

Оценка рекомбинантных белков *T. pallidum* Tr0163 и Tr0971 как антигенов для диагностики сифилиса методом иммуноферментного анализа

© Арбузова Н.В.*, Шпилева М.В., Катунин Г.Л., Кузнецов О.Е., Носов Н.Ю., Соломка В.С.

Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Москва, Россия

Обоснование. С расшифровкой генома *T. pallidum* и применением биоинформатики и иммунопротеомики появилось множество рекомбинантных белков *T. pallidum*, которые были проанализированы с точки зрения их диагностической ценности, и некоторые из них используются в качестве диагностических антигенов в коммерческих тестах. Однако на практике нередко возникают существенные затруднения при диагностике асимптомных форм сифилиса, особенно поздних, когда чувствительность серологических методов может значительно различаться. Поэтому поиск более чувствительных и специфических антигенов для серологической диагностики сифилиса продолжается.

Цель исследования. Оценка потенциала рекомбинантных белков *T. pallidum* Tr0163 и Tr0971 в качестве кандидатных антигенов для определения IgG в сыворотке больных сифилисом методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Методы. Рекомбинантные белки *T. pallidum* Tr0163 и Tr0971 произведены фирмой Cusabio (Китай). Для исследования методом непрямого ИФА использовали образцы сыворотки крови пациентов с подтвержденным диагнозом первичного, вторичного, раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса, а также образцы сыворотки крови от здоровых лиц как группы контроля. Для характеристики концентрации антител определяли коэффициент позитивности, равный отношению оптической плотности, полученной для каждого образца, к критической оптической плотности. Коэффициент позитивности использовали для определения различия между группами больных сифилисом и здоровых лиц по критерию Манна–Уитни для непарных выборок, а также для оценки клинической информативности лабораторного теста. Оценку диагностической эффективности ИФА проводили путем расчета показателей в группах больных с установленным диагнозом сифилиса и в группе здоровых лиц в соответствии со стандартом оценки диагностической информативности лабораторных тестов.

Результаты. Общая диагностическая эффективность исследованных рекомбинантных белков для определения антител класса IgG методом ИФА составляет 65,4 и 66,7% соответственно для Tr0163 и Tr0971, демонстрируя при этом высокую специфичность и положительную

предсказательную ценность исследования. Чувствительность ИФА в отношении исследованных форм сифилиса не превышает 68,8%.

Заключение. С целью совершенствования трепонема-специфической диагностики сифилиса мы считаем важным продолжить работу с данными антигенами по определению эффективности ИФА для определения IgG, IgM или соотношения антител IgM/IgG с большим количеством клинических образцов сывороток от пациентов с сифилисом, пациентов без клинико-лабораторных признаков сифилиса и от здоровых лиц.

Ключевые слова: *Treponema pallidum*; рекомбинантные белки; Tr0163; Tr0971; иммуноферментный анализ

Конфликт интересов: авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Источник финансирования: рукопись подготовлена и опубликована в рамках выполнения государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России № 056-00003-24-02.

Для цитирования: Арбузова Н.В., Шпилевая М.В., Катунин Г.Л., Кузнецов О.Е., Носов Н.Ю., Соломка В.С. Оценка рекомбинантных белков *T. pallidum* Tr0163 и Tr0971 как антигенов для диагностики сифилиса методом иммуноферментного анализа. Вестник дерматологии и венерологии. 2024;100(6):XX–XX. doi: <https://doi.org/10.25208/vdv16813>

Evaluation of recombinant proteins *T. pallidum* Tp0163 and Tp0971 as antigens for the diagnosis of syphilis using enzyme immunoassay

© Natalia V. Arbuzova*, Marina V. Shpilevaya, Georgii L. Katunin, Oleg E. Kuznetsov, Nikita Yu. Nosov, Viktoriya S. Solomka

Federal State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia

Background. With the deciphering of the *T. pallidum* genome and the application of bioinformatics and immunoproteomics, many recombinant *T. pallidum* proteins have emerged that have been evaluated for their diagnostic value, some of which are used as diagnostic antigens in commercial tests. In practice, however, there are often significant difficulties in diagnosing asymptomatic forms of syphilis, especially late forms, when the sensitivity of serologic methods may vary considerably. Therefore, the search for more sensitive and specific antigens for the serological diagnosis of syphilis continues.

Aims. To evaluate the potential of recombinant proteins *T. pallidum* Tp0163 and Tp0971 as candidate antigens for the determination of IgG in the sera of syphilis patients using enzyme immunoassay.

