu [17,21]. Podkreśla się również rolę odpowiedzi regulatorowej, zwłaszcza IL-10, która może sprzyjać utrzymywaniu się tego stanu; utrzymujące się podwyższone stężenia IL-10 przed leczeniem i po jego zakończeniu wiązano z większym prawdopodobieństwem rozwoju surowiczooporności [17,37,38].

Na tym tle szczególnego znaczenia nabierają wyniki pierwszego z badań własnych, w którym wykazano, że pacjenci ze stanem serofast mieli istotnie niższe wyjściowe stężenia IFN-γ w surowicy w porównaniu z pacjentami, którzy uzyskali adekwatną odpowiedź serologiczną po leczeniu. Wynik ten pozostaje zgodny z immunopatologicznymi modelami podkreślającymi rolę IFN-γ w nasilaniu opsonofagocytozy *T. pallidum* przez makrofagi poprzez mechanizmy zależne od CD64 [39]. Jednocześnie wcześniejsze obserwacje wskazywały, że pacjenci wykazujący silniejszy profil prozapalny, charakteryzujący się wyższymi stężeniami IFN-γ, TNF-α i IL-6, mieli większe prawdopodobieństwo uzyskania serologicznego wyleczenia [17,21]. W tym kontekście niższe stężenie IFN-γ u pacjentów z serofast można interpretować jako wykładnik słabszej aktywacji odpowiedzi typu komórkowego w czasie aktywnego zakażenia.

Istotnym jest, iż stężenie IFN-γ oznaczano w momencie rozpoznania, a więc w aktywnej fazie zakażenia. Oznacza to, że obserwowane różnice prawdopodobnie odzwierciedlają zależną od genotypu zmienność produkcji IFN-γ i nasilenia aktywacji immunologicznej w odpowiedzi na zakażenie, a nie konstytutywną, spoczynkową ekspresję cytokiny. Rozróżnienie to ma istotne znaczenie dla interpretacji uzyskanych zależności immunogenetycznych.

Ponadto, zgodnie z najlepszą wiedzą, doktorant jako pierwszy wykazał istotny związek pomiędzy odpowiedzią serologiczną a polimorfizmami genu IFN-γ. Polimorfizm +874T/A zlokalizowany w pierwszym intronie oraz polimorfizm +2109A/G w trzecim intronie były wcześniej opisywane jako warianty wpływające na stężenie IFN-γ w surowicy i modulujące przebieg różnych chorób zakaźnych [28,30,40]. W badaniu własnym pacjenci z genotypem +874AA mieli znamiennie niższe stężenie IFN-γ w porównaniu z osobami z genotypami +874AT i +874TT, a sam genotyp AA występował istotnie częściej w grupie serofast niż w grupie z adekwatną odpowiedzią serologiczną. Odwrotnie, genotyp TT, związany z wyższą produkcją IFN-γ, był częstszy u pacjentów, którzy uzyskali prawidłową odpowiedź serologiczną. Podobnie dla polimorfizmu +2109A/G wykazano, że genotyp GG wiązał się z niższą produkcją IFN-γ i częściej występował w grupie serofast, podczas gdy genotyp AA częściej obserwowano u pacjentów serologicznie wyleczonych.

Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami pochodzącymi z innych chorób zakaźnych. W gruźlicy allel T polimorfizmu IFN-γ +874T/A wiązano z silniejszą odpowiedzią immunologiczną i łagodniejszym lub bardziej ograniczonym przebiegiem choroby, natomiast warianty związane z niższą produkcją IFN-γ korelowały ze zwiększoną podatnością na zakażenie [25,29]. W odniesieniu do rs1861494 wykazano, że osoby z genotypem GG wydzielają mniej IFN-γ w odpowiedzi na antygeny *Mycobacterium tuberculosis*, co może sprzyjać zwiększonej podatności na chorobę [26]. Wydaje się zatem zasadne przyjęcie, że również w kile polimorfizmy genu IFN-γ mogą modulować efektywność odpowiedzi komórkowej, wpływając na zdolność eliminacji antygenu i ostateczny wynik serologiczny po leczeniu.

Druga z prac własnych dostarczyła nowych danych wskazujących, że osoby, u których następnie rozwinęła się surowiczooporność, już w punkcie wyjściowym charakteryzowały się znamiennie niższą liczbą limfocytów T cytotoksycznych CD8+, a także niższą liczbą limfocytów CD3+ i CD4+ w porównaniu z pacjentami, którzy uzyskali serologiczne wyleczenie. Co istotne, zaburzenie to utrzymywało się częściowo również po 6 miesiącach od leczenia. Wyniki te wspierają hipotezę, że zdolność do wygenerowania adekwatnej odpowiedzi cytotoksycznej

już we wczesnym okresie zakażenia może wpływać na późniejszą ewolucję odpowiedzi serologicznej. Według najlepszej wiedzy doktoranta jest to pierwsze prospektywne badanie łączące ilościowe zaburzenia w zakresie limfocytów T cytotoksycznych z rozwojem surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej.

Z immunologicznego punktu widzenia limfocyty T cytotoksyczne stanowią podstawowe ramię odporności komórkowej i są kluczowe dla kontroli patogenów wewnątrzkomórkowych poprzez mechanizmy cytolityczne oraz wydzielanie cytokin, zwłaszcza IFN-γ i TNF-α, aktywujących makrofagi [41,42]. Choć *Treponema pallidum* jest zazwyczaj traktowany jako organizm zewnątrzkomórkowy, istnieją przesłanki sugerujące, że częściowe wewnątrzkomórkowe przebywanie antygenu, jego wychwyt przez profesjonalne komórki prezentujące antygen i cross-prezentacja w MHC klasy I mogą angażować także szlaki cytotoksyczne [41,42]. W tym kontekście mniejsza liczba lub gorsza dostępność limfocytów T cytotoksycznych mogłaby upośledzać skuteczną eliminację komórek prezentujących antygeny krętkowe, umożliwiając przedłużoną prezentację antygenu limfocytom B.

Ta interpretacja znajduje wsparcie w kolejnym wyniku badania własnego, a mianowicie w obserwacji wyższej liczby limfocytów B u pacjentów z surowiczoopornością, utrzymującej się także po 6 miesiącach od zakończenia terapii. Wynik ten wspiera hipotezę przedłużonej, zależnej od antygenu stymulacji odpowiedzi humoralnej. Biorąc pod uwagę, że penicylina skutecznie eliminuje żywe *T. pallidum*, utrzymujące się dodatnie odczyny niekrętkowe u pacjentów z surowiczoopornością są bardziej prawdopodobnie konsekwencją utrzymującej się aktywacji immunologicznej niż utajonego, aktywnego zakażenia. Jednym z możliwych wyjaśnień jest właśnie niepełna eliminacja komórek prezentujących antygeny krętkowe, co mogłoby podtrzymywać aktywację limfocytów B i produkcję przeciwciał mimo mikrobiologicznego wyleczenia. Chociaż interpretacja ta pozostaje hipotezą i nie była bezpośrednio testowana w niniejszej pracy, jest ona zgodna z obecnymi koncepcjami wiążącymi funkcję limfocytów T cytotoksycznych z regulacją prezentacji antygenu i wtórną aktywacją limfocytów B.

W tym sensie wyniki obu badań wzajemnie się uzupełniają. Pierwsze wskazuje na genetycznie uwarunkowaną skłonność do słabszej produkcji IFN-γ, a drugie ukazuje, że pacjenci z niekorzystnym wynikiem serologicznym wykazują ilościowy deficyt populacji limfocytów odpowiedzialnych za odpowiedź cytotoksyczną i jednoczesną utrzymującą się aktywację odpowiedzi humoralnej. Łącznie pozwala to zaproponować model, zgodnie z którym słabsza odpowiedź typu komórkowego, częściowo uwarunkowana genetycznie, może sprzyjać opóźnionej eliminacji antygenu i prowadzić do utrzymywania się stymulacji limfocytów B oraz produkcji przeciwciał niekrętkowych po skutecznym leczeniu. Model ten nie wyklucza współistnienia innych mechanizmów, ale stanowi biologicznie wiarygodne wyjaśnienie pozwalające pogodzić mikrobiologiczne wyleczenie z utrzymującą się reaktywnością serologiczną.

Dodatkowego wglądu w aktywację immunologiczną w kile dostarczyła ocena przeciwciał antyfosfolipidowych, zwłaszcza przeciwciał antykardiolipinowych. Przeciwciała aPL stanowią heterogenną grupę autoprzeciwciał skierowanych przeciw fosfolipidom lub białkom wiążącym fosfolipidy, a ich utrzymująca się obecność, zwłaszcza przeciw β2-glikoproteinie I, jest charakterystyczna dla zespołu antyfosfolipidowego. Jednocześnie zakażenia są dobrze udokumentowanym czynnikiem indukującym przejściowe odpowiedzi aPL, również w kile, wirusowych zapaleniach wątroby, HIV czy gruźlicy [43-46]. W kile przeciwciała te są zazwyczaj niezależne od β2GPI, wiążą „nagą" kardiolipinę i nie niosą istotnego ryzyka zakrzepowego typowego dla zespołu antyfosfolipidowego [47,48].

Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami, w badaniu własnym niskie stężenia aCL IgG i IgM wykrywano przed leczeniem u praktycznie wszystkich pacjentów, natomiast po 6 miesiącach od terapii przeciwciała te stawały się niewykrywalne niemal u wszystkich badanych. Wszystkie zdrowe osoby z grupy kontrolnej miały ujemne wyniki oznaczeń obu izotypów przeciwciał aCL. Obserwacja całkowitego zaniku aCL po leczeniu jest zgodna z ich infekcyjnym charakterem i przemawia przeciwko utrzymującej się autoimmunizacji jako mechanizmowi odpowiedzialnemu za wystąpienie surowiczooporności [47,49]. Wyniki te sugerują, że wykrywane

u pacjentów przeciwciała aCL były indukowane przez zakażenie i wygasały wraz z eliminacją antygenu bakteryjnego.

W szerszym ujęciu uzyskane dane wspierają zatem model, zgodnie z którym stan surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej jest przede wszystkim następstwem dysregulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza, a nie trwałej aktywności autoimmunologicznej czy utrzymującej się replikacji *T. pallidum*. Taki wniosek ma istotne znaczenie kliniczne. Jeżeli stan serofast rzeczywiście odzwierciedla przede wszystkim zaburzoną dynamikę wygaszania odpowiedzi immunologicznej, a nie aktywne zakażenie, wówczas rutynowe powtarzanie antybiotykoterapii wyłącznie na podstawie utrzymujących się mian odczynów niekrętkowych może być nieuzasadnione [10,33,34]. W takim ujęciu większą wartość mogłoby mieć identyfikowanie markerów immunologicznych i immunogenetycznych pozwalających rozpoznać pacjentów szczególnie narażonych na rozwój surowiczooporności.

Dalsze badania powinny zatem zmierzać do potwierdzenia uzyskanych obserwacji w większych kohortach oraz do uzupełnienia ich o funkcjonalną ocenę odpowiedzi immunologicznej. Szczególnie interesujące wydaje się badanie aktywności cytotoksycznej limfocytów T, dynamiki komórek pamięci B, fenotypu komórek prezentujących antygen oraz zjawisk takich jak wyczerpanie limfocytów T, starzenie immunologiczne czy aktywacja szlaków punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej. Takie podejście mogłoby pozwolić lepiej zrozumieć, czy kompetencja limfocytów T cytotoksycznych jest rzeczywistym determinantem wygaszania odpowiedzi serologicznej po leczeniu kiły.

Równocześnie należy uwzględnić ograniczenia przeprowadzonych badań. Najważniejszym z nich jest stosunkowo niewielka liczebność analizowanych kohort, co może ograniczać moc statystyczną i wymaga ostrożności przy uogólnianiu wyników na szersze populacje. Ponadto badana grupa była stosunkowo jednorodna etnicznie, co z jednej strony zmniejsza ryzyko błędu wynikającego ze stratyfikacji populacyjnej, z drugiej jednak ogranicza możliwość bezpośredniego przeniesienia uzyskanych obserwacji na inne populacje. Kolejnym ograniczeniem jest brak walidacji wyników

w niezależnej kohorcie, co byłoby istotnym krokiem w potwierdzeniu zaobserwowanych zależności immunologicznych i immunogenetycznych. W drugim z badań oceniano przede wszystkim liczebność subpopulacji limfocytów, a nie ich funkcję, co oznacza, że proponowane mechanizmy – zwłaszcza dotyczące roli limfocytów T cytotoksycznych – należy traktować jako biologicznie uzasadnione, jednak wymagające potwierdzenia w badaniach funkcjonalnych. Dodatkowo analiza opierała się na oznaczeniach wykonanych w wybranych punktach czasowych, bez szczegółowej oceny dynamiki odpowiedzi immunologicznej, co ogranicza możliwość pełnego uchwycenia jej zmian w czasie.

Istotnym ograniczeniem niniejszej pracy jest również brak oceny płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów ze stwierdzoną surowiczoopornością. Zgodnie z zaleceniami Centers for Disease Control and Prevention, u pacjentów z nieadekwatną odpowiedzią serologiczną po leczeniu kiły zalecana jest dalsza obserwacja kliniczna i serologiczna oraz ocena neurologiczna, natomiast badanie płynu mózgowo-rdzeniowego jest jednoznacznie wskazane przede wszystkim w przypadku obecności objawów neurologicznych, a w pozostałych sytuacjach może być rozważane, zwłaszcza gdy istnieje podejrzenie niepowodzenia leczenia lub brak możliwości zapewnienia odpowiedniej obserwacji pacjenta [9]. W niniejszej pracy stan surowiczooporności definiowano na podstawie oceny w 6. miesiącu od zakończenia leczenia, co z klinicznego punktu widzenia może stanowić relatywnie wczesny moment do podejmowania decyzji o pogłębionej diagnostyce, w tym wykonaniu nakłucia lędźwiowego. W przedstawionych badaniach odstąpiono od rutynowego wykonywania badania płynu mózgowo-rdzeniowego, co wynikało z braku objawów neurologicznych oraz możliwości zapewnienia systematycznej obserwacji klinicznej badanych pacjentów.

Należy również podkreślić, że dotychczas nie jest jednoznacznie ustalone, czy wszyscy pacjenci spełniający kryteria stanu serofast we wczesnym okresie obserwacji odnoszą korzyść z diagnostyki płynu mózgowo-rdzeniowego, co znajduje odzwierciedlenie w pewnych rozbieżnościach pomiędzy obowiązującymi rekomendacjami (m.in. Polskie Towarzystwo Dermatologiczne [32],

International Union against Sexually Transmitted Infections [8] oraz Centers for Disease Control and Prevention [9]). Jednocześnie celem niniejszej pracy było uchwycenie immunologicznej odpowiedzi gospodarza już w aktywnej fazie zakażenia, przed rozpoczęciem leczenia, co pozwoliło na identyfikację potencjalnych czynników predysponujących do rozwoju surowiczooporności.

Niemniej jednak brak oceny płynu mózgowo-rdzeniowego nie pozwala na całkowite wykluczenie bezobjawowego zajęcia ośrodkowego układu nerwowego u części pacjentów. Można przyjąć, że niewielki odsetek chorych zakwalifikowanych jako serofast mógł w rzeczywistości prezentować wczesne postacie neurosyfilis, co stanowi istotne ograniczenie interpretacyjne. Z drugiej strony próba analizy mechanizmów immunologicznych leżących u podłoża tak zdefiniowanego stanu surowiczooporności może pośrednio dostarczać informacji na temat czynników predysponujących do zajęcia ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu zakażenia *Treponema pallidum*.

