Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 27, No. 4, 344–348 (1999)

경쟁적 효소면역 측정법을 이용한 *Treponema pallidum* 항체 진단시약의 개발 및 평가

김병문 · 이정환 · 정문섭 · 김승철 · 이미용 · 이성희 · 김원배*
동아제약(주) 연구소

Development and Evaluation of a Competitive Enzyme Immunoassay for the Detection of Antibodies to *Treponema pallidum*. Kim, Byong-Moon, Jeong-Hwan Lee, Moon-Sup Jeong, Seung-Chul Kim, Mee-Yong Lee, Sung-Hee Lee and Won-Bae Kim*. *Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd., Yong-in, Kyunggi-DO 449-900, Korea* – A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) was developed and evaluated. *T. pallidum* lysate was immobilized on the surface of microplate wells and horseradish peroxidase labeled human anti-*T. pallidum* was prepared and used as a tracer. The performance of the competitive ELISA was evaluated by using different specimens. The competitive ELISA showed a sensitivity of 100% in a performance panel consisting of serum and plasma with anti-*T. pallidum* reactivity ranging from negative to strong positive by FTA-ABS test system and 120 plasma samples positive by TPHA. The specificity of the competitive ELISA was 100% in 1,200 plasma samples collected from healthy seronegative blood donors. These results suggest that the competitive ELISA provides an excellent assay method for the detection of antibodies to *T. pallidum*, and may be particularly useful for serological blood screening of syphilis.

Key words : Syphilis, *Treponema pallidum*, Competitive ELISA, Conjugation

매독은 *Treponema pallidum*에 의해 감염되는 질환으로 주요감염경로는 성적접촉이며 그 밖에 태반을 통해 산모로부터 태아에 감염되거나 수혈에 의해서도 감염된다[6].

매독 검사방법으로는 병변에 존재하는 균을 직접 현미경으로 확인하는 방법이 사용되어왔으나 검출율이 낮고 검사과정이 복잡하고 어려워 최근에는 혈청학적 검사방법들이 주로 사용되고 있다[8, 15]. 혈청학적 검사방법으로는 reagin을 검출하는 Venereal Disease Research Laboratory(VDRL) 및 Rapid Plasma Reagin(RPR) 등의 비트레포네마 검사(non-treponemal test) 그리고 *Treponema pallidum* haemagglutination(TPHA), Fluorescence Treponemal Antibody absorption(FTA-ABS) 등의 트레포네마검사(Treponemal test)가 있다[2,18].

비트레포네마 검사방법은 간편성 및 경제성면에서 장점이 있으나 생물학적 위양성(biological false positive)이 문제가 되고 있다[7, 12]. 또한 높은 항체역가 검체의 경우 위양성이 많이 보고 되고 있다[9]. FTA-ABS 및 TPHA 등의 트레포네마 검사방법은 직접 매독균 항체를 검출하는 방법으로 민감도와 특이도가 매우 우수한 검사법이나 결과 판정시 주관적인 해석이 가능하고 자동화검사가 어려워 대량 선별검사에 적용하기 어렵다는 단점이 있다[4,8].최근에는 우수한 민감도 및 특이도를 나타내며 결과 판정이 객관적이고 자동화가 용이한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 들이 개발되고 있다[1, 14]. 본 연구에서는 경쟁적 효소면역 측정법을 이용한 매독항체 검출 ELISA를 개발하고 그 성능을 다양한 검체를 이용하여 평가하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-331-280-1300, Fax. 82-331-282-8564
E-mail: wbkim@donga.co.kr

재료 및 방법

검체

1998년 5월부터 9월까지 대한 적십자사 경기혈액원이 수집한 1,200개의 매독 음성 정상공혈자 혈장 sample 들을 제공받아 사용하였고, 매독항체 양성혈장 sample 들로는 1998년 5월부터 9월까지 대한 적십자사 경기혈액원, 동부혈액원 그리고 혈액수혈연구원등이 수집한 120개의 TPHA 양성 sample들을 사용하였다. 매독 검사시약들의 민감도 평가에는 Syphilis Mixed Titer Panel PSS201(Boston Biomedica Inc., USA)을 사용하였다.