Methods. Recombinant *T. pallidum* proteins Tp0163 and Tp0971 were produced by Cusabio (China). Serum samples from patients with a confirmed diagnosis of primary, secondary, early latent and late latent syphilis, as well as serum samples from healthy individuals as controls, were used for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. To characterize the antibody concentration, a positivity coefficient was determined as the ratio of the optical density obtained for each sample to the critical optical density. The positivity coefficient was used to determine the difference between groups of syphilis patients and healthy individuals using the Mann-Whitney test for unpaired samples, as well as to assess the clinical informativeness of the laboratory test. The diagnostic efficiency of the enzyme immunoassay was assessed by calculating the indices in the groups of patients with established syphilis diagnosis and in the group of healthy individuals, in accordance with the standard for assessing the diagnostic informativeness of laboratory tests.

Results. The overall diagnostic efficiency of the study of recombinant proteins for the determination of IgG class antibodies by enzyme immunoassay is 65.4 and 66.7% for Tp0163 and Tp0971 respectively, demonstrating the specificity and positive predictive value of the study. The sensitivity of ELISA in relation to the study of forms of syphilis was not 68.8%.

Conclusions. In order to improve the treponema-specific diagnosis of syphilis, we believe it is important to continue working with these antigens to determine the effectiveness of ELISA to detect

IgG, IgM or IgM/IgG antibodies with a large number of clinical serum samples from syphilis patients, patients with non-syphilitic pathology and healthy individuals.

Keywords: *Treponema pallidum*; recombinant proteins; Tp0163; Tp0971; enzyme-linked immunosorbent assay

Conflict of interest: the authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Funding source: the study was carried out within the framework of the state task of the State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology of the Ministry of Health of Russia No. 056-00003-24-02.

For citation: Arbusova NV, Shpilevaya MV, Katunin GL, Kuznetsov OE, Nosov NYu, Solomka VS. Evaluation of recombinant proteins *T. pallidum* Tp0163 and Tp0971 as antigens for the diagnosis of syphilis using enzyme immunoassay. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2024;100(6):XX–XX. doi: <https://doi.org/10.25208/vdv16813>

Обоснование

Серологические методы занимают ведущее положение в лабораторной диагностике сифилитической инфекции. В последние годы платформой выбора при выполнении ферментных иммуноанализов в лабораториях стали трепонемные тесты с использованием рекомбинантных иммунодоминантных антигенов *T. pallidum*, таких как Tr15 (Tr0171), Tr17 (Tr0435) и Tr47 (Tr0574) и TmpA (Tr44,5, Tr0768). Метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием рекомбинантных антигенов широко применяется в диагностике всех форм сифилиса в силу высокой чувствительности и специфичности, а также возможности выявления заболевания при отсутствии клинических проявлений, что актуально для скрытой формы сифилиса. Преимуществами метода являются также автоматизированное выполнение и объективная интерпретация результатов, а его ограничениями — невозможность дифференцировать различные формы заболевания и низкая информативность при оценке эффективности проводимого лечения [1]. Поиск дополнительных чувствительных и специфических антигенов может расширить возможности серологической диагностики сифилиса.

Возможность для широкомасштабного обнаружения таких антигенов открыла разработка методов функциональной геномики и протеомики и на их основе — технологии получения рекомбинантных белков. Детальное рассмотрение групп белков, проявляющих иммуногенные свойства в течении сифилитической инфекции, выполнено М.А. McGill и соавт. [2] и М.В. Brinkman и соавт. [3]. Опираясь на работы этих исследователей и собственные результаты биоинформатического анализа, в 2012 г. в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России (ГНЦДК) была изучена перспектива диагностического использования ряда белков *T. pallidum*, иммуногенность которых в отношении человеческой сыворотки была подтверждена обеими протеомными платформами [4]. Было выбрано шесть протеинов, для которых в ГНЦДК *de novo* создали генетические экспрессионные системы. После очистки с помощью аффинной хроматографии полученные рекомбинантные белки были использованы в качестве антигенов для определения специфических IgG в сыворотке крови больных разными формами сифилиса методами ИФА и иммунофлуоресцентного анализа [5–9]. Полученные данные характеризовали новые антигены как перспективные для диагностики сифилитической инфекции.

Поиск антигенов *T. pallidum*, которые могли бы служить маркерами стадии сифилиса, или подходить для мониторинга ответа на лечение, или использоваться в качестве рекомбинантных вакцин, идет до сих пор [10–12].

В настоящей работе мы продолжили исследование кандидатных антигенов для диагностики сифилиса, отобранных в результате биоинформатического анализа двух протеомных платформ [4], и оценили перспективы применения рекомбинантных белков *T. pallidum* Tr0163 и Tr097 как антигенов при исследовании сыворотки больных сифилисом методом ИФА.