Podsumowując, wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej dostarczają nowych danych wskazujących, że stan surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej wiąże się z osłabieniem odpowiedzi komórkowej, częściowo uwarunkowanym genetycznie, oraz z utrzymującą się aktywacją limfocytów B, przy jednoczesnym całkowitym zaniku indukowanych infekcją przeciwciał antykardiolipinowych po leczeniu. Wyniki te wspierają model, zgodnie z którym upośledzona eliminacja antygenu przez mechanizmy cytotoksyczne może prowadzić do przedłużonej stymulacji humoralnej mimo mikrobiologicznego wyleczenia. W tym sensie rozprawa wnosi nowe argumenty przemawiające za immunologicznym, a nie infekcyjnym rozumieniem surowiczooporności i stanowi podstawę do dalszych badań nad bardziej precyzyjnym podejściem diagnostycznym i monitorującym u pacjentów po leczeniu kiły.

6. WNIOSKI

I. Zjawisko surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej stanowi istotny i nadal nierozwiązany problem kliniczny oraz wyzwanie diagnostyczno-terapeutyczne. Pomimo skutecznej antybiotykoterapii u znacznego odsetka pacjentów nie dochodzi do uzyskania oczekiwanej odpowiedzi serologicznej, a brak jednoznacznych wytycznych dotyczących postępowania w tej grupie chorych podkreśla konieczność dalszych badań nad mechanizmami tego zjawiska oraz jego znaczeniem klinicznym.

II. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że stan surowiczooporności wydaje się być skutkiem dysregulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza (zakażonego), a nie przetrwałego zakażenia *Treponema pallidum*. Obserwacja utrzymywania się reaktywności serologicznej pomimo skutecznego leczenia wspiera koncepcję, że zjawisko to ma charakter immunologiczny, co ma istotne znaczenie dla interpretacji wyników badań serologicznych oraz podejmowania decyzji terapeutycznych.

III. Wykazano, że pacjenci ze stanem surowiczooporności charakteryzują się obniżoną liczebnością limfocytów T cytotoksycznych (CD8+) oraz obniżoną całkowitą liczbą limfocytów T (CD3+), zarówno przed leczeniem, jak i po jego zakończeniu .
Uzyskane wyniki wskazują, że deficyt odpowiedzi cytotoksycznej może prowadzić do nieefektywnej eliminacji komórek prezentujących antygen, a tym samym do przedłużonej stymulacji układu odpornościowego.

IV. Jednocześnie u pacjentów ze stanem serofast obserwuje się utrzymującą się aktywację odpowiedzi humoralnej, wyrażoną zwiększoną liczebnością limfocytów B po zakończeniu leczenia.
Zaburzenie równowagi pomiędzy odpowiedzią komórkową a humoralną stanowi prawdopodobny mechanizm utrzymywania się dodatnich wyników serologicznych pomimo eliminacji patogenu.

V. Wykazano związek pomiędzy polimorfizmami genu interferonu gamma (IFN-γ) (+874 T/A oraz +2109 A/G) a ryzykiem rozwoju stanu surowiczooporności. Genotypy związane z obniżoną produkcją IFN-γ predysponują do słabszej odpowiedzi typu komórkowego, co może skutkować niepełną eliminacją antygenu i sprzyjać utrzymywaniu się reaktywności serologicznej. Wyniki te wskazują na istotną rolę czynników immunogenetycznych w modulowaniu odpowiedzi na zakażenie krętkiem bladym i odpowiedź serologiczną na leczenie.

VI. Przeciwciała antykardiolipinowe obecne w przebiegu zakażenia *Treponema pallidum* mają charakter przejściowy i ulegają eliminacji po zakończeniu leczenia.
Brak ich utrzymywania się w okresie obserwacji wskazuje, że najpewniej nie odgrywają one istotnej roli w patogenezie stanu surowiczooporności, a ich obecność jest zjawiskiem wtórnym do infekcji, a nie przejawem trwałej autoimmunizacji.

VII. Stan surowiczooporności należy traktować jako zjawisko wieloczynnikowe, wynikające ze złożonej interakcji pomiędzy zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej a predyspozycją genetyczną gospodarza. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno deficyt odpowiedzi komórkowej, jak i uwarunkowania genetyczne wpływające na produkcję cytokin mogą odgrywać kluczową rolę w jego rozwoju.

VIII. Identyfikacja markerów immunologicznych oraz genetycznych związanych ze stanem surowiczooporności może w przyszłości umożliwić wyodrębnienie grupy pacjentów obarczonych zwiększonym ryzykiem jego rozwoju oraz stanowić podstawę do opracowania bardziej spersonalizowanych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Stamm LV. Syphilis: Re-emergence of an old foe. Microb Cell. 2016;3:363-370. doi:10.15698/mic2016.09.523
2. Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates 2016. Bull World Health Organ. 2019;97:548-562. doi:10.2471/BLT.18.228486.
3. Scurtu LG, Jinga V, Simionescu O. Fascinating molecular and immune escape mechanisms in the treatment of STIs (syphilis, gonorrhea, chlamydia, and herpes simplex). Int J Mol Sci. 2022;23:3550. doi:10.3390/ijms23073550.
4. World Health Organization. Sexually transmitted infections (STIs) [Internet]. 2023 [cited 2026 Mar 26]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)
5. World Health Organization. New report flags major increase in sexually transmitted infections, amidst challenges in HIV and hepatitis [Internet]. 2024 [cited 2026 Mar 26]. Available from: https://www.who.int/news/item/21-05-2024-new-report-flags-major-increase-in-sexually-transmitted-infections---amidst-challenges-in-hiv-and-hepatitis
6. Rosset F, Celoria V, Delmonte S, Mastorino L, Sciamarrelli N, Boskovic S, et al. The epidemiology of syphilis worldwide in the last decade. J Clin Med. 2025;14:5308. doi:10.3390/jcm14155308.
7. Radolf JD, Deka RK, Anand A, Šmajs D, Norgard MV, Yang XF. Treponema pallidum, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. Nat Rev Microbiol. 2016;14:744-759. doi:10.1038/nrmicro.2016.141.
8. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočnik M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021;35:574-588. doi:10.1111/jdv.16946.
9. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, et al. Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. MMWR Recomm Rep. 2021;70:1-187. doi:10.15585/mmwr.rr7004a1.

10.Seña AC, Zhang XH, Li T, Zheng HP, Yang B, Yang LG, et al. A systematic review of syphilis serological treatment outcomes in HIV-infected and HIV-uninfected persons. BMC Infect Dis. 2015;15:479. doi:10.1186/s12879-015-1209-0.

11.Seña AC, Wolff M, Martin DH, Behets F, Van Damme K, Leone P, et al. Predictors of serological cure and serofast state after treatment in HIV-negative persons with early syphilis. Clin Infect Dis. 2011;53:1092-1099. doi:10.1093/cid/cir671.

12.Zhang RL, Wang QQ, Zhang JP, Yang LJ. Molecular subtyping of Treponema pallidum and associated factors of serofast status in early syphilis patients. PLoS One. 2017;12:e0175477. doi:10.1371/journal.pone.0175477.

13.Tong ML, Lin LR, Liu GL, Zhang HL, Zeng YL, Zheng WH, et al. Factors associated with serological cure and the serofast state of HIV-negative patients with syphilis. PLoS One. 2013;8:e70102. doi:10.1371/journal.pone.0070102.

14.Li K, Wang C, Lu H, Gu X, Guan Z, Zhou P. Regulatory T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid of syphilis patients. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2528. doi:10.1371/journal.pntd.0002528.

15.Liu XK, Wang ZS, Li J. Predictors of serofast state after treatment of patients with syphilis. Chin Med J. 2020;133:2874-2876. doi:10.1097/CM9.0000000000001175.

16.Cao Q, Li Y, Hu Y, He B, Tang Y, Cao T, et al. Serofast status in syphilis: Pathogenesis to therapeutics. Clin Chim Acta. 2024;560:119754. doi:10.1016/j.cca.2024.119754.

17.Pastuszczak M, Kotnis-Gąska A, Jakubowicz B, Wojas-Pelc A. Treponema pallidum-specific immune responses and autoimmunity in patients who remain serofast. Postepy Dermatol Alergol. 2019;36:620-625. doi:10.5114/ada.2018.77497.

18.Salazar JC, Cruz AR, Pope CD, Valderrama L, Trujillo R, Saravia NG, et al. Treponema pallidum elicits innate and adaptive immune responses. J Infect Dis. 2007;195:879-887. doi:10.1086/511822.

19.Carlson JA, Dabiri G, Cribier B, Sell S. The immunopathobiology of syphilis. Am J Dermatopathol. 2011;33:433-460. doi:10.1097/DAD.0b013e3181e8b587.

20.Cruz AR, Ramirez LG, Zuluaga AV, Pillay A, Abreu C, Valencia CA, et al. Immune evasion and recognition of the syphilis spirochete. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1717. doi:10.1371/journal.pntd.0001717.

21.Pastuszczak M, Gozdzialska A, Jakiela B, Obtulowicz A, Jaskiewicz J, Wojas-Pelc A. Robust pro-inflammatory immune response is associated with serological cure. Sex Transm Infect. 2017;93:11-14. doi:10.1136/sextrans-2016-052681.

22.Pastuszczak M, Jakiela B, Wojas-Pelc A. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with serofast state. Sex Transm Infect. 2019;95:163-168. doi:10.1136/sextrans-2018-053753.

23.Li Y, Oosting M, Deelen P, Ricaño-Ponce I, Smeekens S, Jaeger M, et al. Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses. Nat Med. 2016;22:952-960. doi:10.1038/nm.4139.

24.Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. Nat Rev Genet. 2012;13:175-188. doi:10.1038/nrg3114.

25.Wei Z, Wenhao S, Yuanyuan M, Yang L, Daming Z, Jiangchun X, et al. A single nucleotide polymorphism in the interferon-γ gene (IFNG +874 T/A) is associated with susceptibility to tuberculosis. Oncotarget. 2017;8:50415-50429. doi:10.18632/oncotarget.17304.

26.Rolandelli A, Pellegrini JM, Amiano NO, Santilli MC, Morelli MP, Castello FA, et al. The IFNG rs1861494 single nucleotide polymorphism is associated with protection against tuberculosis disease in Argentina. Genes (Basel). 2018;9:46. doi:10.3390/genes9010046.

27.Ahmed AA, Rasheed Z, Salem T, Al-Dhubaibi MS, Al Robaee AA, Alzolibani AA. TNF-α -308 G/A and IFN-γ +874 A/T gene polymorphisms in Saudi patients with cutaneous leishmaniasis. BMC Med Genet. 2020;21:104. doi:10.1186/s12881-020-01043-9.

28.Chevillard C, Moukoko CE, Elwali NE, Bream JH, Kouriba B, Argiro L, et al. IFN-gamma polymorphisms are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis. J Immunol. 2003;171:5596-5601. doi:10.4049/jimmunol.171.10.5596.

29.Wani BA, Shehjar F, Shah S, Koul A, Yusuf A, Murtaza M, et al. Association of IFN-gamma and IL-10 gene variants with the risk of extrapulmonary tuberculosis. Saudi J Biol Sci. 2021;28:4210-4216. doi:10.1016/j.sjbs.2021.06.029.

30.Sun Y, Lu Y, Li T, Xie L, Deng Y, Li S, et al. Interferon gamma +874T/A polymorphism increases the risk of hepatitis virus-related diseases. PLoS One. 2015;10:e0121168. doi:10.1371/journal.pone.0121168.

31.Liu A, Giacani L, Tuero I, Klausner JD. Syphilis pathogenesis: host immune response vs pathogen immune evasion. J Infect Dis. 2025;232:760-766. doi:10.1093/infdis/jiaf388.

32.Wojas-Pelc A, Pastuszczak M, Serwin AB, et al. Syphilis. Diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society. Part 1: early and late syphilis. Dermatol Rev. 2018;105:563-581. doi:10.5114/dr.2018.79169.

33.Clement ME, Okeke NL, Hicks CB. Treatment of syphilis: a systematic review. JAMA. 2014;312:1905-1917. doi:10.1001/jama.2014.13259.

34.Kiołbasa M, Kaminiów K, Pastuszczak M. Serofast state after syphilis treatment: implications and recommendations for clinical practice. Postepy Dermatol Alergol. 2025;42:215-220. doi:10.5114/ada.2024.147332.

35.Leader BT, Godornes C, Van Voorhis WC, Lukehart SA. CD4+ lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis. Infect Immun. 2007;75:3021-3026. doi:10.1128/IAI.01973-06.

36.Van Voorhis WC, Barrett LK, Koelle DM, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines. J Infect Dis. 1996;173:491-495. doi:10.1093/infdis/173.2.491.

37.Hernández-Pliego A, Vergara-Ortega DN, Herrera-Ortíz A, Toledano-Jaimes C, Esquivel-Guadarrama FR, Sánchez-Alemán MÁ, et al. IL-10 and IL-17 as progression markers of syphilis in people living with HIV: a systematic review. Biomolecules. 2022;12:1472. doi:10.3390/biom12101472.

38.Li W, Wu W, Chang H, Jiang M, Gao J, Xu Y, et al. Cerebrospinal fluid cytokines in patients with neurosyphilis: the significance of interleukin-10 for the disease. Biomed Res Int. 2020;2020:3812671. doi:10.1155/2020/3812671.

39.Hawley KL, Cruz AR, Benjamin SJ, La Vake CJ, Cervantes JL, LeDoyt M, et al. IFNγ enhances CD64-potentiated phagocytosis of Treponema pallidum opsonized with human syphilitic serum by human macrophages. Front Immunol. 2017;8:1227. doi:10.3389/fimmu.2017.01227.

40.Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene. Hum Immunol. 2000;61:863-866. doi:10.1016/s0198-8859(00)00167-1.

41.Platzer B, Stout M, Fiebiger E. Antigen cross-presentation of immune complexes. Front Immunol. 2014;5:140. doi:10.3389/fimmu.2014.00140.

42.Colbert JD, Cruz FM, Rock KL. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules. Curr Opin Immunol. 2020;64:1-8. doi:10.1016/j.coi.2019.12.005.

43.Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid antibodies and infections. Ann Rheum Dis. 2003;62:388-393. doi:10.1136/ard.62.5.388.

44.Sène D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. Autoimmun Rev. 2008;7:272-277. doi:10.1016/j.autrev.2007.10.001.

45.Sciascia S, Radin M, Bazzan M, Montaruli B, Cosseddu D, Norbiato C, et al. Antiphospholipid antibodies and infection: non nova sed nove. Front Immunol. 2021;12:687534. doi:10.3389/fimmu.2021.687534.

46.Smiyan S, Kuzmina G, Garmish O, Komorovsky R. Infection-triggered antiphospholipid syndrome: a critical overview. Open Access Rheumatol. 2025;17:173-183. doi:10.2147/OARRR.S541224.

47.Loizou S, Singh S, Wypkema E, Asherson RA. Anticardiolipin, anti-beta(2)-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. Ann Rheum Dis. 2003;62:1106-1111. doi:10.1136/ard.62.11.1106.

48.Pierangeli SS, Goldsmith GH, Krnic S, Harris EN. Differences in functional activity of anticardiolipin antibodies from patients with syphilis and those with antiphospholipid syndrome. Infect Immun. 1994;62:4081-4084. doi:10.1128/iai.62.9.4081-4084.1994.

49.Santiago MB, Stellin R, Gaburo Júnior N, Bueno C, Viana VS, Cossermelli W, et al. Antiphospholipid antibodies in syphilis. Braz J Med Biol Res. 1990;23:397-402.

8. STRESZCZENIE

Kiła pozostaje istotnym problemem zdrowia publicznego na świecie, pomimo dostępności skutecznej antybiotykoterapii. W ostatnich latach obserwuje się ponowny wzrost liczby zachorowań, szczególnie w krajach rozwiniętych. Standardem leczenia kiły wczesnej pozostaje podanie penicyliny benzatynowej, a skuteczność terapii oceniana jest na podstawie odpowiedzi klinicznej oraz serologicznej.

U części pacjentów, pomimo prawidłowo przeprowadzonego leczenia, nie dochodzi do oczekiwanego spadku miana odczynów niekrętkowych. Zjawisko to określane jest jako stan surowiczooporności (serofast) i dotyczy około 15–20% chorych. Patogeneza tego zjawiska nie została dotychczas jednoznacznie wyjaśniona, a jego znaczenie kliniczne pozostaje niepewne. W szczególności nie jest jasne, czy utrzymująca się reaktywność serologiczna wynika z przetrwałego zakażenia, czy też stanowi efekt zaburzeń odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

Głównym celem pracy była ocena roli odpowiedzi immunologicznej gospodarza w patogenezie stanu surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej.