항원 제조

항원 제조는 Victoria P. 등이 사용한 방법에 의해 실시하였다[17]. *T. pallidum* Nichols 균주를 토끼의 고환에 2×10^7 cells/ml의 농도로 *T. pallidum*을 주사하여 감염시키고 10일경과 후 토끼로부터 고환을 제거하여 34°C, PBS (phosphate buffered saline) 완충액에서 30분 동안 *T. pallidum*을 추출하였다. 이 추출액을 0.8 μm polycarbonate filter로

여과한 뒤 39,100×g에서 1시간 원심분리하여 *T. pallidum*을 침전시키고 과량의 PBS로 세 번 세척하였다. 세포농도가 2~4×10^9 *T. pallidum*/ml이 되도록 PBS로 희석한 후, 암시야 현미경으로 *T. pallidum*이 모두 파쇄된 것을 확인할 때까지 초음파 파쇄기로 1분에 6~8회씩 반복 파쇄하였다. *T. pallidum* 파쇄액을 39.100×g에서 1시간 동안 원심분리하여 침전물을 회수하고 원래 부피의 PBS에 녹인 후 *T. pallidum* 항원으로 사용하였다.

항체 - 효소 접합체 제조

접합체는 Nakane 등의 방법을 사용하여 제조하였다[11]. 매독 양성인 혈장으로부터 Protein G resin(Amersham Pharmacia Biotech., Sweden)을 이용한 친화성 크로마토그래피로 항 *T. pallidum* 항체를 포함한 IgG를 정제하였다. 고초냉이(horseradish) 과산화효소(Sigma, USA)를 sodium periodate($NaIO_4$)로 산화시킨 후 정제된 IgG와 반응하여 효소표지항체 접합체를 제조하였다. 효소표지항체 접합체 혼합물을 Ultrogel AcA34(Biosepra, France)를 이용한 겔 여과 크로마토그래피로 정제하여 높은 활성을 갖는 접합체만 분리하였다.

항원흡착 플레이트 제조

불활화된 *T. pallidum* 파쇄 항원을 0.1 M 인산염 완충액(pH 7.2)에 0.5 μg/ml 농도로 희석, 혼합하여 항원액을 조제한 후 polystyrene microplate(Nunc, Denmark)에 웰당 120 μl씩 분주하여 4°C 배양기에서 16시간 동안 반응하였다. 항원 흡착 반응 후 웰내부의 항원액을 흡입 제거한 후 소혈청 알부민이 1% 농도로 포함된 인산염 완충액으로 웰당 200 μl씩 분주하여 1시간 동안 실온에서 추가 반응하였다. 반응 후 각 웰을 tween 20이 0.05% 농도로 포함된 인산염 완충액으로 세척하고 air blower(Oyster bay, USA)를 사용하여 항원 흡착플레이트를 건조시켰다. 건조가 끝난 플레이트는 흡습제가 들어있는 알루미늄봉지에 밀봉, 보관하였다.