Tr163 (TroA) — периплазматический белок в составе АТФ-связывающего транспортного комплекса. В работе М.В. Brinkman и соавт. показано двукратное превышение фоновых значений при исследовании антител к данному антигену в сыворотке крови больных ранним скрытым сифилисом, тогда как при манифестных формах значительного превышения не описано [3]. При этом в скрининге М.А. McGill и соавт. были получены значения серореактивности 3+ для образцов сыворотки больных первичного, вторичного, раннего и позднего скрытого сифилиса [2].

Tr0971 — периплазматический липопротеин, который, как полагают, прикреплен к внутренней мембране *T. pallidum* [13, 14]. В работе М.В. Brinkman и соавт. показано 4-кратное превышение фоновых значений уровня антител к данному антигену в группе больных первичным сифилисом и 8-кратное в группе раннего скрытого сифилиса по сравнению с контрольными образцами здоровых индивидов [3]. В скрининге М.А. McGill и соавт. получены значения серореактивности 1+ для образцов сыворотки больных с поздним скрытым сифилисом и 2+ — с первичным, вторичным, ранним скрытым сифилисом [2].

В более поздних работах были показаны индукция выработки высоких уровней специфических антител IgG у кроликов в ответ на введение рекомбинантного Tr0971 [11], а также реактивность сыворотки пациентов с первичным сифилисом к рекомбинантному Tr0163 [12].

Цель исследования — оценка потенциала рекомбинантных белков *T. pallidum* Tr0163 и Tr0971 в качестве кандидатных антигенов для определения IgG в сыворотке больных первичным, ранним скрытым, поздним скрытым и вторичным сифилисом методом ИФА.

Методы

Дизайн исследования

Проведено пилотное, неконтролируемое, основанное на наблюдении исследование с контрольной группой образцов сыворотки крови здоровых доноров ($n = 20$) и 58 образцами сыворотки крови пациентов с подтвержденным диагнозом сифилиса следующих форм: первичный ($n = 15$), вторичный ($n = 8$), ранний скрытый ($n = 16$) и поздний скрытый ($n = 19$).

Критерии соответствия

Критерии включения: пациенты обоего пола от 18 лет с диагнозом первичного, вторичного, раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса. Группа контроля состояла из практически здоровых лиц обоего пола от 18 лет.

Критерии исключения: беременность, сифилис других форм.

Условия проведения

Диагноз определялся врачом-дерматовенерологом ГНЦДК в соответствии с клиническими рекомендациями «Сифилис» (2020 г.) на основании данных анамнеза, клинических признаков и результатов серологических тестов. Взятие крови проводилось в клинической лаборатории ГНЦДК, серологические исследования (ИФА) — в этом же учреждении в отделе лабораторной диагностики инфекций, передаваемых половым путем, и дерматозов.

Исследовали сыворотки крови, полученные от пациентов центрального региона Российской Федерации, обратившихся в ГНЦДК в период с сентября 2023 по май 2024 г.

Описание исследования

Использовался непрямой ИФА IgG. Рекомбинантные белки *T. pallidum* Tr0163 и Tr0971 произведены фирмой Cusabio (Китай).

Рекомбинантные антигены Tr0163 и Tr0971 по отдельности разводили в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6) до концентрации 1 мкг/мл и добавляли в 96-луночные микропланшеты (ServiceBio) по 100 мкл на лунку, после чего инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Микропланшеты 1 раз промывали фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,05% твина 20 (ФСРт), и блокировали раствором 3% сухого обезжиренного молока (с 5% сахарозы) в ФСРт по 150 мкл в лунку 1,5 ч при комнатной температуре.

После удаления блокирующего буфера и высушивания в планшеты вносили по 100 мкл исследуемых образцов сыворотки в разведении 1:100 (в ФСРт с 1% сухого обезжиренного молока) и инкубировали 30 мин при 37 °С. Планшеты трижды промывали ФСРт для удаления несвязавшихся антител. По 100 мкл HRP-конъюгированные козы антитела против IgG человека (Merck Millipore) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 35 мин при 37 °С. Для обнаружения иммунокомплексов планшеты проявляли добавлением в каждую лунку 100 мкл субстрата тетраметилбензидин-Н₂O₂ на 15–20 мин с инкубацией при 37 °С в темноте. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,2 М серной кислоты.

Методы регистрации исходов

Оптическую плотность (ОП) продуктов иммуноферментной реакции в лунках планшета измеряли при 450 нм с использованием ИФА-анализатора Multiskan FC (Thermo scientific, США). Для интерпретации результатов определяли пороговый уровень ОП (ОП_{пор}) как среднее значение ОП образцов сыворотки крови здоровых индивидов.