Cele szczegółowe obejmowały: ocenę różnic w zakresie odpowiedzi immunologicznej pomiędzy pacjentami z prawidłową odpowiedzią serologiczną a pacjentami ze stanem serofast; analizę subpopulacji limfocytów krwi obwodowej oraz wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej w czasie; określenie związku pomiędzy polimorfizmami genu interferonu gamma (IFN-γ) a ryzykiem rozwoju stanu serofast; oraz analizę obecności przeciwciał antykardiolipinowych i ich znaczenia klinicznego.

W przeprowadzonych badaniach wykazano istotne różnice w zakresie odpowiedzi immunologicznej pomiędzy pacjentami z prawidłową odpowiedzią na leczenie a pacjentami ze stanem serofast.

U pacjentów ze stanem surowiczooporności stwierdzono znamiennie obniżoną liczebność limfocytów T cytotoksycznych (CD8+) oraz całkowitej populacji limfocytów T (CD3+), utrzymującą się zarówno przed leczeniem, jak i po jego zakończeniu, co wskazuje na upośledzenie mechanizmów odpowiedzi komórkowej.

Jednocześnie obserwowano utrzymującą się aktywację odpowiedzi humoralnej, wyrażoną zwiększoną liczebnością limfocytów B po zakończeniu leczenia. Wyniki te wskazują na zaburzenie równowagi pomiędzy odpowiedzią komórkową a humoralną jako potencjalny mechanizm utrzymywania się reaktywności serologicznej.

Wykazano ponadto istotny związek pomiędzy polimorfizmami genu IFN-γ (+874 T/A oraz +2109 A/G) a ryzykiem rozwoju stanu serofast. Genotypy związane z niższą produkcją IFN-γ korelowały z większym prawdopodobieństwem utrzymywania się nieprawidłowej odpowiedzi serologicznej, co wskazuje na znaczenie czynników immunogenetycznych w modulowaniu odpowiedzi na leczenie.

Analiza przeciwciał antykardiolipinowych wykazała ich obecność przed leczeniem oraz całkowity zanik po jego zakończeniu, co przemawia za ich przejściowym charakterem i brakiem związku z utrzymującą się reaktywnością serologiczną.

Uzyskane wyniki wskazują, że stan surowiczooporności jest związany przede wszystkim z zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej gospodarza, a nie z utrzymującym się zakażeniem.

Stan surowiczooporności po leczeniu kiły wczesnej stanowi złożony problem kliniczny wynikający z dysregulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Kluczową rolę w jego patogenezie odgrywa zaburzenie równowagi pomiędzy odpowiedzią komórkową a humoralną, polegające na niewystarczającej aktywacji mechanizmów komórkowych przy jednoczesnym utrzymywaniu się odpowiedzi humoralnej.

Istotne znaczenie mają również czynniki genetyczne, w tym polimorfizmy genu IFN-γ, które wpływają na skuteczność odpowiedzi immunologicznej i determinują ryzyko rozwoju stanu serofast.

Uzyskane wyniki przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podłoża surowiczooporności oraz mogą stanowić podstawę do opracowania bardziej precyzyjnych strategii diagnostycznych i terapeutycznych, w tym identyfikacji pacjentów wymagających indywidualnego podejścia klinicznego.

9. ABSTRACT

Syphilis remains a significant global public health concern despite the availability of effective antibiotic therapy. In recent years, a resurgence in the incidence of syphilis has been observed, particularly in developed countries. Benzathine penicillin G remains the standard treatment for early syphilis, and therapeutic success is assessed based on both clinical and serological response.

In a subset of patients, however, the expected decline in non-treponemal antibody titers is not achieved despite appropriate treatment. This phenomenon, referred to as the serofast state, affects approximately 15–20% of patients. The pathogenesis of this condition remains unclear, and its clinical significance is still debated. In particular, it is uncertain whether persistent seroreactivity reflects ongoing infection or dysregulation of the host immune response.

The main aim of this study was to evaluate the role of the host immune response in the pathogenesis of the serofast state following treatment of early syphilis.

The specific objectives included: assessing differences in immune response between patients with an adequate serological response and those with serofast status; analyzing peripheral blood lymphocyte subpopulations and selected immunological parameters over time; determining the association between interferon gamma (IFN-γ) gene polymorphisms and the risk of developing the serofast state; and evaluating the presence and clinical relevance of anticardiolipin antibodies.

In the conducted studies, significant differences in immune response were observed between patients with a normal serological response and those with the serofast state.

Patients with serofast status demonstrated a significantly reduced number of cytotoxic T lymphocytes (CD8+) and total T lymphocytes (CD3+), both before and after treatment, indicating impaired cellular immune response.

At the same time, persistent activation of the humoral immune response was observed, reflected by increased B-cell counts after treatment. These findings suggest

an imbalance between cellular and humoral immunity as a potential mechanism underlying persistent seroreactivity.

A significant association was also identified between IFN-γ gene polymorphisms (+874 T/A and +2109 A/G) and the risk of developing the serofast state. Genotypes associated with lower IFN-γ production were linked to a higher likelihood of persistent serological response, highlighting the role of immunogenetic factors in modulating treatment outcomes.

Analysis of anticardiolipin antibodies demonstrated their presence before treatment and complete disappearance after therapy, indicating their transient nature and lack of association with persistent seroreactivity.

Overall, the results indicate that the serofast state is primarily related to dysregulation of the host immune response rather than persistent infection.

The serofast state following treatment of early syphilis represents a complex clinical phenomenon resulting from dysregulation of the host immune response. A key role is played by an imbalance between impaired cellular immunity and sustained humoral activation.

Genetic factors, particularly IFN-γ gene polymorphisms, significantly influence the effectiveness of the immune response and contribute to the risk of developing the serofast state.

These findings provide new insights into the mechanisms underlying persistent seroreactivity and may contribute to the development of more precise diagnostic and therapeutic strategies, including the identification of patients who may benefit from individualized clinical management.

10. ZAŁĄCZNIKI

10.1. Publikacje wchodzące w skład doktoratu

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 02 June 2025
DOI 10.3389/fimmu.2025.1602527

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
René Huber,
Hannover Medical School, Germany

REVIEWED BY
Corrado Zengarini,
University of Bologna, Italy
Neslihan Arıcı,
Haydarpasa Numune Training and Research Hospital, Türkiye

*CORRESPONDENCE
Konrad Kaminiów
kaminiow.k@gmail.com

RECEIVED 29 March 2025
ACCEPTED 12 May 2025
PUBLISHED 02 June 2025

CITATION
Kaminiów K, Kiołbasa M and Pastuszczak M (2025) IFN γ gene polymorphisms +874 T/A and +2109 A/G are associated with the serofast state after early syphilis treatment: a prospective observational study.
Front. Immunol. 16:1602527.
doi: 10.3389/fimmu.2025.1602527

COPYRIGHT
© 2025 Kaminiów, Kiołbasa and Pastuszczak. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IFN-γ gene polymorphisms +874 T/A and +2109 A/G are associated with the serofast state after early syphilis treatment: a prospective observational study

Konrad Kaminiów*, Martyna Kiołbasa and Maciej Pastuszczak

Clinical Department of Dermatology in Zabrze, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

Background: In approximately 20% of patients with early syphilis, the classical serological response pattern is absent following treatment. They experience a serofast state, which manifests as less than a 4-fold decline in non-treponemal titres, without any clinical signs of treatment failure or reinfection. The effectiveness of the immune defense against *T. pallidum*, as well as its potential failure and the occurrence of the serofast state, depends on the Th1 cellular response, including cytokines such as IFN-γ. The aim of this prospective observational study was to investigate the impact of IFN-γ gene polymorphisms on the occurrence of the serofast state.

Materials and methods: A cohort of 97 patients with early syphilis (73.2% secondary syphilis, 26.8% early latent syphilis) and 50 healthy volunteers were enrolled. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IFN-γ gene promoter region, +874 T>A (rs2430561) and +2109 A>G (rs1861494), were analyzed. Serum IFN-γ levels were measured at baseline, prior to treatment. Patients were stratified into serofast (n=18) and serologically cured (n=79) groups.

Results: Serofast patients exhibited significantly lower baseline serum IFN-γ levels compared to the serologically cured group (p=0.01). All healthy subjects had IFN-γ levels below the detection limit. Analysis of IFN-γ gene polymorphisms revealed a significant association with treatment outcomes. The +874 AA and +2109 GG genotypes, associated with low IFN-γ production, were significantly more frequent in serofast patients (p=0.0004 and p=0.002, respectively), with odds ratios (OR) of 7.1 (95% CI: 2.2-23.2) and 5.5 (95% CI: 1.8-17.3), respectively. Additionally, carriers of the +874A/+2109G haplotype were significantly more likely to remain serofast (OR 4.4, p=0.01). Conversely, the +874 TT and +2109 AA genotypes, associated with high IFN-γ production, were significantly linked to serological cure (OR 4.4, p=0.03; OR 4.4, p=0.01). Similarly, the +874T/+2109A haplotype was strongly associated with serological cure (OR 17.9, p<0.0001).

Discussion: Distinct IFN-γ polymorphisms and haplotypes are associated with serological outcomes in syphilis. The +874 T>A and +2109 A>G variants influence

IFN-γ levels, potentially modulating the immune response and serological recovery. These findings suggest a genetic predisposition underlying serofast syphilis and underscore the importance of personalized approaches in its management.

KEYWORDS

syphilis, serofast state, IFN-γ, polymorphism, SNP, +874 T/A, +2109 A/G

1 Introduction

Syphilis, caused by the spirochete *Treponema pallidum*, remains a significant global health concern, with millions of new cases diagnosed annually. Despite the availability of effective antibiotic therapies, a subset of patients develops a serological phenomenon known as the serofast state. This condition is characterized by a less than four-fold decrease in non-treponemal antibody titres during a 6-month follow-up period after the end of treatment compared to pre-treatment values (1, 2). The pathophysiological mechanisms underlying this state remain incompletely understood, raising critical questions about whether it reflects persistent infection, residual immune activation, or other immunological phenomena (3–5).

The immune response to *T. pallidum* is predominantly mediated by Th1-driven cellular immunity, with interferon-gamma (IFN-γ) playing a central role. IFN-γ activates macrophages, enhances pathogen clearance, and coordinates downstream immune processes critical to the eradication of treponemal infection. Studies have demonstrated that higher baseline and treatment-induced IFN-γ levels are associated with favorable serological responses, including the decline of non-treponemal antibody titers following therapy (3, 4). Conversely, suboptimal IFN-γ production has been implicated in impaired pathogen clearance, potentially predisposing patients to a serofast state (3).

Emerging evidence highlights the importance of host genetic factors in modulating cytokine production and immune responses. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IFN-γ gene, particularly rs2430561 (+874 T/A) and rs1861494 (+2109 A/G), are known to regulate IFN-γ expression. The +874 T/A polymorphism, located within an intronic regulatory region, influences nuclear factor binding affinity, with the A allele associated with lower IFN-γ production (6, 7). Similarly, the G allele of the +2109 A/G polymorphism, found in the third intron, exerts a comparable suppressive effect on IFN-γ production (8, 9). Such genetic variability has been implicated in susceptibility to infectious diseases such as tuberculosis, leishmaniasis, and viral hepatitis (7, 10–13). However, its role in the immune dynamics of syphilis, particularly in the context of serofast state, remains underexplored.

Cytokine regulation in syphilis is further modulated by the interplay of pro- and anti-inflammatory mediators. For instance, elevated levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10) have been associated with distinct immunological pathways following *T. pallidum* infection (4, 5). TNF-α is a potent pro-inflammatory cytokine critical for pathogen elimination, whereas IL-10 suppresses excessive inflammation but may inadvertently facilitate pathogen persistence. Studies have demonstrated that polymorphisms in these cytokine genes, such as TNF-α -308 G/A and IL-10–592 C/A, significantly influence the risk of serofast state by altering cytokine expression levels and immune regulation (4, 5).

Building upon previous findings by Pastuszczak et al., who demonstrated that robust pro-inflammatory responses, particularly elevated IFN-γ levels, predict serological cure in syphilis (3, 4), this study investigates the role of IFN-γ genetic polymorphisms in determining treatment outcomes. We hypothesize that specific allelic configurations associated with reduced IFN-γ production increase the risk of developing the serofast state, thereby impairing optimal immune resolution of treponemal infection.

This research aims to elucidate the genetic and immunological factors underlying the serofast state in syphilis. By bridging immunogenetic insights with clinical observations, the findings may pave the way for novel diagnostic and therapeutic approaches, enhancing the management of this complex and enigmatic condition.

2 Materials and methods

2.1 Study design

This was a prospective observational study conducted between 2018 and 2024 at the Clinical Department of Dermatology in Zabrze, Medical University of Silesia in Katowice, Poland. All consecutive patients meeting the inclusion criteria and diagnosed with early syphilis at our department between 2018 and 2024 were enrolled. No patient selection beyond the eligibility criteria was applied. Patients with early syphilis (either secondary or early latent) were enrolled during their first episode of the disease. The inclusion criteria were: age ≥18 years, positive treponemal and non-treponemal tests,

no antimicrobial or immunosuppressive treatment within the 6 months preceding enrollment, no HIV infection, and no history of chronic inflammatory or autoimmune diseases. Serological diagnosis was based on reactivity in both the Rapid Plasma Reagin (RPR) test and the Treponema pallidum hemagglutination assay (TPHA). The RPR test (BD Macro-Vue™ RPR Card Test; Becton, Dickinson and Company, USA) was performed quantitatively, and the TPHA test (TPHA 200; Bio-Rad Laboratories, France) was interpreted according to the manufacturer's guidelines, with a positive result indicating the presence of antibodies against Treponema pallidum. After enrollment, all patients received a single intramuscular dose of benzathine penicillin G (2.4 million units), in accordance with standard treatment guidelines. Healthy individuals matched for age and sex served as controls. The control group consisted of 50 healthy volunteers recruited from the hospital staff invitations. Controls were frequency-matched to the patient group by age and sex (approximately 1:2 ratio). Individuals were eligible for inclusion if they had no history of syphilis or other sexually transmitted infections, no recent (within the past 6 months) antibiotic or immunosuppressive therapy, and no chronic inflammatory or autoimmune diseases. All participants in the control group underwent a structured medical history interview to confirm eligibility. All participants were recruited at a single clinical site in Poland and represented a relatively ethnically homogeneous population, predominantly of Central or Eastern European descent.–

2.2 Patient characteristics

Patients with early syphilis (secondary or early latent) were enrolled in this study. Disease staging was determined according to CDC guidelines, based on clinical history, physical examination, and laboratory results (14). The diagnosis of early latent syphilis required positive treponemal and non-treponemal tests and at least one of the following within the preceding 12 months: (I) documented serologic relapse, (II) a ≥4-fold increase in non-treponemal titre, or (III) presumptive clinical evidence of primary or secondary syphilis (15). Demographic and clinical data were collected for all patients at baseline, including age, sex, and syphilis stage (secondary or early latent).

At six months post-treatment, patients were stratified into two groups according to their serological response: (I) the serofast group, defined as a <4-fold decline in RPR titre, and (II) the serologically cured group, defined as a ≥4-fold decline relative to baseline. Serofast following early syphilis treatment was defined, based on Sena AC et al. (16), as the failure to achieve at least a fourfold decline in the RPR titer six months after completion of therapy compared to the pretreatment value. Blood samples for serological testing for syphilis, including non-treponemal titre assessment, were collected at baseline and at the 6-month follow-up after treatment. In contrast, samples for cytokine level measurements and genetic analyses were obtained only at baseline.

In addition, 50 healthy volunteers aged 18 to 57 years, matched for age and sex, were recruited as a control group. None of the control participants had a history of syphilis, chronic inflammatory conditions, HIV infection or autoimmune diseases. The control group size was determined pragmatically based on the availability of eligible volunteers and was approximately matched to the patient group at a 1:2 ratio.