경쟁적 효소면역 측정법

본 연구에서 제조한 항원흡착 플레이트와 효소표지항체 접합체를 사용하여 다음과 같이 경쟁적 효소면역 측정법을 이용한 매독검사를 실시하였다. 검사에 필요한 수만큼 항원 흡착 플레이트의 스트립을 꺼내 스트립 홀더에 고정한 후 양성대조액(적량의 항 *T. pallidum* 양성혈장, 0.1 M 인산염 완충액, pH 7.2)과 음성대조액(25% 소혈청, 0.1 M 인산염완충액, pH 7.2)을 각각 2웰, 3웰에 30 μl씩 분주하고, 나머지 웰에 검체들을 30 μl씩 분주하였다. 검체가 분주된 각 웰에 효소표지항체 접합체를 100 μl씩 분주하고 잘 혼합한 다음 37°C에서 90분 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 세척액을 웰당 1회에 250 μl씩 첨가하여 5회 반복세척하였다. TMB 기질용액(0.1 mg/ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 0.01% H_2O_2, pH 5.5)을 플레이트 웰에 100 μl씩 분주하고 실온, 암소에서 20분간 반응하였다. 각 웰에 반응정지액(2 N H_2SO_4) 100 μl씩 넣어 효소반응을 중지시키고, 690 nm의 파장을 참조파장으로 하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조액의 흡광도 평균값에 0.7을 곱하여 판정기준치를 계산하고 검체의 흡광도값이 판정기준치보다 크면 음성, 작거나 같으면 양성으로 판정하였다.

혈청학적 검사시약

비교시험에는 국내 임상병리 실험실에서 널리 사용되는 외산 M사와 국산 A사의 TPHA 시약과 외산 C사와 B사의 ELISA 시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

Treponema pallidum 항원 제조

토끼의 고환으로부터 추출 정제한 *T. pallidum* 항원을 분석하기위해 SDS-PAGE를 수행하였다(Fig. 1). 파쇄된 항원에서 Norris가 밝혀낸 지질단백질인 TpN47(47 kD antigen), TpN29-35(34 kD antigen), TpN17(17 kD antigen), TpN15(15 kD antigen) band와 Flagellin인 TpN37(FlaA)와 그 주위의 희미한 TpN34.5(FlaB1), TpN33(FlaB2) band를 관찰함으로서, 파쇄된 항원이 항원흡착플레이트 제조시 매독항체들과의 반응에 중요한 단백질을 모두 포함함을 확인하였다[13].

인간 항 *Treponema pallidum* 항체 - 과산화효소 접합체 제조

TPHA titer가 2,560 이상인 매독항체 양성혈장에서 Protein

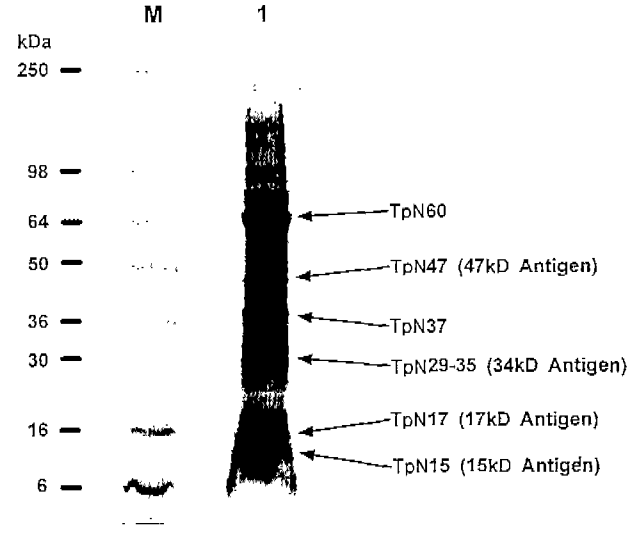
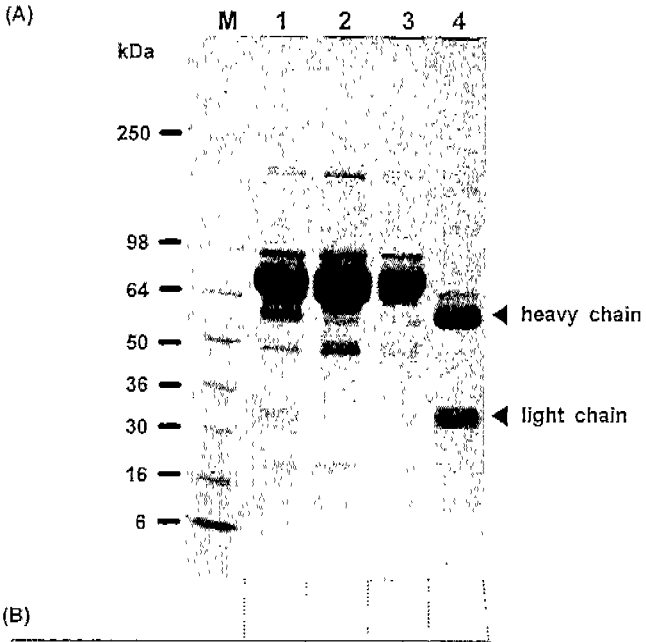