ОП_{пор} использовали для определения коэффициента позитивности (КП):

$$\text{КП} = \text{ОП}_{\text{образца}} / \text{ОП}_{\text{пор}},$$

где ОП_{образца} — ОП любого исследуемого образца сыворотки.

В дальнейшем «положительными» считали значения КП, превышающие 4, рекомендованное для нашей тест-системы.

Статистический анализ

Количественные характеристики КП проверяли на нормальность распределения по критериям Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Различия между группами оценивали по критерию Фишера для однофакторного дисперсионного анализа. При попарном сравнении средних значений использовали критерий Стьюдента для независимых групп. Критерий уровня значимости соответствовал $p < 0,05$.

Образцы сыворотки крови пациентов с подтвержденным диагнозом «сифилис», классифицированные в ИФА как положительные, обозначали как истинно положительные (ИП); классифицированные в ИФА как отрицательные — как ложно отрицательные (ЛО); классифицированные в ИФА как положительные — как ложно положительные (ЛП); образцы сыворотки крови здоровых доноров, классифицированные в ИФА как отрицательные, классифицировали как истинно отрицательные (ИО).

Анализ диагностической ценности рекомбинантных антигенов Tr0163 и Tr0971 *T. pallidum* проводили в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов» [15] с использованием КП исследованных сывороток.

Диагностические показатели вычисляли по следующим формулам:

$$\text{Чувствительность} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО}) \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{Специфичность} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП}) \times 100\%, \quad (2)$$

$$\text{Положительная предсказательная ценность} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛП}) \times 100\%, \quad (3)$$

$$\text{Отрицательная предсказательная ценность} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛО}) \times 100\%, \quad (4)$$

$$\text{Диагностическая эффективность} = (\text{ИП} + \text{ИО}) / (\text{ИП} + \text{ЛО} + \text{ИО} + \text{ЛП}) \times 100\%, \quad (5)$$

где ИП, ИО — соответственно истинно положительные и истинно отрицательные результаты, ЛО, ЛП — соответственно ложноотрицательные и ложноположительные результаты.

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено независимым локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» (протокол № 2 от 28 февраля 2023 г.). Биологический материал для исследования получен от пациентов в соответствии с письменным информированным добровольным согласием.

Результаты

Предварительный анализ возможности диагностического использования рекомбинантных белков Tr0163 и Tr0971 *T. pallidum* для определения антител класса IgG методом ИФА проводили с 58 образцами сывороток крови четырех групп больных следующими формами сифилиса: первичный сифилис ($n = 15$), вторичный сифилис ($n = 8$), ранний скрытый сифилис ($n = 16$) и поздний скрытый сифилис ($n = 19$). Контрольная группа состояла из 20 образцов сыворотки здоровых индивидов. Результаты ИФА с применением обоих антигенов представлены в табл. 1, а диагностические характеристики рекомбинантных антигенов Tr0163 и Tr0971 — в табл. 2.

Исследования показали, что результаты ИФА по определению антител класса IgG на основе Tr0163 и Tr0971 в целом соответствуют клиническому диагнозу. Для обоих антигенов характерна значительная вариабельность иммунного ответа во всех исследованных группах больных сифилисом (см. табл. 1). В каждой группе больных было получено некоторое количество ложноотрицательных результатов, в то время как в группе здоровых не отмечено ни одного ложноположительного результата.

Отличия значений КП между группами здоровых индивидов и больных вторичным сифилисом по отношению к обоим антигенам оказались статистически незначимы. При этом средние значения КП в группе больных вторичным сифилисом были достаточно высокими и превышали КП в группе здоровых индивидов в 19,9 и в 11,41 раза по отношению к Tr0163 и Tr0971 соответственно. Кроме того, в этих группах фиксировалось минимальное во всей выборке количество ложноотрицательных результатов — всего один с Tr0163. Тем не менее большой разброс значений при малой выборке нивелировал перечисленные отличия.

Для пациентов с диагнозами первичного, раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса значения КП статистически значимо превышают таковые для контрольной группы. Диагностическая чувствительность определения IgG при этом для первичного, раннего скрытого и позднего скрытого сифилиса составляет соответственно 40; 62,5; 31,6% с Tr0163 и 66,7; 68,8; 15,8% с Tr0971.