2.3 Cytokine measurement

Serum samples for IFN-γ measurement were collected at enrollment. These baseline samples were obtained prior to treatment initiation, during active syphilis infection. Samples were stored at -80°C until analysis. Serum IFN-γ levels were measured using a high-sensitivity ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). All measurements were performed in duplicate. Cytokine measurements were performed according to the manufacturer's instructions.

2.4 Genotyping for IFN-γ gene promoter polymorphisms

DNA was extracted from whole blood using the GenElute Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) according to the manufacturer's protocol. SNP genotyping (+874 T/A) [rs2430561] and (+2109 A/G) [rs1861494] was determined by allelic discrimination using TaqMan SNP genotyping assays (assay IDs: C_11688847_20 and C_2683477_10; Life Technologies Co. Carlsbad, California, USA) with 7900HT Fast Real-Time PCR platform (Life Technologies).

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Unless otherwise noted, data were expressed as median and IQR values. The $\chi 2$ test was used to compare allele frequencies and confirm Hardy-Weinberg equilibrium. The Fisher's exact test was used to analyze the association between serofast status and SNP variants. Continuous variables were compared using the Mann-Whitney U test. $P<0.05$ was considered statistically significant.

2.6 Ethical aspects

This study was submitted to and approved by the Jagiellonian University Bioethics Committee (approval number KBet/164/B) and by the Medical University of Silesia Bioethics Committee (approval number BNW/NWN/0052/KB1/13/I/24). Fully

10.3389/fimmu.2025.1602527

informed, voluntary, written consent was obtained from all study participants, including consent for genotyping.

3 Results

3.1 Characteristics of the patients

97 patients aged 18–57 years with a first episode of early syphilis, who were staged as secondary (73,5%) or early latent (26,5%) syphilis, were enrolled in this study. Six months after completing their syphilis treatment, 18 patients (18.5%) had not achieved at least a 4-fold decline in RPR titre compared with their pretreatment values. Individuals were stratified into (1) serofast state (n=18) and (2) serologically cured (n=79) groups.

The serofast state and serologically cured groups did not differ in basic demographic and clinical characteristics such as age, sex and syphilis symptoms (Table 1). Specific clinical signs such as macular trunk rash and palmo-plantar exanthema were listed separately to provide more detailed insight into the distribution of symptoms among patients with secondary syphilis. Patients with serofast syphilis had significantly lower baseline levels of serum IFNγ compared with individuals from the serologically-cured group (Table 1). All healthy subjects had IFNγ levels below the detection limit of the assay (data not shown).

3.2 Allele frequencies of IFNγ gene promoter polymorphisms

Minor allele frequencies of the IFNγ gene +874 T>A (rs2430561, allele A) and +2109 A>G (rs1861494, allele G) polymorphisms in the whole cohort were 0.45 (for both alleles).

TABLE 1 Characteristics of patients included in the study.

Patient Characteristic	Serofast group (n=18)	Serologically cured group (n=79)	P value
age years; (min-max)	26 (19-55)	22 (18-57)	0.5
males; n (%)	16 (89)	73 (92)	0.6
baseline RPR; (min-max)	32 (16-256)	64 (4-128)	0.4
secondary syphilis; n (%)	13 (72)	58 (73)	0.5
macular exanthema on trunk; n (%)	13 (72)	58 (73)	0.5
papular exanthema on palms and soles; n (%)	4 (22)	20 (25)	0.8
early latent syphilis; n (%)	5 (28)	21 (26,5)	0.9
pre-treatment serum IFNγ levels; pg/ml (min-max)	0.5 (0.1-2.1)	1.6 (0.1-4.3)	0.01

Data are given as median (min max) or otherwise stated.

The observed genotype frequencies agreed with Hardy-Weinberg equilibrium, both for the entire cohort.

To assess potential population stratification, we compared genotype and haplotype frequencies between syphilis patients and healthy controls. The distributions were similar across both groups. For the +874T>A polymorphism, the TT genotype was present in 30.9% of patients and 30.0% of controls, TA in 52.6% vs. 50.0%, and AA in 16.5% vs. 20.0%, respectively. For the +2109A>G polymorphism, the AA genotype was found in 49.5% of patients and 40.0% of controls, AG in 32.0% vs. 30.0%, and GG in 18.6% vs. 30.0%. The +874T/+2109A haplotype occurred in 76.3% of patients and 70.0% of controls, while the +874A/+2109G haplotype was present in 50.5% and 56.0%, respectively. None of these differences were statistically significant (all $p > 0.1$).

In the whole syphilis group, individuals with the AA genotype of +874 T>A polymorphism had significantly lower pretreatment serum levels of IFNγ compared with the TA+TT genotypes (Figure 1A). Similarly, the GG genotype of +2109 A>G polymorphism was associated with significantly lower serum IFNγ compared with AG+AA genotypes (Figure 1B).

3.3 Association between IFNγ gene promoter SNPs and treatment outcome

There was a significant association between IFNγ gene promoter polymorphisms and the risk of serofast status after treatment. The +874T>A AA and +2109A>G GG genotypes, both associated with low IFNγ production, were significantly more frequent in patients who remained serofast compared to those who achieved serological cure (OR 7.1, 95% CI: 2.2–23.2, p=0.0004; and OR 5.5, 95% CI: 1.8–17.3, p=0.002, respectively) (Table 2). Similarly, carriers of the +874A/+2109G haplotype had a significantly higher likelihood of remaining serofast (OR 4.4, 95% CI: 1.3–14.6, p=0.01).

In contrast, the +874T>A TT and +2109A>G AA genotypes (high IFNγ producers) were associated with a reduced risk of serofast status (OR 0.23, 95% CI: 0.05–0.82, p=0.03; and OR 0.23, 95% CI: 0.07–0.76, p=0.01, respectively). The +874T/+2109A haplotype conferred a particularly strong protective effect against the serofast state, with an OR of 0.06 (95% CI: 0.02–0.19, p<0.0001).

Table 3 summarizes pre-treatment IFNγ concentrations stratified by clinical outcome and genotype. Across both +874T>A and +2109A>G polymorphisms, patients who achieved serological cure tended to exhibit higher IFNγ levels compared to those who remained serofast. This trend was also observed at the haplotype level, although the differences did not reach statistical significance.

4 Discussion

The immune response to *T. pallidum* infection has long been recognized as widespread and complex, with cellular immunity playing a pivotal role in the pathophysiology of syphilis. In early stages of the disease, cellular immune mechanisms facilitates

10.3389/fimmu.2025.1602527

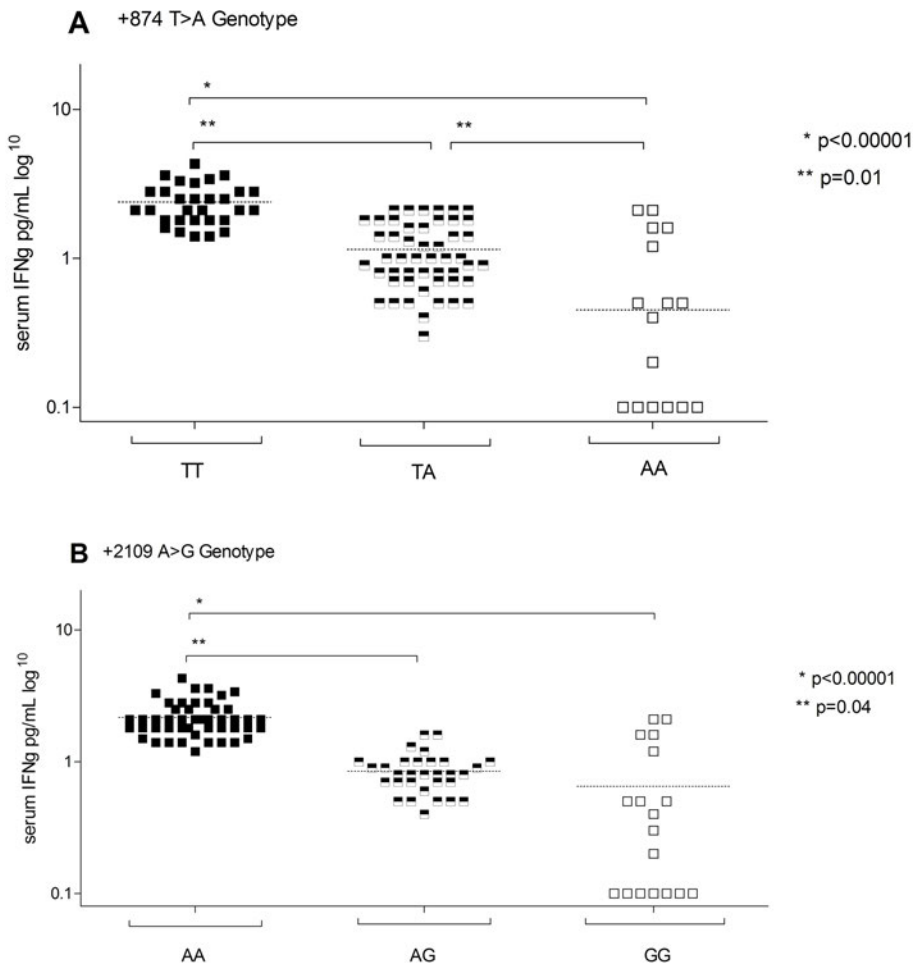


FIGURE 1
Serum IFN γ levels in patients with syphilis according to IFN γ gene polymorphisms.

TABLE 2 Frequencies of IFNγ gene single nucleotide polymorphisms (+874 T>A and +2109 A>G) in serofast and serologically cured group.

Genotype/Haplotype	Serofast group (n=18)	Serologically cured group (n=79)	P value	OR (95%CI)
+874 T>A genotype; n (%)				
TT	2 (11.1)	28 (35.4)	0.04	0.2 (0.1-1.1)
TA	8 (44.4)	43 (54.4)	0.4	0.7 (0.2-1.9)
AA	8 (44.4)	8 (10.1)	0.0004	7.1 (2.2-23.2)
+2109 A>G genotype; n (%)				
AA	4 (22.2)	44 (55.7)	0.01	0.2 (0.1-0.8)
AG	6 (33.3)	25 (31.6)	0.9	1.1 (0.4-3.2)
GG	8 (44.4)	10 (12.7)	0.002	5.5 (1.8-17.3)
+874 T/+2109A haplotype; n (%)	5 (27.8)	69 (87.3)	0.00001	0.1 (0.02-0.2)
+874 A/+2109G haplotype; n (%)	14 (77.8)	35 (44.3)	0.01	4.4 (1.3-14.6)

OR; Odds ratio and 95%CI; 95% confidence intervals indicating the likelihood of serofast status in patients carrying a given genotype/haplotype, compared to all other genotypes combined.

10.3389/fimmu.2025.1602527

TABLE 3 Pre-treatment IFN-γ serum levels in serofast and serologically cured group, depending on genotype and haplotype.

Genotype/Haplotype	Serofast group (n=18)	Serologically cured group (n=79)	P value
IFN-γ +874 T>A (pg/mL)			
TT	1.9 (1.6-2.1)	2.3 (1.4-4.3)	0.3
TA	1.2 (0.5-1.6)	1 (0.1-2.1)	0.9
AA	0.1 (0.1-0.5)	1.4 (0.5-2.1)	0.06
IFN-γ +2109 A>G (pg/mL)			
AA	1.4 (0.5-2.1)	2.1 (1.4-4.3)	0.3
AG	1.3 (0.5-1.6)	0.8 (0.4-1.0)	0.8
GG	0.1 (0.1-0.5)	0.9 (0.1-2.1)	0.1
+874 T/+2109A haplotype	1 (0.5-2.1)	1.8 (0.5-4.3)	0.6
+874 A/+2109G haplotype	0.5 (0.1-1.6)	0.8 (0.1-2.1)	0.7

Data are given as median (min max).

bacterial clearance at the site of entry, often resulting in spontaneous resolution of symptoms (17). The Th1-type response is particularly prominent, and individuals exhibiting a robust Th1 profile are more likely to control infection and limit disease progression (18, 19).

Conversely, impaired cellular immunity may lead to ineffective bacterial clearance, persistent inflammation, and the development of the serofast state after treatment (3, 4, 15). Several studies suggest that an exaggerated regulatory immune response, especially mediated by interleukin-10 (IL-10), may contribute to the persistence of the serofast condition. Elevated IL-10 levels have been proposed as markers of disease activity in syphilis, particularly among people living with HIV who may display altered immune regulation due to co-infection (20). Similarly, in neurosyphilis, cerebrospinal fluid IL-10 has been identified as a potential biomarker in both symptomatic and asymptomatic patients, and is thought to facilitate bacterial persistence (21). Notably, persistently elevated IL-10 levels, both before and after treatment, have been associated with a higher likelihood of developing the serofast state (4).

Our findings, showing increased serum IFN-γ levels and associations with specific IFN-γ genotypes, are in line with recent immunopathological models highlighting the role of IFN-γ in promoting the opsonophagocytosis of *T. pallidum* by macrophages via CD64-mediated mechanisms (22). In contrast, patients exhibiting a stronger pro-inflammatory profile—characterized by higher levels of IFN-γ, tumor necrosis factor-α (TNF-α), and interleukin-6 (IL-6)—showed a greater likelihood of achieving serological cure (3, 4).

The precise mechanisms underlying the serofast state remain unclear. Possible explanations include persistent *T. pallidum* antigenic stimulation, immune dysregulation, or incomplete bacterial eradication (17). This ambiguity has significant clinical implications, as it remains uncertain whether serofast individuals are at risk of developing late-stage syphilis or pose an epidemiological threat to others (17).

In our study, 19.5% of patients exhibited a serofast response six months post-treatment. This aligns with previous reports, where the prevalence of serofast status ranged from 9.4% to 44.4% (14, 19). This broad variability may be partially attributable to differences in infection stage at the time of diagnosis and treatment. Notably, early latent syphilis has been associated with an increased likelihood of serofast status compared to primary or secondary syphilis (23).

The host immune response to *T. pallidum* involves a balance between pro- and anti-inflammatory cytokines, enabling bacterial clearance while minimizing tissue damage (17). Interferon-gamma (IFN-γ), a key pro-inflammatory cytokine, plays a pivotal role in the immune response to *T. pallidum*. Produced predominantly by T cells and natural killer (NK) cells, IFN-γ enhances T-cell cytotoxicity and macrophage-mediated bacterial phagocytosis (18). Prior studies have indicated that variations in serum IFN-γ levels may influence infection outcomes, with lower concentrations potentially facilitating bacterial persistence, chronic inflammation, and the development of a serofast state post-treatment (3, 4).

Genetic factors are known to influence IFN-γ expression. The IFN-γ gene, located on chromosome 12q24, spans approximately 5.4 kb and comprises four exons and three introns (24). Numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified within this region (12, 24), including the +874T/A (rs2430561) polymorphism in the first intron and the +2109A/G (rs1861494) polymorphism in the third intron, both of which have been shown to influence IFN-γ serum levels (13, 25–27) (SNPs in the gene for IFN-γ are shown in Figure 2). Given that IFN-γ function is directly proportional to its concentration, these polymorphisms may modulate immune responses and consequently alter infection outcomes.

It should be emphasized that IFN-γ levels were measured at the time of diagnosis, during active infection. Therefore, the observed differences likely reflect genotype-dependent variability in the magnitude of immune activation rather than constitutive (baseline) cytokine expression. This distinction is important for interpreting the immunogenetic associations observed in this study.

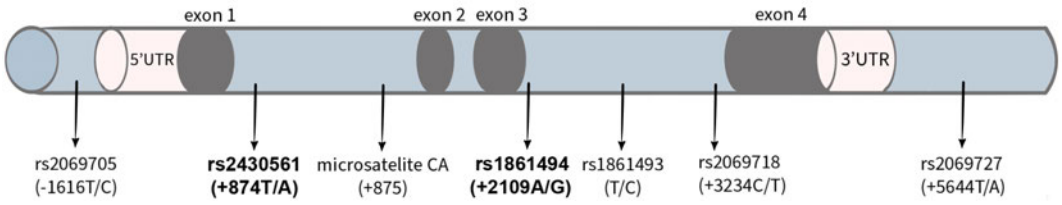


FIGURE 2
IFN γ gene polymorphisms with marked variants analyzed in this study.