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of lysed *Treponema pallidum* (Nichols strain). Lane M; Size marker, Lane 1; Lysed *T. pallidum*. Antigens are designated according to Norris[13].

G 크로마토그래피를 이용하여 IgG를 정제하고 분석하였다. 항원흡착플레이트를 이용하여 정제한 IgG의 활성을 분석한 결과 정제된 IgG의 항체특이 활성이 정제전에 비해 7배 증가하여 매독항체가 고순도로 정제되었음을 확인하였다(Fig. 2). 정제항체를 과산화효소(HRPO)와 접합한 후 겔 여과 크로마토그래피로 접합체를 분리하였다(Fig. 3). 접합체 분획들의 성능실험을 위해 경쟁적 ELISA를 수행한 결과 5번부터 8번까지의 접합체 분획들에서 음성대조액 흡광도 평균값($Nc\bar{x}$)이 1.0 이상, $Nc\bar{x}/Pc\bar{x}$가 3.0 이상을 나타내어 높은 활성의 접합체가 제조되었음을 확인하였다. 또한, 높은 활성을 가진 분획들의 RZ(A_{280}/A_{403}) 값은 0.36~0.43으로 항체 1분자당 HRPO 2분자가 결합되었음을 알 수 있었다[11].

민감도 평가

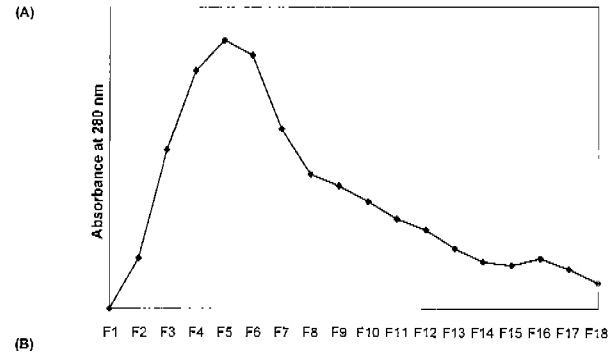
본 연구에서 개발한 경쟁적 효소면역 진단시약(Dong-A Syphilis)의 민감도를 Syphilis Mixed Titer Panel PSS201 (Boston Biomedica Inc., USA)과 대한 적십자사 혈액원



(B)

Abs. (450nm)	Specimen	0.440	1.059	1.200	0.108
	Negative Control	1.240			
Activity (ΔOD)		0.800	0.181	0.042	1.132
[a]Specific activity $\times 10^{-4}$		200	4.5	0.4	1416

Fig. 2. Purification of human anti-*Treponema pallidum* IgG by Protein G affinity chromatography. (A) SDS-PAGE analysis: Lane M; Size marker, Lane 1; TPHA positive human plasma, Lane 2; Protein G loading out, Lane 3; Protein G washing out, Lane 4; Purified IgG. (B) Results of a competitive ELISA in each purification steps. Activity (ΔOD) means difference in optical density between negative control and specimen. [a]Specific activity is indicated by ΔOD/protein (mg).