Общая диагностическая эффективность исследованных рекомбинантных белков для определения антител класса IgG отличается невысокими значениями — 65,4 и 66,7% соответственно для Tr0163 и Tr0971, демонстрируя при этом высокую специфичность и положительную предсказательную ценность исследования (по 100%). Максимальную чувствительность оба антигена в нашем исследовании проявили в отношении вторичного сифилиса, но из-за малого размера выборки и значительного разброса значений КП результаты оказались статистически незначимыми. Чувствительность ИФА в отношении других форм сифилиса не превышает 68,8%.

Обсуждение

С выяснением генома *T. pallidum* и применением биоинформатического анализа многие рекомбинантные белки *T. pallidum*, такие как Tr15, Tr17, TmpA, Tr47, Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0277, Tr0684, Tr0965, были оценены на предмет их диагностической ценности [5, 6, 8, 9, 12, 14]. Некоторые из них — Tr15, Tr17, TmpA, Tr47 — используются в качестве диагностических антигенов в коммерческих тестах. Однако до сих пор диагностика сифилиса основывается на комбинации нескольких анализов и единого общепринятого серологического теста не существует. Поэтому поиск чувствительных и специфичных антигенов для серологической диагностики сифилиса остается актуальной задачей.

Белки Tr0163 и Tr0971 локализованы на цитоплазматической мембране *T. pallidum* со стороны периплазматического пространства и, как показано в работах по изучению протеома *T. pallidum* [2, 3], обладают высокой иммуногенностью. Они же были отобраны в качестве кандидатных антигенов для диагностики сифилиса в результате биоинформатического анализа двух протеомных платформ [4]. Перспективность исследования их диагностических свойств была подтверждена работами M.B. Brinkman и соавт. [3] и M.A. McGill и соавт. [2], а позже — исследованиями X. Zhang и соавт. [11] и A.M. Haynes и соавт. [12].

Наше исследование подтверждает иммуногенность рекомбинантных белков Tr0163 и Tr0971. Оба антигена индуцируют достоверно значимое повышение специфических антител IgG в сыворотке крови больных ранним скрытым сифилисом. Специфичность и

положительная предсказательная ценность исследования с обоими антигенами составили 100%. Показано, что диагностическая эффективность ИФА при сифилисе варьируется в зависимости как от антигенов, используемых для обнаружения антител к *T. pallidum* [16], так и от стадии инфекции [17, 18]. Кроме того, ИФА на основе изолированных рекомбинантных антигенов менее чувствителен, чем при использовании антигенных наборов [19, 20]. Умеренная диагностическая эффективность, наблюдаемая в нашем эксперименте для Tr0163 и Tr0971 при определении антител класса IgG (65,4 и 66,7% соответственно для Tr0163 и Tr0971), предполагает, что каждый белок сам по себе может не быть эффективным кандидатом для диагностики, но мы считаем, что установленная в нашем эксперименте результативность тестирования может быть повышена за счет дополнительного определения антител класса IgM, или соотношения антител IgM/IgG, или включения исследуемых белков в состав наборов из нескольких антигенов *T. pallidum*.

Исследование предусматривает дальнейшее изучение диагностической ценности рекомбинантных белков Tr0163 и Tr0971 отдельно или в составе наборов с другими антигенами *T. pallidum* с большим количеством образцов сыворотки крови больных различными формами сифилиса, а также вероятностной дифференциации скрытых форм сифилиса с ложноположительными реакциями на сифилис. Кроме того, планируется изучение динамики профиля антител класса IgG или соотношения IgM/IgG в сыворотке крови больных сифилисом, в частности поздним сифилисом скрытым, до и после специфической терапии с целью оценки возможности использования данных антигенов для разработки серологических критериев эффективности терапии.

Поиск антител *T. pallidum*, специфичных для определенных стадий сифилиса или характеризующихся альтернативным характером экспрессии при различных формах заболевания, в последние десятилетия активно развивается, что связано с расширением протеомных платформ [10–12] и возможностями получения рекомбинантных аналогов труднодоступных белков трепонемы. Полученные к настоящему времени результаты немногочисленны и противоречивы [16, 19, 21–25], в том числе в отношении, казалось бы, хорошо изученных антигенов Tr15 (Tr0171), Tr17 (Tr0435) и Tr47 (Tr0574) и TmpA (Tr44,5, Tr0768) [19, 22]. Результаты таких исследований носят предварительный характер и помогают увидеть перспективность дальнейшей работы с теми или иными антигенами, а также улучшить понимание развития иммунного ответа при сифилисе.

Заключение

Рекомбинантные белки *T. pallidum* Тр0163 и Тр0971 сохраняют перспективность в качестве новых антигенов для серологической диагностики сифилиса. Дальнейшие исследования должны охватить более широкий круг случаев сифилиса и определение потенциала Тр0163 и Тр0971 в сочетании с другими трепонемными антигенами как для диагностики сифилиса, так и для мониторинга эффективности специфического лечения.