The +874TT genotype of the IFN-γ gene has been shown to be associated with robust IFN-γ production, whereas the AA and TA genotypes correlate with reduced cytokine expression and low IFN-γ production (28). In the present study, we demonstrated significantly lower serum IFN-γ concentrations in patients with the +874AA genotype compared to those with the +874AT and +874TT genotypes. Additionally, we observed a significantly higher frequency of the AA genotype at +874T>A in the serofast group compared to the serologically cured group (44% vs. 10%, $p < 0.05$). Conversely, the TT genotype, which is associated with higher IFN-γ production, was more prevalent in the serologically cured group (35% vs. 11%, $p < 0.05$). Similar trends have been reported in other infectious diseases, where the T allele has been linked to stronger immune responses and disease control (29, 30). The protective effect of the T allele has also been documented in TB, where it was associated with milder or localized disease forms (29). Likewise, Wei et al. (31) demonstrated that the T allele of IFN-γ +874T/A (high IFN producer) confers resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection by enhancing IFN-γ expression. The reduced IFN-γ production in these genotypes may contribute to incomplete bacterial clearance, persistent antigenic stimulation, and chronic inflammation, thereby promoting serofast status post-treatment.

Previous studies indicate that the G allele of the IFN-γ rs1861494 polymorphism is associated with lower IFN-γ production, which may influence susceptibility to disease in different ways. In the study from Argentina, individuals carrying the GG genotype exhibited the lowest IFN-γ secretion in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens (8). Compared to AA and AG carriers, GG individuals had significantly reduced levels of IFN-γ in culture supernatants and a lower percentage of $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ lymphocytes (8). This suggests that the G allele is linked to decreased IFN-γ expression, which may impair the immune response against tuberculosis and contribute to increased disease susceptibility.

Figure 3 illustrates the authors' hypothesis that polymorphisms in the IFN-γ gene - specifically the AA genotype of the +874 T/A polymorphism and the GG genotype of the +2109 A/G polymorphism - lead to reduced IFN-γ production. This results in diminished stimulation of macrophages for the phagocytosis and destruction of *T. pallidum*, representing an impairment of the host's cellular immune response. Consequently, these alterations may predispose individuals to the development of a serofast state following early syphilis treatment.

A meta-analysis evaluating the efficacy of various antibiotics in the treatment of syphilis demonstrated that doxycycline, when compared to benzathine penicillin, is associated with a higher rate of serological failure (32). In addition to their antimicrobial properties, tetracyclines suppress the production of pro-inflammatory cytokines and exert immunomodulatory effects (33–35). Penicillins, on the other hand, disrupt bacterial cell walls, leading to the release of pro-inflammatory components into the host system (36–38). These findings suggest that the choice of antibiotic regimen may influence immunological dynamics and treatment outcomes, potentially interacting with host genetic predispositions.

Despite the strengths of our study, some limitations should be acknowledged. First, the sample size was relatively small, necessitating validation in larger cohorts. Multi-center studies would be beneficial to provide a broader perspective on IFN-γ polymorphisms in syphilis serological outcomes. Second, our study population was homogenous, and genetic variations across different ethnic groups were not assessed. Finally, the observational nature of our study limits causal inferences. Although we identified associations between IFN-γ polymorphisms and serological outcomes, experimental studies or longitudinal assessments with repeated immune profiling could help establish causal relationships between genetic predisposition and serofast status.

5 Conclusions

The results of our study introduce a new, previously unexplored direction in research on the phenomenon of serofast state syphilis. The current literature contains a few studies on the polymorphisms of the IFN-γ gene in the pathogenesis of various diseases—primarily viral and bacterial – but to our best knowledge, our study is the first to address the impact of IFN-γ gene polymorphisms in the context of the

10.3389/fimmu.2025.1602527

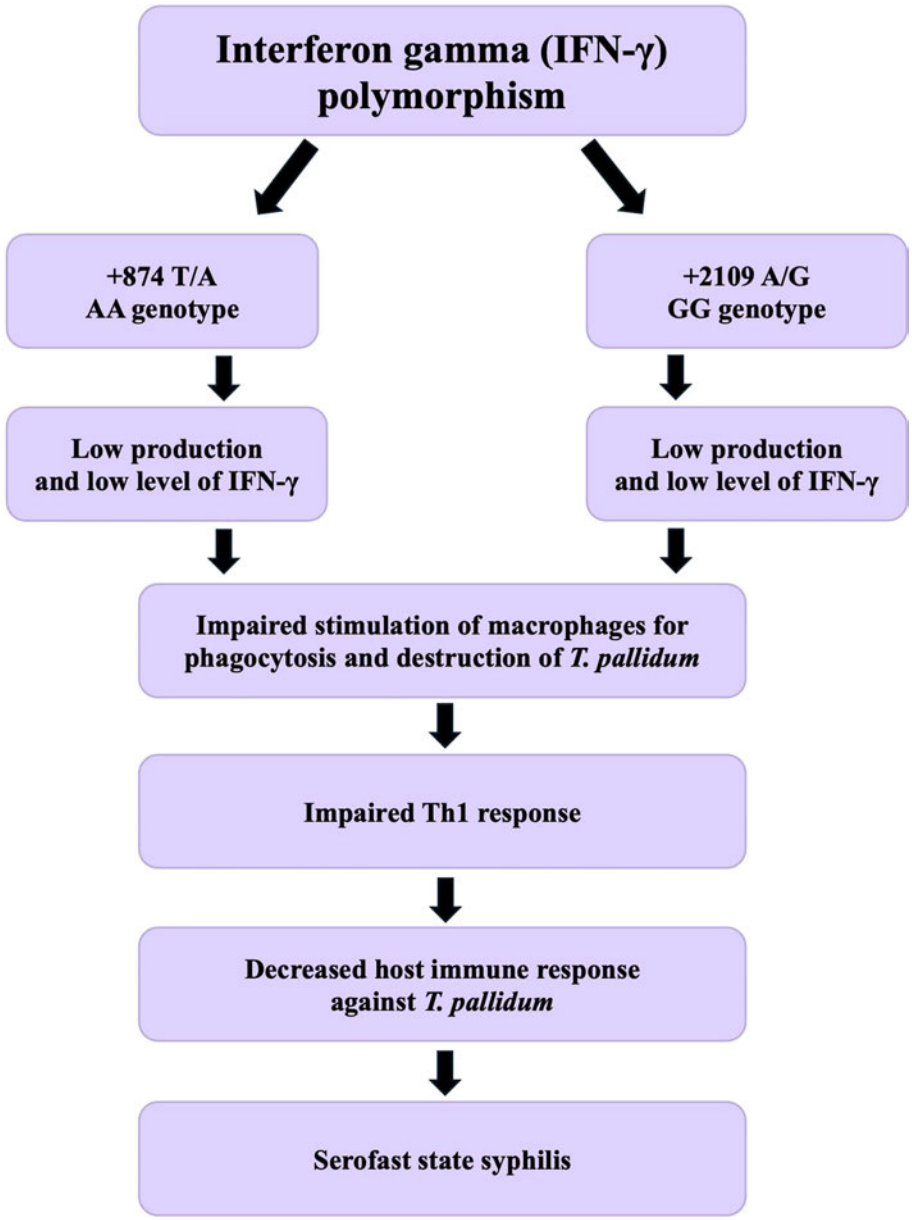


FIGURE 3
Hypothetical mechanism linking IFN γ gene polymorphisms to serofast state after syphilis treatment.

immune response to *T. pallidum* infection, the persistence of infection, and the occurrence of the serofast state in syphilis. We demonstrated that the +874 T>A and +2109 A>G polymorphisms, involved in many diseases, also influence IFN-γ production in patients with syphilis.

The results of our study indicate a significant role for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IFN-γ gene and their haplotypes in modulating the immune response in syphilis patients. Our findings suggest that the +874 T>A and +2109 A>G polymorphisms in the IFN-γ gene, as well as the haplotypes associated with them, may influence IFN-γ production levels. We demonstrated that the AA genotype (+874 T>A) and GG genotype (+2109 A>G) were statistically significantly associated with lower serum concentrations of IFN-γ and were linked to the group of patients who develop the serofast state after early syphilis treatment.

These polymorphisms, by reducing IFN-γ production, which is one of the main mediators in the cellular response to *T. pallidum* infection, may result in low serum levels of this cytokine in patients. Consequently, this may contribute to incomplete tissue eradication of the bacteria, prolongation of inflammation, and the occurrence of serological resistance after syphilis treatment. Our observation suggests that these polymorphisms are a genetic risk factor for the development of the serofast state.

The analysis of these polymorphisms may be useful in assessing the risk of serofast status in syphilis patients. These polymorphisms

could become prognostic biomarkers, enabling the personalization of diagnostic and therapeutic approaches in the future.

Further studies on larger patient groups are necessary to validate our findings and to assess the significance of genetic and immunological factors in the development of the serofast state. In the future, it may be possible to harness the therapeutic potential of modulating pathways associated with IFN-γ in individuals who develop the serofast state.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Jagiellonian University Bioethics Committee (approval number KBet/164/B) and by the Medical University of Silesia Bioethics Committee (approval number BNW/NWN/0052/KB1/13/I/24). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

KK: Methodology, Writing – review & editing, Formal analysis, Software, Investigation, Writing – original draft, Visualization, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Resources, Project administration. MK: Writing – original draft, Resources, Writing – review & editing, Investigation. MP: Writing – review & editing, Conceptualization, Software, Writing – original draft, Validation, Supervision, Methodology.

Funding

The author(s) declare that financial support was received for the research and/or publication of this article. KK was supported by NAWA, The Polish National Agency for Academic Exchange, in cooperation with the Medical Research Agency under the Walczak Program, grant number BPN/WAL/2023/1/00033.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Generative AI statement

The author(s) declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

1. Workowski KA, Berman S, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep*. (2010) 59:1–110.

2. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep*. (2015) 64:1–137.

3. Pastuszczak M, Gozdzialska A, Jakiela B, Obtulowicz A, Jaskiewicz J, Wojas-Pelc A. Robust pro-inflammatory immune response is associated with serological cure in patients with syphilis: an observational study. *Sex Transm Infect*. (2017) 93:11–4. doi: 10.1136/sextrans-2016-052681

4. Pastuszczak M, Jakiela B, Wojas-Pelc A. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with serofast state after syphilis treatment. *Sex Transm Infect*. (2019) 95:163–8. doi: 10.1136/sextrans-2018-053753

5. Zhang RC, Zheng NN, Zhong LS. Association of TNF-α -308 G>A gene polymorphism with serofast in patients with syphilis. *Australas J Dermatol*. (2021) 62:e294–6. doi: 10.1111/ajd.13481

6. Esparza Guerrero Y, Vazquez Villegas ML, Nava Valdivia CA, Ponce Guarneros JM, Perez Guerrero EE, Gomez Ramirez EE, et al. Association of the STAT4 gene rs7574865 polymorphism with IFN-γ Levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Genes*. (2023) 14:537. doi: 10.3390/genes14030537

7. de Sarges KML, Póvoa da Costa F, Santos EFD, Cantanhede MHD, da Silva R, Veríssimo ADOL, et al. Association of the IFNG +874T/A polymorphism with symptomatic COVID-19 susceptibility. *Viruses*. (2024) 16:650. doi: 10.3390/v16040650

8. Rolandelli A, Pellegrini JM, Amiano NO, Santilli MC, Morelli MP, Castello FA, et al. The IFNG rs1861494 Single Nucleotide Polymorphism Is Associated with Protection against Tuberculosis Disease in Argentina. *Genes (Basel)*. (2018) 9:46. doi: 10.3390/genes9010046

9. Gao J, Wei L, Liu X, Wang L, Niu D, Jin T, et al. Association between IFN-γ Gene polymorphisms and igA nephropathy in a chinese han population. *Kidney Blood Press Res*. (2017) 42:136–44. doi: 10.1159/000473889

10. Zheng M, Li J, Fang W, Luo L, Ding R, Zeng H, et al. The TNF-α rs361525 and IFN-γ rs2430561 polymorphisms are associated with liver cirrhosis risk: a comprehensive meta-analysis. *Front Immunol*. (2023) 14:1129767. doi: 10.3389/fimmu.2023.1129767

11. Ahmed AA, Rasheed Z, Salem T, Al-Dhubaibi MS, Al Robaee AA, Alzolibani AA, et al. TNF-α -308 G/A and IFN-γ +874 A/T gene polymorphisms in Saudi patients with cutaneous leishmaniasis. *BMC Med Genet*. (2020) 21:104. doi: 10.1186/s12881-020-01043-9

12. Dondeti MF, Abdelkhalek MS, El-Din Elezawy HM, Alsanie WF, Raafat BM, Gamal-Eldeen AM, et al. Association between interferon-gamma (IFN-γ) gene polymorphisms (+874A/T and +2109A/G), and susceptibility to hepatitis B viral infection (HBV). *J Appl Biomed*. (2022) 20:37–43. doi: 10.32725/jab.2022.001

13. Chevillard C, Moukoko CE, Elwali NE, Bream JH, Kouriba B, Argiro L, et al. IFN-gamma polymorphisms (IFN-gamma +2109 and IFN-gamma +3810) are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis

(Schistosoma mansoni). *J Immunol*. (2003) 171:5596–601. doi: 10.4049/jimmunol.171.10.5596

14. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, et al. Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. *MMWR Recomm Rep*. (2021) 70:1–187. doi: 10.15585/mmwr.rr7004a1

15. Pastuszczak M, Wojas-Pelc A. Current standards for diagnosis and treatment of syphilis: selection of some practical issues, based on the European (IUSTI) and U.S. (CDC) guidelines. *Postepy Dermatol Alergol*. (2013) 30:203–10. doi: 10.5114/pdia.2013.37029

16. Seña AC, Zhang XH, Li T, Zheng HP, Yang B, Yang LG, et al. A systematic review of syphilis serological treatment outcomes in HIV-infected and HIV-uninfected persons: rethinking the significance of serological non-responsiveness and the serofast state after therapy. *BMC Infect Dis*. (2015) 15:479. doi: 10.1186/s12879-015-1209-0

17. Kaminiów K, Kiołbasa M, Pastuszczak M. The significance of the cell-mediated host immune response in syphilis. *Microorganisms*. (2024) 12:2580. doi: 10.3390/microorganisms12122580

18. Leader BT, Godornes C, VanVoorhis WC, Lukehart SA. CD4+ lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis. *Infect Immun*. (2007) 75:3021–6. doi: 10.1128/IAI.01973-06

19. Van Voorhis WC, Barrett LK, Koelle DM, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines. *J Infect Dis*. (1996) 173:491–5. doi: 10.1093/infdis/173.2.491

20. Hernández-Pliego A, Vergara-Ortega DN, Herrera-Ortíz A, Toledano-Jaimes C, Esquivel-Guadarrama FR, Sánchez-Alemán MÁ, et al. IL-10 and IL-17 as progression markers of syphilis in people living with HIV: A systematic review. *Biomolecules*. (2022) 12:1472. doi: 10.3390/biom12101472

21. Li W, Wu W, Chang H, Jiang M, Gao J, Xu Y, et al. Cerebrospinal fluid cytokines in patients with neurosyphilis: the significance of interleukin-10 for the disease. *BioMed Res Int*. (2020) 2020:3812671. doi: 10.1155/2020/3812671

22. Hawley KL, Cruz AR, Benjamin SJ, La Vake CJ, Cervantes JL, LeDoyt M, et al. IFNγ Enhances CD64-potentiated phagocytosis of treponema pallidum opsonized with human syphilitic serum by human macrophages. *Front Immunol*. (2017) 8:1227. doi: 10.3389/fimmu.2017.01227