(B)

		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18
A_{450nm}	[a]$Nc\bar{x}$	0.076	0.358	0.678	0.905	1.494	1.214	1.150	1.035	0.930	0.727	0.600	0.515	0.507	0.543	0.591	0.610	0.563	0.542
	[b]$Pc\bar{x}$	0.050	0.153	0.260	0.325	0.397	0.301	0.256	0.241	0.234	0.173	0.150	0.142	0.150	0.155	0.186	0.213	0.161	0.151

(C)

RZ value		0.23	0.30	0.39	0.40	0.42	0.36	0.39	0.43	0.49	0.53	0.57	0.60	0.58	0.65	0.79	0.84	0.64	0.60

Fig. 3. Conjugation of human anti-*Treponema pallidum* IgG to HRPO. (A) Elution profiles of conjugate by gel permeation chromatography. (B) Results of the competitive ELISA using conjugate fractions (F1-F18). Sera collected from patients with syphilis and sera collected from healthy blood donors were used as positive control and negative control. (C) RZ value is the ratio of absorbance at 403 nm to absorbance at 280 nm (A_{403}/A_{280}). [a]$Nc\bar{x}$ represents the mean absorbance of the negative controls. [b]$Pc\bar{x}$ represents the mean absorbance of the positive controls.

등으로부터 제공받은 TPHA 양성검체들을 사용하여 평가하였다. Dong-A Syphilis는 Syphilis panel에서 FTA-ABS, TPHA 그리고 기존 EIA 양성으로 표시된 23 검체를 모두 양성으로 판정하였고(Table 1(A)), TPHA 양성인 120개 검체들에서도 모두 양성결과를 나타내었다(Table 1(B)). 동아 Syphilis는 Syphilis panel 자료에 나타나 있는 시험결과들을 참고로 비교할 경우 RPR 검사(18개/23개)보다 높은 민감도를 나타냈으며 FTA-ABS, TPHA 그리고 기존 EIA 시약들과는 동일한 감도를 보여주었다.

재현성 평가

재현성 평가는 Inter Assay와 Intra Assay의 2항목으로 평가하였다. Intra Assay는 동일인이 양성과 음성으로 확인된 5검체를 독립적으로 5회 반복하여 실험하였다. 각 검체에 대한 흡광도 평균과 표준편차를 이용하여 변이계수%(C.V)를 계산한 결과 4~10%로 균일한 재현성을 확인하였다(Table 2). Inter Assay는 서로 다른 4사람이 양성과 음성이 확인된 5검체를 시험하였다. 4사람의 시험결과를 이용하여 변이계수를 계산한 결과 6~11%를 나타내어 Inter Assay에서도 균일한 재현성을 확인하였다(Table 2).

특이도 평가

본 연구에서 개발한 Dong-A Syphilis의 특이도를 건강공혈자 혈장 1,200개(매독음성)를 사용하여 평가하였다. 1차 검사시 1200검체 중 2검체를 양성 판정하였으나 재검사결과 모두 음성을 나타내어 100%의 특이도를 나타냈다. 기존

Table 1. Sensitivity of Dong-A Syphilis competitive ELISA

(A) Syphilis Mixed Titer Panel PSS201 (Boston Biomedica. Inc., USA)

Specimen		Zeus[a]	Miles[b]	Wampole[c]	Centocor[d]	Dong-A Competitive
I.D. #	Type	FTA-ABS	TPHA	RPR	EIA	ELISA
PSS201-01	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-02	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-03	Serum	Reactive	Reactive	−		£´
PSS201-04	Serum	Reactive	Reactive	−	- -	−
PSS201-05	Serum	Nonreactive	Nonreactive	−	−	−
PSS201-06	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-07	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-08	Plasma	Reactive	Reactive£	+	+	+
PSS201-09	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-10	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-11	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-12	Serum	Reactive	Reactive	−	+	+
PSS201-13	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-14	Serum	Reactive	Reactive	−	+	+
PSS201-15	Plasma	Nonreactive	Nonreactive£!	−	−	−
PSS201-16	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-17	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-18	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-19	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-20	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-21	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-22	Plasma	Reactive	Reactive	−	+	+
PSS201-23	Serum	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-24	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+
PSS201-25	Plasma	Reactive	Reactive	+	+	+