Литература/References

1. Wong EH, Klausner JD, Caguin-Grygiel G, Madayag C, Barber KO, Qiu JS, et al. Evaluation of an IgM/IgG sensitive enzyme immunoassay and the utility of index values for the screening of syphilis infection in a high-risk population. *Sex Transm Dis*. 2011;38(6):528–532. doi: <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e318205491a>
2. McGill MA, Edmondson DG, Carroll JA, Cook RG, Orkiszewski RS, Norris SJ. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. *Infect Immun*. 2010;78(6):2631–2643. doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.00173-10>
3. Brinkman MB, McKeivitt M, McLoughlin M, Perez C, Howell J, Weinstock GM, et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):888–891. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.888-891.2006>
4. Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Белоусова А.В. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*. Вестник дерматологии и венерологии. 2012;5:56–64. [Khairullin RF, Rotanov SV, Frigo NV, Belousova AV. Bioinformatic analysis of the specific antigens of *T. pallidum*. *Journal of Dermatology and Venereology*. 2012;5:56–64. (In Russ.)]
5. Рунина А.В., Хайруллин Р.Ф., Рог К.В., Семина В.И., Ротанов С.В. Новые рекомбинантные антигены *T. pallidum* Тр0453 и Тр0319 в диагностике сифилиса. Вестник дерматологии и венерологии 2014;3:72–78. [Runina AV, Khairullin RF, Rog KV, Semina VI, Rotanov SV. New recombinant *T. pallidum* antigens Тр0453 and Тр0319 in the diagnostics of syphilis. *Vestnik Dermatologii i Venerologii* 2014;3:72–78. (In Russ.)]
6. Рунина А.В., Затевалов А.М., Катунин Г.Л., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. Варьирование иммунного ответа на антигены Тр0277, Тр 0684, Тр 0965 и Тр 1038 *Treponema pallidum* при различных формах сифилиса. Российский иммунологический журнал. 2017;11(1):70–78. [Runina AV, Zatevalov AM, Katunin GL, Deryabin DG, Kubanov AA. Variation

of immune response to Tp0277, Tp 0684, Tp 0965 and Tp 1038 *Treponema pallidum* antigens in different syphilis stages. Russian Journal of Immunology. 2017; 1(1):70–78. (In Russ.)]

7. Runina AV, Katunin GL, Filippova MA, Zatevalov AM, Kubanov AA, Deryabin DG. 2018. Immunochip for syphilis serodiagnostics with the use of extended array of *Treponema pallidum* recombinant antigens. Bull Exp Biol Med. 2018;165(6):767–771. doi: <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4261-0>

8. Рунина А.В., Рог К.В., Васильев М.М. TpF1 — новый потенциальный антиген для серодиагностики скрытых форм сифилитической инфекции. Вестник дерматологии и венерологии. 2014;6:86–92. [Runina AV, Rog KV, Vasiliev MM. TpF1 — new potential antigen for serodiagnosis of latent forms of syphilis infection. Journal of Dermatology and Venereology. 2014;6:86–92. (In Russ.)]

9. Рунина А.В., Старовойтова А.С., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. Рекомбинантный белок Tp0965 *Treponema pallidum* как перспективный антиген для совершенствования серологической диагностики сифилиса. Вестник Российской академии медицинских наук. 2016;71(2):109–113. [Runina AV, Starovoitova AS, Deryabin DG, Kubanov AA. Evaluation of the recombinant protein Tp0965 of *Treponema pallidum* as candidate antigen for serological diagnosis of syphilis. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 2016;71(2):109–113. (In Russ.)]

10. Campo JJ, Romeis ER, Oberai A, Pablo JV, Hung C, Teng AA, et al. A novel pan-proteome array for high-throughput profiling of the humoral response to *Treponema pallidum* subsp. iScience. 2024;27(9):110618. doi: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110618>

11. Zhang X, Duan J, Wang Y, Xie B, Zhou J, Zhao S, et al. Insight into the invasion process and immune-protective evaluation of Tp0971, a membrane lipoprotein from *Treponema pallidum*. Microbiol Spectr. 2023;11(6):e0004723. doi: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00047-23>

12. Haynes AM, Konda KA, Romeis E, Siebert J, Vargas SK, Diaz MR, et al. Evaluation of a minimal array of *Treponema pallidum* antigens as biomarkers for syphilis diagnosis, infection staging, and response to treatment. Microbiol Spectr. 2024;12(1):e0346623. doi: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03466-23>