23. Li J, Wang LN, Zheng HY. Predictors of serological cure and serofast state after treatment in HIV-negative patients with early syphilis in China. *Sex Transm Infect*. (2013) 89:69. doi: 10.1136/sextrans-2012-050711

24. Sun Y, Lu Y, Li T, Xie L, Deng Y, Li S, et al. Interferon gamma +874T/A polymorphism increases the risk of hepatitis virus-related diseases: evidence from a meta-analysis. *PloS One*. (2015) 10:e0121168. doi: 10.1371/journal.pone.0121168

25. Peresi E, Oliveira LR, da Silva WL, da Costa EA, Araujo JP Jr, Ayres JA, et al. Cytokine polymorphisms. Their influence and levels in Brazilian patients with pulmonary tuberculosis during antituberculosis treatment. *Tuberc Res Treat*. (2013) 2013:285094. doi: 10.1155/2013/285094

26. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol*. (2000) 61:863–6. doi: 10.1016/s0198-8859(00)00167-1

27. Henri S, Stefani F, Parzy D, Eboumbou C, Dessein A, Chevillard C. Description of three new polymorphisms in the intronic and 3'UTR regions of the human interferon gamma gene. *Genes Immun*. (2002) 3:1–4. doi: 10.1038/sj.gene.6363809

28. Schena FP, Cerullo G, Torres DD, Scolari F, Foramitti M, Amoroso A, et al. Role of interferon-gamma gene polymorphisms in susceptibility to IgA nephropathy: a family-based association study. *Eur J Hum Genet*. (2006) 14:488–96. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201591

29. Wani BA, Shehjar F, Shah S, Koul A, Yusuf A, Murtaza M, et al. Association of IFN-gamma and IL-10 gene variants with the risk of extrapulmonary tuberculosis. *Saudi J Biol Sci*. (2021) 28:4210–6. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.06.029

30. Sousa-Vasconcelos PS, Seguins WS, Luz ES, Pinho RT. Pattern of cytokine and chemokine production by THP-1 derived macrophages in response to live or heat-killed Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin Moreau strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2015) 110:809–13. doi: 10.1590/0074-02760140420

31. Wei Z, Wenhao S, Yuanyuan M, Yang L, Daming Z, Jiangchun X, et al. A single nucleotide polymorphism in the interferon-γ gene (IFNG +874 T/A) is associated with susceptibility to tuberculosis. *Oncotarget*. (2017) 8:50415–29. doi: 10.18632/oncotarget.17304

32. Liu HY, Han Y, Chen XS, Bai L, Guo SP, Li L, et al. Comparison of efficacy of treatments for early syphilis: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies. *PloS One*. (2017) 12:e0180001. doi: 10.1371/journal.pone.0180001

33. Sun J, Shigemi H, Tanaka Y, Yamauchi T, Ueda T, Iwasaki H. Tetracyclines downregulate the production of LPS-induced cytokines and chemokines in THP-1 cells via ERK, p38, and nuclear factor-κB signaling pathways. *Biochem Biophys Rep*. (2015) 4:397–404. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.11.003

34. Di Caprio R, Lembo S, Di Costanzo L, Balato A, Monfrecola G. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an *in vitro* study. *Mediators Inflamm*. (2015) 2015:329418. doi: 10.1155/2015/329418

35. Orylska-Ratynska M, Placek W, Owczarczyk-Saczonek A. Tetracyclines—An important therapeutic tool for dermatologists. *Int J Environ Res Public Health*. (2022) 19:7246. doi: 10.3390/ijerph19127246

36. Moore LJ, Pridmore AC, Lee ME, Read RC. Induction of pro-inflammatory cytokine release by human macrophages during exposure of Streptococcus pneumoniae to penicillin is influenced by minimum inhibitory concentration ratio. *Int J Antimicrob Agents*. (2005) 26:188–96. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.06.006

37. Wolf AJ, Liu GY, Underhill DM. Inflammatory properties of antibiotic-treated bacteria. *J Leukoc Biol*. (2017) 101:127–34. doi: 10.1189/jlb.4MR0316-153RR

38. Gross JL, Basu R, Bradfield CJ, Sun J, John SP, Das S, et al. Bactericidal antibiotic treatment induces damaging inflammation via TLR9 sensing of bacterial DNA. *Nat Commun*. (2024) 15:10359. doi: 10.1038/s41467-024-54497-3

frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 27 March 2026
DOI 10.3389/fimmu.2026.1792505

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Peter Kraiczy,
Goethe University Frankfurt, Germany

REVIEWED BY
Lorenzo Giacani,
University of Washington, United States
Corrado Zengarini,
University of Bologna, Italy

*CORRESPONDENCE
Konrad Kaminiów
kaminiow.k@gmail.com

RECEIVED 20 January 2026
REVISED 14 March 2026
ACCEPTED 16 March 2026
PUBLISHED 27 March 2026

CITATION
Kaminiów K, Kiołbasa M, Napiórkowska Baran K and Pastuszczak M (2026) Cytotoxic T cell deficiency and sustained B cell activation in serofast syphilis: a prospective observational study.
Front. Immunol. 17:1792505.
doi: 10.3389/fimmu.2026.1792505

COPYRIGHT
© 2026 Kaminiów, Kiołbasa, Napiórkowska Baran and Pastuszczak. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Cytotoxic T-cell deficiency and sustained B-cell activation in serofast syphilis: a prospective observational study

Konrad Kaminiów[1*], Martyna Kiołbasa[1], Katarzyna Napiórkowska-Baran[1,2] and Maciej Pastuszczak[1]

[1]Clinical Department of Dermatology in Zabrze, Medical University of Silesia, Katowice, Poland, [2]Department of Allergology, Clinical Immunology and Internal Diseases, Collegium Medicum Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University Toruń, Toruń, Poland

Introduction: The serofast state, defined by persistent non-treponemal reactivity after adequate therapy for syphilis, remains a clinically relevant yet poorly understood condition. Whether serofast reflects residual infection or persistent immune activation remains uncertain. We aimed to characterize peripheral blood lymphocyte subpopulations and anticardiolipin antibodies in patients with serofast syphilis and compare them with individuals achieving a serological cure.

Methods: We conducted a prospective observational study including adults with early syphilis treated with benzathine penicillin G. Peripheral blood samples were collected at baseline and six months post-treatment for immunophenotyping and antiphospholipid antibody assessment. Serological outcome was defined by Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) response (serofast vs. serologically cured). Twelve healthy volunteers served as controls for anticardiolipin antibody testing.

Results: Among 41 included patients, 9 (22%) developed a serofast state. Serofast patients demonstrated significantly lower baseline numbers of cytotoxic T lymphocytes ($CD8^+$ and $CD3^+$) compared with serologically cured individuals, a difference that persisted after treatment (all $p<0.05$). Six months post-treatment, serofast patients showed higher B-cell counts ($p<0.05$). Low-level anticardiolipin IgG and IgM were detectable in nearly all patients before treatment but had become undetectable in all participants at six months, while all healthy controls tested negative. No thrombotic events were observed.

Discussion: Serofast syphilis was associated with reduced cytotoxic T-cell counts and persistent B-cell activation, supporting a model in which impaired cytotoxic clearance of antigen-presenting cells may prolong antibody production despite microbiological cure. The transient nature of infection-induced anticardiolipin antibodies further argues against persistent autoimmunity. These findings provide mechanistic insight into serofast responses and suggest potential immunological determinants of post-treatment serological persistence.

KEYWORDS
adaptive immunity, anticardiolipin antibodies, B-cell activation, cytotoxic T cells, host–pathogen interaction, immune dysregulation, *Treponema pallidum*

1 Introduction

Syphilis remains a major global sexually transmitted infection despite the availability of effective antimicrobial therapy. Current international guidelines consistently recommend long-acting benzathine penicillin G as the first-line and gold-standard treatment for all stages of syphilis, including early disease (1, 2). Treatment success is typically defined by clinical resolution of symptoms together with a serological response, characterized as at least a fourfold (two-dilution) decline in non-treponemal test titers such as VDRL or RPR within 6–12 months following therapy for early syphilis (3, 4).

Despite the absence of confirmed penicillin resistance in *Treponema pallidum*, numerous cohort studies and a systematic review have shown that many of appropriately treated patients fail to reach this expected serological decline (5–8). This so-called "serofast" state - persistent low non-treponemal titers not meeting criteria for either serological cure or treatment failure - has been observed in approximately 20–30% of patients, particularly in certain clinical or epidemiological subgroups (3, 5). The mechanisms underlying serofast remain unclear. It is still debated whether persistent titers reflect the continued presence of viable organisms or a dysregulated, prolonged host immune response with ongoing antibody production in the absence of active infection (9–11). This uncertainty is clinically relevant, as current guidelines provide limited and sometimes inconsistent recommendations regarding the management of patients who remain serofast after standard therapy (12). Another immunological feature historically associated with syphilis is the presence of antiphospholipid antibodies, particularly anticardiolipin antibodies (aCL). Infection-related aCL are generally transient, often β2-glycoprotein I - independent, and usually non-thrombogenic, distinguishing them from the persistent, β2-glycoprotein I - dependent antibodies characteristic of antiphospholipid syndrome (13, 14). However, contemporary data on the dynamics of aCL in early syphilis after penicillin therapy, and their relationship to serological treatment outcomes, remain limited.

Few studies have examined peripheral blood lymphocyte subsets in patients with serofast syphilis, and their findings have been inconsistent. Some reports describe alterations in T- and B-cell distributions or shifts toward enhanced humoral activity, whereas others do not confirm reproducible differences (15, 16). Emerging molecular data, including miRNA-based analyses, further suggest potential immune dysregulation, although these observations remain preliminary and are derived from small patient cohorts (17). Recent studies have also begun to explore the role of innate and cellular immune responses, including natural killer cell activity and T-cell–mediated pathways, in shaping serological outcomes in syphilis, although the available data remain limited and sometimes conflicting (9, 16, 18). Overall, available evidence is limited and inconclusive, underscoring the need for more comprehensive immunological characterization of serofast patients (5).

In this study, we aimed to address these gaps by performing a detailed longitudinal analysis of peripheral blood lymphocyte subpopulations and anticardiolipin antibodies in patients with early syphilis, assessed both before and after standard penicillin therapy. We compared individuals who developed a serofast state with those who achieved serological cure to identify immune correlates of serofast and to characterize the dynamics of aCL following treatment in this context.

2 Materials and methods

2.1 Study design

We performed a prospective observational study between 2024 and 2025 at the Clinical Department of Dermatology in Zabrze, Medical University of Silesia (Poland). All consecutive adults with newly diagnosed early syphilis who met inclusion/exclusion criteria were invited to participate. All consecutive eligible patients presenting during the study period were included. Because the study was designed as an exploratory prospective analysis, no formal *a priori* sample size calculation was performed. In addition, a convenience sample of healthy volunteers without a history of syphilis or autoimmune disease and with negative treponemal and non-treponemal tests was included as a control group for antiphospholipid antibody assessment. The healthy control group was included solely for reference measurements of antiphospholipid antibodies. No additional selection procedures applied. The study protocol was approved by the institutional ethics committee (BNW/NWN/0052/KB1/21/I/24), and written informed consent was obtained from each participant.

2.2 Eligibility criteria and clinical assessment

Participants were eligible if ≥18 years old with early syphilis (secondary or early-latent stage), based on CDC criteria (clinical presentation, exposure history, serology). Early latent syphilis was diagnosed when both treponemal and non-treponemal tests were reactive in the absence of clinical signs, provided that there was evidence of acquisition within the preceding 12 months, defined as (i) documented seroconversion after previously negative serologic tests, (ii) a sustained fourfold increase in non-treponemal titers, (iii) clinical symptoms consistent with primary or secondary syphilis during the past year, or (iv) a recent sexual exposure considered to be of high risk.

Exclusion criteria comprised: previous antimicrobial or immunosuppressive therapy within 6 months, HIV infection, chronic inflammatory or autoimmune disorders, and current anticoagulant/antiplatelet use (≥6 weeks before enrollment).

All patients received benzathine penicillin G 2.4 million units intramuscularly, administered at our clinical center under direct medical supervision in accordance with current guidelines, ensuring full treatment adherence. Baseline demographic and clinical data (age, sex, disease stage) were recorded at study entry.

2.3 Definition of serological outcome

Serological response was evaluated 6 months after treatment, corresponding to the time point of repeat immunological

assessment. Patients were classified into two categories based on VDRL titer change (Table 1): (1) serofast – less than a fourfold decline in VDRL titer compared with baseline; and (2) serologically cured – at least a fourfold decline in VDRL titer. This definition follows criteria proposed by Sena et al. (5). Patients classified as serofast could exhibit either stable titers or minor fluctuations that did not reach the fourfold decline required to define serological cure. Clinical and serological follow-up continued up to 12 months, during which non-treponemal titers in serofast patients remained stable.

2.4 Blood sampling

Peripheral venous blood was collected at two time-points: before treatment (baseline) and six months after completion of therapy. Blood for serological and immunological analyses drawn into 3.2% sodium citrate tubes (9:1 blood-to-anticoagulant). Platelet-poor plasma prepared by double centrifugation (<10×10^9/L) and stored at −80 °C if immediate analysis was not possible. In healthy controls, aCL IgG and IgM were measured using the same sampling procedure and laboratory assays.

2.5 Immunological assays

2.5.1 Antiphospholipid antibodies

IgG and IgM anticardiolipin (aCL) and anti-β_2-glycoprotein I (anti-β_2GPI) antibodies were quantified using commercially available ELISAs (QUANTA Lite®, Inova Diagnostics/Diasorin). Results were expressed in GPL, MPL or standardized SGU/SMU units. Positivity was defined as ≥40 GPL/MPL or above the 99th percentile according to international criteria. Antibody measurements were performed at baseline and 6 months post-treatment.

2.5.2 Lymphocyte subpopulation analysis

Peripheral blood lymphocyte subsets were determined in EDTA-anticoagulated whole blood using multicolor flow cytometry (e.g., FACSCanto II, BD Biosciences). The following monoclonal antibody panels were used for identification: T cells (CD3+), CD4+ helper T cells (CD3+CD4+), CD8+ cytotoxic T cells (CD3+CD8+), double-positive T cells (CD3+CD4+CD8+), B cells (CD19+), NK cells (CD3-CD56+), NKT cells (CD3+CD56+).

Absolute cell counts were obtained by dual-platform analysis using simultaneous complete blood count measurements. Data were processed using dedicated flow cytometry software (FACSDiva).

2.6 Syphilis serology

Non-treponemal testing was carried out with the VDRL assay (BD Macro-Vue™), and titers were determined by serial twofold dilutions. Treponema pallidum hemagglutination assay (TPHA, Serodia®, Fujirebio/Bio-Rad) was performed according to the manufacturer's instructions. Only patients with concordant reactivity in both assays were included.

2.7 Statistical analysis

Continuous variables are presented as medians and minimum–maximum values, whereas categorical variables are expressed as counts and percentages. Between-group comparisons (serofast vs. serologically cured) were performed using the Mann–Whitney U test for continuous variables and the χ^2 test (or Fisher's exact test, where appropriate) for categorical variables. Pre/post-treatment values were compared using paired non-parametric tests if applicable. A two-sided p value <0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were conducted using Statistica, version 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

3 Results

3.1 Study population

A total of 41 patients with early syphilis were included, of whom 9 (22%) developed a serofast state and 32 (78%) achieved a serological cure. Twelve healthy controls were additionally examined for antiphospholipid antibody assessment, all of whom had negative treponemal and non-treponemal tests. Baseline demographic and clinical characteristics, including age, sex and disease stage, were comparable between the serofast and non-serofast groups (Table 1). No significant differences were observed in baseline VDRL titers, hemoglobin concentration, erythrocyte count, platelet count, or complement components C3 and C4 (all p>0.05). Baseline leukocyte subpopulations were generally similar, except for lower lymphocyte and basophil counts in the serofast group (p=0.04 and p=0.04, respectively).

3.2 Posttreatment hematological and biochemical parameters

At six months, most clinical and routine laboratory parameters remained comparable between groups (Table 1). Patients with serofast demonstrated higher monocyte counts (p=0.007) and lower basophil counts (p=0.04) compared with non-serofast individuals, whereas differences in other leukocyte subsets were not statistically significant.