[a]FTA-ABS Test System (Zeus Scientific Inc.), [b]Sera-Tek Treponemal Antibody Test/MHA-TP(Miles Inc.), [c]Wampole Impact RPRTM Card Test (Wampole), [d]CAPTIATM Syphilis-G (Centocor Inc.). Test results by FTA-ABS, TPHA, RPR and a commercial EIA were shown on the data sheet

(B) TPHA positive specimen

No. of specimen evaluated	No. of EIA reactives (%)	
	[a]Foreign Company	Dong-A Syphilis
120	120 (100)	120 (100)

[a]B Company

EIA와 TPHA 시약을 사용한 비교시험에서도 모두 항체 음성을 나타내었다. Dong-A Syphilis의 검체에 대한 판정 변별력을 분석하기 위하여 전체 시험검체들의 S/C(A_{sample}/cut-off) 비율 분포도를 작성하였다(Fig. 4). 각 검체의 판정기준치에 대한 흡광도 비율(S/C ratio)을 도식화하였는데 그 결과 1,320검체 중 5검체만이 판정기준치 주위 10% 구간에서 분포되어 Dong-A Syphilis는 검체에 대한 판정 변별력이 매우 우수하여 대량혈액 선별검사에 유용함을 알 수 있었다.

요 약

매독균(*Treponema pallidum*) 항체를 검출하기 위한 경쟁적 효소면역시험법을 개발하여 평가하였다. 매독균 파쇄액을 마이크로 플레이트 웰 표면에 흡착시키고, 사람 항 *T. pallidum* 항체에 고초냉이 과산화효소를 접합하여 발색제로 사용하였다. 경쟁적 효소면역시험법을 여러 검사시료들로 평가하였다. 경쟁적 효소면역시험법은 FTA-ABS에 의해 확인된 항 *T. pallidum* 항체를 가진 혈장 및 혈청으로 구성

Table 2. Reproducibility of Dong-A Syphilis competitive ELISA

(A) Intra Assay

Specimen	Mean ($\overline{X}$)	[a]S.D	[b]C.V %
Negative	1.856	0.109	5.9
Positive-1	0.336	0.029	8.6
Positive-2	0.540	0.024	4.5
Positive-3	0.281	0.028	9.8
Positive-4	0.199	0.020	10.1

(B) Inter Assay

Specimen	Mean ($\overline{X}$)	[a]S.D	[b]C.V %
Negative	1.812	0.190	10.5
Positive-1	0.305	0.035	9.6
Positive-2	0.574	0.049	8.5
Positive-3	0.309	0.033	10.7
Positive-4	0.204	0.013	6.2

$^{a}\text{S.D}\ (s) = \sqrt{\frac{1}{n}\sum(X-\overline{X})^2}$, $^{b}\text{C.V}\ \% = \frac{S}{\overline{X}} \times 100$

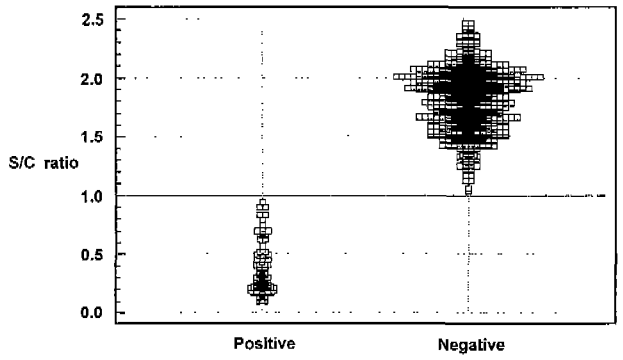


Fig. 4. Distribution of S/C (Signal/cut-off) ratio of test samples by competitive ELISA. Each symbol represents a value of S/C ratio on each test sample.