13. Deka RK, Brautigam CA, Tomson FL, Lumpkins SB, Tomchick DR, Machius M, et al. Crystal structure of the Tp34 (Tp0971) lipoprotein of *Treponema pallidum*: implications of its metal-bound state and affinity for human lactoferrin. J Biol Chem. 2007;282(8):5944–5958. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M610215200>

14. Brautigam CA, Deka RK, Ouyang Z, Machius M, Knutsen G, Tomchick DR, et al. Biophysical and bioinformatic analyses implicate the *Treponema pallidum* Tp34 lipoprotein

(Tp0971) in transition metal homeostasis. J Bacteriol. 2012;194(24):6771–6781. doi: <https://doi.org/10.1128/JB.01494-12>

15. ГОСТ Р 53022.3-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200072565>

16. Liu W, Deng M, Zhang X, Yin W, Zhao T, Zeng T, et al. Performance of novel infection phase-dependent antigens in syphilis serodiagnosis and treatment efficacy determination. Clin Chim Acta. 2019;488:13–19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.017>

17. Ijsselmuiden OE, Beelaert G, Schouls LM, Tank B, Stolz E, van der Groen G. Line immunoassay and enzyme-linked line immunofiltration assay for simultaneous detection of antibody to two treponemal antigens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1989;8(8):716–721. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01963758>

18. Xu M, Xie Y, Jiang C, Xiao Y, Kuang X, Zhao F, et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. Int J Infect Dis. 2016;43:51–57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.013>

19. Sun AH, Mao YF, Hu Y, Sun Q, Yan J. Sensitive and specific ELISA coated by TpN15–TpN17–TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum*. Clin Chem Lab Med. 2009;47(3):321–326. doi: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.071>

20. Smith BC, Simpson Y, Morshed MG, Cowen LLE, Hof R, Wetherell C, et al. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis. J Clin Microbiol. 2013;51(1):105–111. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-12>

21. Silva AO, de Oliveira UD, Vasconcelos LCM, Foti L, Leony LM, Daltro RT, et al. Performance of *Treponema pallidum* recombinant proteins in the serological diagnosis of syphilis. PLoS One. 2020;15(6):e0234043. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043>

22. Silva AO, Lima AA, Vasconcelos LCM, Almeida RA, Freitas NEM, Oliva TA, et al. Evaluating the diagnostic accuracy of TpN17 and TmpA recombinant proteins in syphilis detection: a phase II study. Front Microbiol. 2024;15:1348437. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1348437>

23. Chen D, He SWY, Fu Y, Zhao F, Zhou X, Yin H, et al. Assessment of recombinant antigens Tp0100 and Tp1016 of *Treponema pallidum* for serological diagnosis of syphilis. J Clin Lab Anal. 2022;36(9):e24635. doi: <https://doi.org/10.1002/jcla.24635>

24. de Sá Queiroz JHF, Barbosa DSM, Miranda LGO, de Oliveira NR, Dellagostin OA, Marchioro SB, et al. Tp0684, Tp0750, and Tp0792 Recombinant proteins as antigens for the

serodiagnosis of syphilis. Indian J Microbiol. 2022;62(3):419–427. doi: <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01017-w>

25. Pastuszczyk M, Kotnis-Gaska A, Jakubowicz B, Wojas-Pelc A. *Treponema pallidum*-specific immune responses and autoimmunity in patients who remain serofast after treatment of syphilis. Postepy Dermatol. Alergol. 2019;36(5):620–625. doi: <https://doi.org/10.5114/ada.2018.77497>

Участие авторов: все авторы несут ответственность за содержание и целостность всей статьи. Концепция и дизайн исследования — Н.В. Арбузова, М.В. Шпилевая; сбор и обработка материала — Г.Л. Катунин, О.Е. Кузнецов; написание текста — М.В. Шпилевая; редактирование — Н.Ю. Носов, В.С. Соломка.

Author contribution: all authors approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article. Concept and design of the study — Natalia V. Arbuzova, Marina V. Shpilevaya; collection and processing of material — Georgii L. Katunin, Oleg E. Kuznetsov; text writing — Marina V. Shpilevaya; editing — Nikita Yu. Nosov, Viktoriya S. Solomka.