3.3 Lymphocyte subpopulations

At baseline, patients who subsequently developed a serofast state exhibited lower absolute counts of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells compared with the non-serofast group (p=0.00009, p=0.02 and p=0.01, respectively) (Table 2). Baseline B-cell counts were conversely higher among serofast patients (p=0.002). These differences in key lymphocyte subsets are illustrated in Figure 1.

Baseline double-positive $CD4^+CD8^+$ T cells were also reduced in the serofast group (p=0.04), whereas NKT cells showed a non-significant trend towards higher values (p=0.08).

After treatment, most lymphocyte subsets no longer differed between groups (all p>0.05), except for $CD4^+CD8^+$ T cells, which

10.3389/fimmu.2026.1792505

TABLE 1 Baseline and posttreatment clinical and laboratory characteristics of serofast and non-serofast patients.

Clinical and laboratory characteristics	Serofast group; n=9	Non-serofast group; n=32	p value
Females; n (%)	2 (22.2)	7 (21.9)	1.0
Age; years	31.5 (28.0-45.0)	34.0 (22.0-69.0)	0.2
secondary syphilis; n (%)	6 (66.7)	20 (62.5)	0.91
early latent syphilis; n (%)	3 (33.3)	12 (37.5)	0.87
baseline VDRL	64 (8-128)	64 (2-256)	0.44
baseline Hb concentration; d/dL	14.1 (12.7-16.7)	14.7 (11.6-17.9)	0.97
baseline erythrocytes count; $x10^6$/uL	5.08 (4.4-5.4)	5.04 (3.8-5.6)	0.98
baseline leukocytes count; $x10^3$/uL	6.7 (4.2-10.7)	7.0 (3.8-9.0)	0.74
baseline lymphocytes count; $x10^3$/uL	1.3 (0.6-1.8)	1.6 (0.9-2.8)	0.04
baseline neutrophils count; $x10^3$/uL	5.1 (2.1-8.1)	4.5 (2.1-6.8)	0.78
baseline eosinophils count; $x10^3$/uL	0.08 (0.01-0.2)	0.09 (0.03-0.5)	0.67
baseline monocytes count; $x10^3$/uL	0.5 (0.3-1.1)	0.56 (0.2-0.9)	0.89
baseline basophils count; $x10^3$/uL	0.02 (0.01-0.03)	0.03 (0.01-0.06)	0.04
baseline platelets count; $x10^3$/uL	260.5 (207.0-340.0)	259.0 (149.0-460.0)	0.77
baseline CRP levels; mg/dL	2.5 (1.3-33.0)	6.2 (0.00-23.4)	0.58
baseline C3 levels; mg/dL	1.3 (1.1-1.5)	1.3 (0.9-1.6)	0.85
baseline C4 levels; mg/dL	0.2 (0.1-0.35)	0.2 (0.1-0.5)	0.8
posttreatment VDRL	64 (8-128)	4.00 (0.00-16.00)	0.00004
posttreatment Hb concentration; d/dL	14.7 (12.9-17.2)	15.3 (13.0-17.5)	0.85
posttreatment erythrocytes count; $x10^6$/uL	5.07 (4.5-5.7)	5.02 (4.1-5.8)	0.79
posttreatment leukocytes count; $x10^3$/uL	7.2 (4.1-11.0)	6.2 (3.5-8.5)	0.13
posttreatment lymphocytes count; $x10^3$/uL	1.95 (1.6-2.2)	1.9 (1.2-3.1)	0.82
posttreatment neutrophils count; $x10^3$/uL	4.3 (1.7-7.9)	3.5 (1.9-5.7)	0.22
posttreatment eosinophils count; $x10^3$/uL	0.17 (0.12-0.27)	0.1 (0.03-0.4)	0.05
posttreatment monocytes count; $x10^3$/uL	0.75 (0.53-1.21)	0.52 (0.21-0.73)	0.007
posttreatment basophils count; $x10^3$/uL	0.02 (0.01-0.03)	0.03 (0.01-0.06)	0.04
posttreatment platelets count; $x10^3$/uL	267.0 (210.0-323.0)	248.0 (137.0-350.0)	0.56
posttreatment CRP levels; mg/dL	1.95 (0.00-3.5)	0.98 (0.00-22.6)	1.0
posttreatment C3 levels; mg/dL	1.1 (0.96-1.4)	1.2 (0.92-1.42)	0.95
posttreatment C4 levels; mg/dL	0.28 (0.14-0.29)	0.2 (0.09-0.4)	0.27

Data are given as median (min max) or otherwise stated.
VDRL, Venereal Disease Research Laboratory test; Hb, Hemoglobin; CRP, C reactive protein.

remained lower in the serofast group (p=0.02), and B cells, which were higher compared with non-serofast patients (p=0.01).

3.4 Anticardiolipin antibodies

At baseline, low-level aCL IgM and IgG were detectable in most of patients in both groups, although median titers remained below the laboratory cut-off for positivity. By contrast, aCL IgG and IgM were undetectable in all 12 healthy controls. There were no significant differences between serofast and non-serofast patients (p = 0.95 and p = 0.92, respectively). Anti-β_2GPI concentrations were likewise low and comparable between groups (p = 0.89) (Table 2). After treatment, aCL IgM and IgG titers showed a pronounced decline and became undetectable in almost all patients, again with no differences between serofast and non-serofast individuals (p = 0.98 and p = 0.67, respectively). Posttreatment anti-β_2GPI levels remained similar across groups (p = 0.83) (Table 2). The uniform decrease in aCL titers is illustrated by the waterfall plots (Figure 2), where virtually all patients demonstrated a negative Δ (posttreatment – baseline), with median changes below zero in both IgM and IgG panels.

4 Discussion

The serofast state following adequate treatment for early syphilis is a long-recognized yet unresolved clinical issue. Despite clinical cure and clinical resolution, up to 20–30% of patients do not achieve a fourfold decline in non-treponemal antibody titers within the expected 6–12

10.3389/fimmu.2026.1792505

TABLE 2 Baseline and posttreatment immunological parameters in serofast and non-serofast patients.

Parameters	Serofast group; n=9	Non-serofast group; n=32	p-value
Age; years	31.5 (28.0-45.0)	34.0 (22.0-69.0)	0.2
baseline CD3+ T cells/uL	876.0 (435.0-1079.0)	1180.0 (665.0-2137.0)	0.00009
baseline CD4+ T cells/uL	430.5 (213.0-726.0)	612.0 (289.0-1173.0)	0.02
baseline CD8+ T cells/uL	285.0 (134.0-399.0)	432.0 (181.0-1348.0)	0.01
baseline CD4+CD8+ T cells/uL	0.40 (0.30-0.50)	0.50 (0.20-1.30)	0.04
baseline CD4/CD8 ratio	1.75 (0.50-2.80)	1.40 (0.20-4.10)	0.89
baseline NK cells/uL	158.0 (51.0-592.0)	173.5 (83.0-465.0)	0.61
baseline NKT cells/uL	5.9 (2.8-16.0)	3.55 (0.9-14.5)	0.08
baseline B cells/uL	356.0 (246.0-606.0)	215.0 (72.0-582.0)	0.002
baseline aCL IgM; U/mL	22.86 (0.00-67.51)	10.19 (0.00-120.00)	0.95
baseline aCL IgG; U/mL	17.48 (0.00-61.66)	11.46 (0.00-120.00)	0.92
baseline anti-β2GPI; U/mL	2.61 (2-4.2)	2.58 (2-3.8)	0.89
posttreatment CD3+ T cells/uL	1143.0 (984.0-1594.0)	1296.0 (826.0-3066.0)	0.49
posttreatment CD4+ T cells/uL	582.0 (465.0-1081.0)	680.0 (395.0-1924.0)	0.61
posttreatment CD8+ T; cells/uL	347.0 (290.0-582.0)	432.0 (215.0-1554.0)	0.49
posttreatment CD4+CD8+ T cells/uL	0.4 (0.2-0.4)	0.4 (0.4-0.7)	0.02
posttreatment CD4/CD8 ratio	1.6 (1.0-2.8)	1.5 (0.4-4.0)	0.54
posttreatment NK cells/uL	403.0 (175.0-745.0)	236.0 (139.0-630.0)	0.15
posttreatment NKT cells/uL	4.8 (3.1-6.5)	2.7 (0.2-17.4)	0.12
posttreatment B cells/uL	380.0 (197.0-497.0)	235.0 (118.0-584.0)	0.01
posttreatment aCL IgM; U/mL	0.00 (0.00-6.72)	0.00 (0.00-14.00)	0.98
posttreatment aCL IgG; U/mL	0.00 (0.00-6.16)	0.00 (0.00-5.37)	0.67
posttreatment anti-β2GPI; U/mL	2.78 (2-3.7)	2.58 (2-4.1)	0.83

Data are given as median (min max) or otherwise stated.
NK cells, Natural killer cells; NKT cells, Natural killer T cells; aCL, Anticardiolipin antibodies; anti β2GPI, Anti beta 2 glycoprotein I antibodies.

months, creating uncertainty regarding persistent infection versus sustained humoral activation. Recent reports highlight that the mechanisms underlying serofast remain insufficiently understood and may differ between individuals (3, 19). Importantly, extending penicillin treatment does not consistently improve the serological response in serofast patients, suggesting that persistent non-treponemal reactivity is unlikely to reflect ongoing bacterial replication, but rather represents a state of prolonged antibody production despite pathogen clearance (20, 21).

In the present study, we provide new evidence indicating that individuals who subsequently developed a serofast state displayed, already at baseline, significantly lower numbers of cytotoxic T lymphocytes ($CD8^+$ as well as $CD3^+$) compared with those who achieved conventional serological cure. This deficiency persisted six months after treatment. These findings support the hypothesis that the ability to mount an adequate cytotoxic T-cell response early during infection may influence subsequent serological evolution. To our knowledge, this is the first prospective study linking quantitative cytotoxic T-cell disturbance with serofast outcome.

From an immunological perspective, cytotoxic T lymphocytes constitute a major effector arm of cell-mediated immunity and are crucial for controlling intracellular pathogens through cytolytic mechanisms and cytokine release, notably IFN-γ and TNF-α, which activate macrophages (10, 22, 23). Although *Treponema pallidum* is generally regarded as an extracellular organism, several studies suggest that partial intracellular residence, antigen uptake by professional antigen-presenting cells, and cross-presentation on MHC class I may engage cytotoxic pathways (23–25). In this context, reduced cytotoxic T-cell availability or responsiveness could impair efficient elimination of antigen-presenting cells (APCs) loaded with treponemal antigens, allowing prolonged antigen presentation to B cells. In clinical terms, these observations raise the possibility that, in the absence of antibiotic therapy, individuals with poorer cytotoxic T-cell responses might struggle to clear the pathogen spontaneously.

In our cohort, the higher B-cell counts observed six months after therapy in serofast individuals further support a scenario of prolonged antigen-driven stimulation. Given that penicillin effectively eradicates viable *T. pallidum*, sustained non-treponemal antibodies in serofast patients are more likely attributable to ongoing immune activation rather than occult infection. One mechanistic explanation is that incomplete clearance of APCs presenting treponemal antigens could maintain B-cell activation and antibody secretion despite microbiological cure. Although this interpretation remains speculative and was not directly tested in our study, it is consistent with current concepts linking cytotoxic T-cell function with regulation of antigen presentation and downstream B-cell activation. This concept places cytotoxic T-cell competence as a potential immunological determinant of serofast.

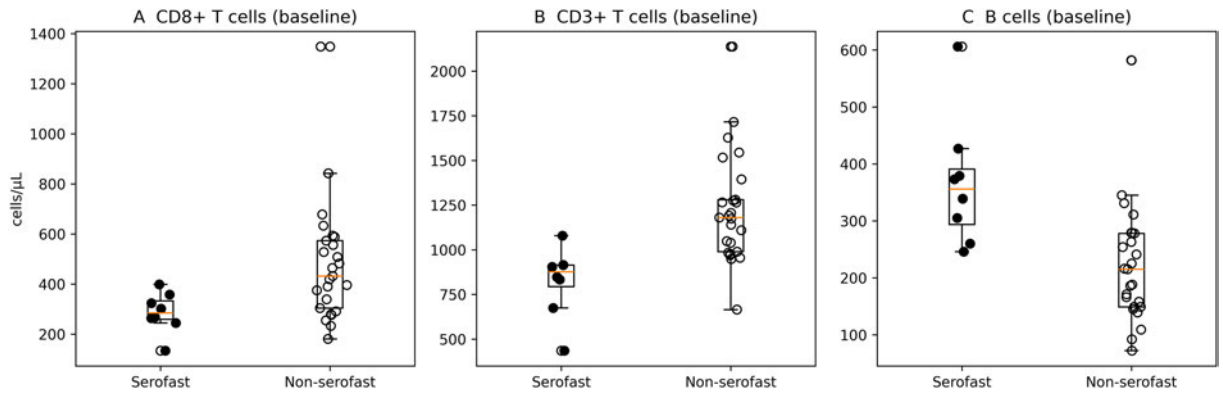


FIGURE 1
Baseline lymphocyte subsets in serofast and serologically cured patients.Box plots with individual data points illustrating baseline counts of **(A)** $CD8^+$ T cells, **(B)** $CD3^+$ T cells, and **(C)** B cells in patients who subsequently developed a serofast state and those who achieved serological cure. Boxes represent the interquartile range, horizontal lines indicate the median, filled circles represent serofast patients, and open circles represent non serofast patients.

The detection of antiphospholipid antibodies (aPL), particularly anticardiolipin antibodies (aCL), provides an additional window into immune activation in syphilis. aPL constitute a heterogeneous family of autoantibodies directed against phospholipids or phospholipid-binding proteins, and their persistent presence - especially anti-β_2-glycoprotein I - is pathognomonic for the antiphospholipid syndrome (APS), a prothrombotic autoimmune disorder (26). Infections, however, are well-documented triggers of transient aPL responses, including in syphilis, viral hepatitis, HIV, tuberculosis, and others (21, 27, 28). Importantly, in syphilis the antibodies are typically β_2GPI-independent, bind "naked" cardiolipin, and do not confer a significant thrombotic risk (21, 22). Indeed, wide variation has been reported in the prevalence of aCL during syphilis (approximately 6–70%), depending on stage and assay methodology (20, 28).

Consistent with previous observations, our study demonstrates that low-level aCL IgG and IgM were detectable in virtually all patients before therapy, whereas none remained detectable six months after treatment. The complete disappearance of aCL following penicillin therapy is in line with an infection-driven phenomenon and argues against persistent autoimmunity. Of note, all healthy controls tested negative for both aCL isotypes, supporting the concept that the aCL detected in our patients were induced by infection and resolved with pathogen clearance.

Collectively, our findings support a conceptual model in which poorer cytotoxic T-cell reserves may be associated with delayed removal of APCs presenting treponemal antigens, leading to prolonged antigen-driven B-cell activation and sustained antibody production. This immunological environment could foster persistent non-treponemal titers in the absence of active infection. While such a model does not exclude other mechanisms, it provides a biologically plausible explanation that reconciles microbiological cure with persistent serological reactivity.