된 비교 panel 시험과 TPHA 양성확인 120 혈장시료시험에서 100%의 민감도를 나타냈다. 경쟁적 효소면역시험법은 건강공혈자로부터 수집된 1,200개의 혈장시료에서 100% 특이도를 나타냈다. 이상의 결과로 볼 때, 경쟁적 효소면역시험법은 매독균 항체를 검출하는데 매우 유용한 검사법이고, 특히 대량 혈액검사에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

REFERENCE

1. Anne E., Loic B., and Jean-Michel A. 1998. Evaluation of a new competitive immunoassay(bioelisa syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of syphilis. *J. Clin. Microl.* **36**: 358–361.
2. Carol E.F., Elizabeth F.H., Victoria P., Sandra A.L., and John C.F. 1986. Four serologic tests for syphilis: Results with comparison of selected groups of sera. *Sexually Transmitted Disease* **13**(4): 228–231.
3. CoDD A.A., Sprott M.S., Narang H.K., Crone P.B., and Turner R.H. 1988. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for *Treponema pallidum* antibodies. *J. Med. Microbiol.* **26**: 153–157.
4. De Majo E., Bianchini G., Parri F., Tocci E., Monaci M., and Paoli C. 1996. Evaluation of a competitive immunoassay in screening for syphilis. *Microbiologia* **19**: 31–38.
5. Forsgren A., and Sjoquist J. 1966. Protein A from S. aureus. Pseudo-immune reaction with human gammaglobulin. *J. Immunol.* **97**: 822–827.
6. Holly B.B., 1992. Syphilis: Review and Update of the New infection of the 90's. *Nurse Practitioner* **17**: 28–32.
7. Janice M.R., Cliff B., Dave M., and Stephen P.B. 1994. False-positive rapid plasma reagin tests in immunodeficiency virus infection and relationship to anti-cariolipin antibody and scrum immunoglobulin levels. *J. Infect. Dis.* **169**: 1356–1359.
8. J.J. van der Sluis. 1992. Laboratory techniques in the diagnosis of syphilis: A review. *Gemtourin Med.* **68**: 413–419.
9. Kathleen B., Laxmi B. and Harold E.F. 1999. False-negative syphilis screening: The prozone phenomenon non immuno hydrops, and diagnosis of syphilis during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**(3): 975–977.
10. Michael A.L. and James N.M. 1984. Purification of *Treponema pallidum*, Nichols strain, by percoll density gradient centrifugation. *Sexually Transmitted Disease* **11**(4): 275–286.
11. Nakane P.K. and Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **22**(12): 1084–1091.
12. Nandwani R. and Evans D.T.P. 1995. Are you sure it's syphilis? A review of false positive serology. International *J. STD & AIDS* **6**: 241–248.
13. Norris M. 1993. *Treponema pallidum* polypeptide research group. Polypeptides of *T. pallidum*; progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. *Microbiol. Rev.* **57**: 750.
14. Rodger P.S. 1995. Comparison of CAPTIA syphilis G enzyme immunoassay with rapid plasma reagin test for detection of syphilis. *J. Clin. Microl.* **33**: 1829–1831.
15. Sandra A.J., Bret M.S., and Andrew H.R. 1995. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin. Microbiol. Rev.* **Jan**: 1–21.
16. Sharon A.B., Ronald E.R., H. Hunter H., and Sheila A. L. 1986. IgG and IgM antibody reactivity to antigens of *Treponema pallidum* after treatment of syphilis. *Sexually Transmitted Disease* **13**(4): 214–220.
17. Victoria P. Elizabeth F.H., and John C.F. 1982. Evaluation of the microenzyme-linked immunosorbent assay with *Treponema pallidum* antigen. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 630–634.
18. Yong H., Moyes A., McMillan A., and Patterson J. 1992. Enzyme immunoassay for anti-treponemal IgG: Screening or confirmatory test? *J. Clin. Pathol.* **45**: 37–41.
19. Young H. 1992. Syphilis: new diagnostic directions. International *J. STD & AIDS* **3**: 391–413.

(Received April 14, 1999)