Информация об авторах

***Арбузова Наталья Владимировна** — химик; адрес: 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6; ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9343-7191>; e-mail: arbuzova@cnikvi.ru

Шпилевая Марина Валентиновна — к.б.н., старший научный сотрудник; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9957-4009>; eLibrary SPIN: 6600-3311; e-mail: aniram1970@list.ru

Катунин Георгий Леонидович — к.м.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0599-6305>; eLibrary SPIN: 1598-8595; e-mail: g.katunin@rambler.ru

Кузнецов Олег Евгеньевич — к.м.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7571-7108>; eLibrary SPIN: 8600-3098; e-mail: k-o-e@mail.ru

Носов Никита Юрьевич — к.б.н., ведущий научный сотрудник; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3967-8359>; eLibrary SPIN: 8806-8539; e-mail: nnosov@cnikvi.ru

Соломка Виктория Сергеевна — д.б.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6841-8599>; eLibrary SPIN: 1486-3284; e-mail: solomka@cnikvi.ru

Information about the authors

***Natalia V. Arbuzova** — chemist; address: 3 bldg 6 Korolenko street, 107076 Moscow, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9343-7191>; e-mail: arbuzova@cnikvi.ru

Marina V. Shpilevaya — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9957-4009>; eLibrary SPIN: 6600-3311; e-mail: aniram1970@list.ru

Georgii L. Katunin — MD, Cand. Sci. (Med.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0599-6305>; eLibrary SPIN: 1598-8595; e-mail: g.katunin@rambler.ru

Oleg E. Kuznetsov — MD, Cand. Sci. (Med.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7571-7108>; eLibrary SPIN: 8600-3098; e-mail: k-o-e@mail.ru

Nikita Yu. Nosov — Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3967-8359>; eLibrary SPIN: 8806-8539; e-mail: nnosov@cnikvi.ru

Victoria S. Solomka — Dr. Sci. (Biology); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6841-8599>; eLibrary SPIN: 1486-3284; e-mail: solomka@cnikvi.ru

Статья поступила в редакцию: 31.07.24

Submitted: 31.07.24

Принята к публикации: 20.11.24

Accepted: 20.11.24

Опубликована онлайн: 25.11.2024

Published online: 25.11.2024

Таблица 1. Значения коэффициентов позитивности у здоровых лиц и в группах больных и уровень статистической значимости различий между группами по критерию Манна–Уитни

Table 1. Values of positivity coefficients in healthy individuals and in groups of patients and the level of statistical significance of differences between groups by the Mann–Whitney test

Группа индивидов	Диапазон значений	Среднее значение	<i>p</i>
<i>Tr0163</i>			
Здоровые (<i>n</i> = 20)	0,5–1,7	0,90	
Первичный сифилис (<i>n</i> = 15)	0,6–19,2	5,15	$p_{1,2} < 0,05$
Вторичный сифилис (<i>n</i> = 8)	2,7–27,7	19,96	$p_{1,3} > 0,05^*$
Ранний скрытый сифилис (<i>n</i> = 16)	0,8–32,0	10,17	$p_{1,4} < 0,05$
Поздний скрытый сифилис (<i>n</i> = 19)	1,2–12,5	4,34	$p_{1,5} < 0,05$

<i>Tr0971</i>			
Здоровые (<i>n</i> = 20)	0,3–1,8	1,18	
Первичный сифилис (<i>n</i> = 15)	1,7–19,9	6,54	$p_{7,8} < 0,05$
Вторичный сифилис (<i>n</i> = 8)	4,5–15,9	11,41	$p_{7,9} > 0,05^*$
Ранний скрытый сифилис (<i>n</i> = 16)	0,9–19,3	7,62	$p_{7,10} < 0,05$
Поздний скрытый сифилис (<i>n</i> = 19)	0,7–8,4	2,38	$p_{7,11} < 0,05$

Примечание. * — различия статистически незначимы.

Note. * — differences are statistically insignificant.

Таблица 2. Диагностические параметры рекомбинантных белков Tr0163 и Tr0971 как антигенов для определения антител класса IgG при сифилисе методом иммуноферментного анализа

Table 2. Diagnostic parameters of recombinant proteins Tr0163 and Tr0971 as antigens for syphilis diagnosis by the method of enzyme immunoassay

Диагностические характеристики	Tr0163	Tr0971
Общие (<i>n</i> = 58), %:		
Чувствительность	53,4	66,7
Специфичность	100,0	100,0
Положительная предсказательная ценность	100,0	100,0
Отрицательная предсказательная ценность	42,6	43,5
Диагностическая эффективность	65,4	66,7
Чувствительность (%) при определении:		
первичного сифилиса (<i>n</i> = 15)	40,0	66,7
вторичного сифилиса (<i>n</i> = 8)	87,5	100,0
раннего скрытого сифилиса (<i>n</i> = 16)	62,5	68,8
позднего скрытого сифилиса (<i>n</i> = 19)	31,6	15,8

Примечание. Параметры определялись в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008.

Note. Parameters were determined in accordance with GOST R 53022.3-2008.