The strengths of our study include its prospective design, standardized therapy, longitudinal immunophenotyping before

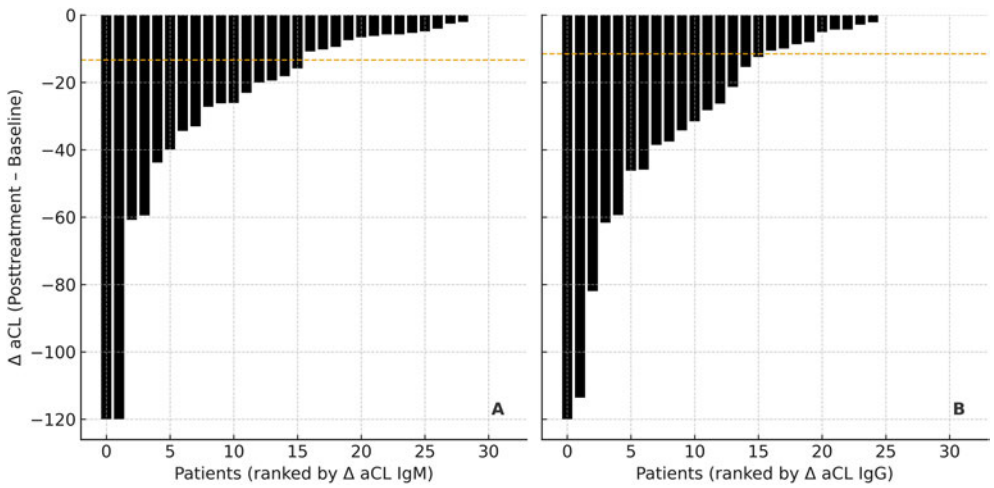


FIGURE 2
Waterfall plots demonstrating changes in anticardiolipin (aCL) antibody levels following treatment for early syphilis. **(A)** Δ aCL IgM (posttreatment baseline) and **(B)** Δ aCL IgG (posttreatment baseline) values are shown for each patient, ranked from the largest to the smallest decline. Each bar represents an individual participant. Negative values indicate a reduction in antibody titers after treatment. Dotted horizontal lines denote median changes for the cohort.

and after treatment, and the inclusion of a healthy control group to contextualize aCL dynamics. Furthermore, the simultaneous evaluation of cytotoxic T-cell and B-cell subsets provides complementary mechanistic insights. However, several limitations should be acknowledged. The relatively small sample size should be considered when interpreting the findings. In addition, the study evaluated quantitative lymphocyte subsets rather than functional cytotoxic T-cell activity (e.g., degranulation assays or cytokine profiling), and therefore mechanistic interpretations should be viewed as hypothesis-generating. Moreover, while lower $CD8^+$ numbers may indicate diminished cytotoxic potential, we cannot exclude contributions from other immune compartments such as regulatory T cells, NK cells, or monocyte subsets.

Future research should seek to confirm our findings in larger cohorts and incorporate functional immunological assessments. Longitudinal studies examining memory B-cell dynamics, germinal center reactions, and APC phenotype may further clarify the mechanisms driving persistent antibody production after treatment. Additionally, the role of T-cell exhaustion, senescence, or checkpoint pathways warrants investigation, particularly in patients demonstrating delayed serological responses.

From a clinical perspective, understanding whether serofast reflects immunological dysregulation rather than microbiological persistence has important implications. If confirmed, this paradigm would discourage unnecessary additional antibiotic courses and shift focus toward biomarkers of immune clearance and recovery. Carefully designed immunophenotyping may identify patients at risk for serofast and guide tailored follow-up strategies. Ultimately, integrating immunological profiling with clinical parameters could refine the management of syphilis beyond traditional serological endpoints.

In summary, this study provides novel evidence linking baseline cytotoxic T-cell deficits and persistent B-cell activation with the development of serofast responses in early syphilis, alongside complete normalization of infection-induced aCL following treatment. These findings support a model in which impaired cytotoxic clearance of antigen-presenting cells may contribute to prolonged humoral stimulation despite microbiological cure. Future studies integrating functional T-cell assays and longitudinal immunophenotyping will be necessary to determine whether cytotoxic T-cell competence represents a true determinant of serological resolution in syphilis.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Medical University of Silesia Bioethics Committee. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

KK: Methodology, Writing – review & editing, Formal analysis, Software, Investigation, Writing – original draft, Visualization, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Validation, Resources, Project administration. MK: Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation, Resources. KN-B: Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing. MP: Supervision, Methodology, Validation, Software, Conceptualization, Writing – review & editing, Writing – original draft.

Funding

The author(s) declared that financial support was not received for this work and/or its publication.

Conflict of interest

The author(s) declared that this work was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Generative AI statement

The author(s) declared that generative AI was not used in the creation of this manuscript.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

1. Hook EW. Syphilis. *Lancet*. (2017) 389:1550–7. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32411-4

2. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočnik M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. (2021) 35:574–88. doi: 10.1111/jdv.16946

3. Seña AC, Wolff M, Martin DH, Behets F, Van Damme K, Leone P, et al. Predictors of serological cure and serofast state after treatment in HIV-negative persons with early syphilis. *Clin Infect Dis*. (2011) 53:1092–9. doi: 10.1093/cid/cir671

4. Papp JR, Park IU, Fakile Y, Pereira L, Pillay A, Bolan GA. CDC laboratory recommendations for syphilis testing, United States, 2024. *MMWR Recomm Rep*. (2024) 73:1–32. doi: 10.15585/mmwr.rr7301a1

5. Seña AC, Zhang XH, Li T, Zheng HP, Yang B, Yang LG, et al. A systematic review of syphilis serological treatment outcomes in HIV-infected and HIV-uninfected persons: rethinking the significance of serological non-responsiveness and the serofast state after therapy. *BMC Infect Dis*. (2015) 15:479. doi: 10.1186/s12879-015-1209-0

6. Clement ME, Okeke NL, Hicks CB. Treatment of syphilis: a systematic review. *JAMA*. (2014) 312:1905–17. doi: 10.1001/jama.2014.13259

7. Tong ML, Lin LR, Liu GL, Zhang HL, Zeng YL, Zheng WH, et al. Factors associated with serological cure and the serofast state of HIV-negative patients with primary, secondary, latent, and tertiary syphilis. *PloS One*. (2013) 8:e70102. doi: 10.1371/journal.pone.0070102

8. Zhang RL, Wang QQ, Zhang JP, Yang LJ. Molecular subtyping of Treponema pallidum and associated factors of serofast status in early syphilis patients: identified novel genotype and cytokine marker. *PloS One*. (2017) 12:e0175477. doi: 10.1371/journal.pone.0175477

9. Cao Q, Li Y, Hu Y, He B, Tang Y, Cao T, et al. Serofast status in syphilis: pathogenesis to therapeutics. *Clin Chim Acta*. (2024) 560:119754. doi: 10.1016/j.cca.2024.119754

10. Kaminiów K, Kiołbasa M, Pastuszczak M. The significance of the cell-mediated host immune response in syphilis. *Microorganisms*. (2024) 12:2580. doi: 10.3390/microorganisms12122580

11. Kaminiów K, Kiołbasa M, Pastuszczak M. IFN-γ gene polymorphisms +874 T/A and +2109 A/G are associated with the serofast state after early syphilis treatment: a prospective observational study. *Front Immunol*. (2025) 16:1602527. doi: 10.3389/fimmu.2025.1602527

12. Kiołbasa M, Kaminiów K, Pastuszczak M. Serofast state after syphilis treatment: implications and recommendations for clinical practice. Narrative review. *Postepy Dermatol Alergol*. (2025) 42:215–20. doi: 10.5114/ada.2024.147332

13. Sciascia S, Radin M, Bazzan M, Montaruli B, Cosseddu D, Norbiato C, et al. Antiphospholipid antibodies and infection: non nova sed nove. *Front Immunol*. (2021) 12:687534. doi: 10.3389/fimmu.2021.687534

14. Lackner KJ, Manukyan D, Müller-Calleja N. Pathophysiological insights into the antiphospholipid syndrome. *Hamostaseologie*. (2017) 37:202–7. doi: 10.5482/HAMO-16-07-0020

15. Qin J, Yang T, Wang H, Feng T, Liu X. Potential predictors for serofast state after treatment among HIV-negative persons with syphilis in China: a systematic review and meta-analysis. *Iran J Public Health*. (2015) 44:155–69.

16. Cheng W, Lu Y, Chen R, Ren H, Hu W. Decreased blood natural killer cells in serofast patients: a systematic review and meta-analysis. *Cent Eur J Immunol*. (2021) 46:509–15. doi: 10.5114/ceji.2021.111540

17. Huang T, Zhang J, Ke W, Zhang X, Chen W, Yang J, et al. MicroRNA expression profiling of peripheral blood mononuclear cells associated with syphilis. *BMC Infect Dis*. (2020) 20:165. doi: 10.1186/s12879-020-4846-x

18. Li K, Wang C, Lu H, Gu X, Guan Z, Zhou P. Regulatory T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid of syphilis patients with and without neurological involvement. *PloS NeglTrop Dis*. (2013) 7:e2528. doi: 10.1371/journal.pntd.0002528

19. Liu XK, Wang ZS, Li J. Predictors of serofast state after treatment of patients with syphilis. *Chin Med J (Engl)*. (2020) 133:2874–6. doi: 10.1097/CM9.0000000000001175

20. Santiago MB, Stellin R, Gaburo Júnior N, Bueno C, Viana VS, Cossermelli W, et al. Antiphospholipid antibodies in syphilis. *Braz J Med Biol Res*. (1990) 23:397–402. doi: 10.1111/j.1600-0897.1996.tb00143.x

21. Loizou S, Singh S, Wypkema E, Asherson RA. Anticardiolipin, anti-beta(2)-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. *Ann Rheum Dis*. (2003) 62:1106–11. doi: 10.1136/ard.62.11.1106

22. Pierangeli SS, Goldsmith GH, Krnic S, Harris EN. Differences in functional activity of anticardiolipin antibodies from patients with syphilis and those with antiphospholipid syndrome. *Infect Immun*. (1994) 62:4081–4. doi: 10.1128/iai.62.9.4081-4084.1994

23. Smiyan S, Kuzmina G, Garmish O, Komorovsky R. Infection-triggered antiphospholipid syndrome: a critical overview. *Open Access Rheumatol*. (2025) 17:173–83. doi: 10.2147/OARRR.S541224

24. Platzer B, Stout M, Fiebiger E. Antigen cross-presentation of immune complexes. *Front Immunol*. (2014) 5:140. doi: 10.3389/fimmu.2014.00140

25. Colbert JD, Cruz FM, Rock KL. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules. *Curr Opin Immunol*. (2020) 64:1–8. doi: 10.1016/j.coi.2019.12.005

26. Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, Elkon KB. Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with beta 2 glycoprotein I (apolipoprotein H). *J Clin Invest*. (1992) 90:1105–9. doi: 10.1172/JCI115927

27. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid antibodies and infections. *Ann Rheum Dis*. (2003) 62:388–93. doi: 10.1136/ard.62.5.388

28. Sène D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev*. (2008) 7:272–7. doi: 10.1016/j.autrev.2007.10.001

10.2. Oświadczenia współautorów o merytorycznym udziale w powstaniu publikacji

Załącznik nr 13
do *Zasad i trybu*
postępowania w sprawie nadania stopnia doktora
w Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORÓW
o merytorycznym udziale w powstaniu publikacji:
artykułu naukowego wchodzącego w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych*

Publikacja nr 1

„IFN-γ gene polymorphisms +874 T/A and +2109 A/G are associated with the serofast state after early syphilis treatment: a prospective observational study.” Frontiers in Immunology. Data wydania: 2 czerwca 2025;16:1602527. doi: 10.3389/fimmu.2025.1602527. PMID: 40529360; PMCID: PMC12171201
tytuł publikacji, czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony

Konrad Kaminiów, Martyna Kiołbasa, Maciej Pastuszczak
imiona i nazwiska autorów publikacji

Wyrażam zgodę na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej:

Konrada Kaminiów

imię i nazwisko doktoranta

oraz oświadczam, że mój merytoryczny udział w powstaniu w niniejszej publikacji polegał na:

Lp.	Autor	Określenie merytorycznego udziału w powstaniu publikacji	Podpis
1	Konrad Kaminiów (doktorant)	Koncepcja badań, opracowanie metodologii badań, kierowanie projektem naukowym, pozyskanie finansowania, zapewnienie zasobów do realizacji badań, zbieranie materiału badawczego, przygotowanie bazy danych, analiza statystyczna wyników, opracowanie i implementacja narzędzi analitycznych (software), wizualizacja wyników (ryciny, wykresy), analiza piśmiennictwa, przygotowanie tekstu manuskryptu (wersja pierwotna), korekta i redakcja manuskryptu. Procentowy wkład w publikację wynosi 80%.	PODPIS ZAUFANY Konrad Dariusz **KAMINIÓW** 21.04.2026 19:50:52 GMT+0200 Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym
2	Martyna Kiołbasa	Udział w zbieraniu materiału badawczego, przygotowanie wybranych części manuskryptu (wersja pierwotna), udział w korekcie i redakcji tekstu, zapewnienie zasobów do realizacji badań. Procentowy wkład w publikację wynosi 10%.	PODPIS ZAUFANY MARTYNA ANNA **KIOŁBASA** 22.04.2026 11:13:22 GMT+0200 Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym
3	Maciej Pastuszczak	Udział w opracowaniu koncepcji badań, opracowanie metodologii badań, nadzór nad realizacją projektu, walidacja wyników, udział w analizie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu (wersja pierwotna oraz korekta), wsparcie w opracowaniu narzędzi analitycznych (software). Procentowy wkład w publikację wynosi 10%.	PODPIS ZAUFANY MACIEJ **PASTUSZCZAK** 21.04.2026 19:42:24 GMT+0200 Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym

Załącznik nr 13
do *Zasad i trybu*
postępowania w sprawie nadania stopnia doktora
w Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORÓW
o merytorycznym udziale w powstaniu publikacji:
artykułu naukowego wchodzącego w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych*

Publikacja nr 2

„Cytotoxic T-cell deficiency and sustained B-cell activation in serofast syphilis: a prospective observational study." Frontiers in Immunology. Data Wydania: 27 marca 2026;17:1792505. doi: 10.3389/fimmu.2026.1792505. PMID: 41972177; PMCID: PMC13065694.
tytuł publikacji, czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony

Konrad Kaminiów, Martyna Kiołbasa, Katarzyna Napiórkowska-Baran, Maciej Pastuszczak
imiona i nazwiska autorów publikacji

Wyrażam zgodę na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej:

Konrada Kaminiów

imię i nazwisko doktoranta

oraz oświadczam, że mój merytoryczny udział w powstaniu w niniejszej publikacji polegał na:

Lp.	Autor	Określenie merytorycznego udziału w powstaniu publikacji	Podpis
1	Konrad Kaminiów (doktorant)	Koncepcja badań, opracowanie metodologii badań, kierowanie projektem naukowym, pozyskanie finansowania, zapewnienie zasobów do realizacji badań, zbieranie materiału badawczego, przygotowanie bazy danych, analiza statystyczna wyników, opracowanie i implementacja narzędzi analitycznych (software), wizualizacja wyników (ryciny, wykresy), analiza piśmiennictwa, przygotowanie tekstu manuskryptu (wersja pierwotna), korekta i redakcja manuskryptu. Procentowy wkład w publikację wynosi 70%.	PODPIS ZAUFANY Konrad Dariusz KAMINIÓW 21.04.2026 20:54:57 GMT+0200 Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym
2	Martyna Kiołbasa	Udział w zbieraniu materiału badawczego, przygotowanie wybranych części manuskryptu (wersja pierwotna), udział w korekcie i redakcji tekstu, zapewnienie zasobów do realizacji badań. Procentowy wkład w publikację wynosi 10%.	PODPIS ZAUFANY MARTYNA ANNA KIOŁBASA 22.04.2026 11:13:22 GMT+0200 Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym
3	Katarzyna Napiórkowska-Baran	Analiza statystyczna wyników, analiza piśmiennictwa, przygotowanie tekstu manuskryptu (wersja pierwotna), korekta i redakcja manuskryptu. Procentowy wkład w publikację wynosi 10%.	

4	Maciej Pastuszczak	Udział w opracowaniu koncepcji badań, opracowanie metodologii badań, nadzór nad realizacją projektu, walidacja wyników, udział w analizie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu (wersja pierwotna oraz korekta), wsparcie w opracowaniu narzędzi analitycznych (software). Procentowy wkład w publikację wynosi 10%.	PODPIS ZAUFANY MACIEJ **PASTUSZCZAK** 21.04.2026 20:49:39 GMT+0200 Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym

Podpisano przez/ Signed by:
KATARZYNA
NAPIÓRKOWSKA-BARAN
Data/ Date: 21.04.2026 20:29
mSzafir