

Degree of Agreement between Phadia EliA ENA and Euroimmun line Immunoassay; Comparison of Two Methods to Evaluate the Ability to Detect ENA Antibodies

Hyun Yong Hwang

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan, Korea

Phadia EliA ENA와 Euroimmun line immunoassay의 일치도 분석; ENA 항체 검출 능력을 평가하기 위한 두 검사법의 비교

황현용

고신대학교 의과대학 진단검사의학교실

Objectives: The purpose of this study is to compare newly developed assay for identification of ENA antibody, Phadia EliA ENA with Euroimmun line immunoassay by analyzing the degree of agreement and the individual antibodies between two methods.

Methods: A total of 82 patient samples were used. Indirect immunofluorescence assay using Hep-2 cell was performed to screen the antinuclear antibody (ANA). Euroimmun line immunoassay (LIA) and Phadia EliA ENA assay were tested to identify the antibodies against extractable nuclear antigens (ENAs). Kappa statistics was used to evaluate the degree of agreement.

Results: Mean age of patients was 41.0 (8-79), and the M:F ratio was 21:61. ANA was positive in 74 samples, and negative were 8 samples. Kappa analysis of the 82 tested samples showed a moderate strength of agreement ($k = 0.521$, $P = 0.000$). There were differences in the order of identified individual antibodies between two methods (Ro > La = RNP > Centromere > Sm > Scl-70 in Phadia EliA ENA, Ro > RNP > Sm > La > Scl-70 > Centromere=Jo-1 in Euroimmun LIA). Ro antibody was most frequently identified in Phadia EliA ENA negative-Euroimmun LIA positive specimens (Ro > RNP = Jo-1 > La = Sm = Centromere > Scl-70).

Conclusions: A moderate strength of agreement was observed between the Phadia EliA ENA and the Euroimmun LIA. There seemed to be a significant difference in the ratio of individual antibodies, especially in the anti-Ro and Sm antibodies.

Key Words: Antinuclear antibody, Extractable nuclear antigen

일반적으로 extractable nuclear antigen (ENA)에 대한 항체 검사는 antinuclear antibody (ANA) 양성인 경우 시행된다. 즉, 간접면역형광염색법을 이용한 ANA 선별 검사에서 homogenous pattern, speckled pattern 등의 Hep-2 cell의 염색 형태에 따라 추가적으로 구체적인 ENA 항체 검사가 선택되어 시행된다.

ENA 항체의 동정은 자가면역 질환의 진단에 결정적인 역할을 하기 때문에 정확한 항체의 검출이 임상적으로 매우 중요하다.¹⁻³ Passive hemagglutination (HA), double immunodiffusion (DID), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 및 luminex-based assay와 같은 다양한 방법에 의한 ENA 항체 검출이 가능하다.⁴⁻⁶

Corresponding Author: Hyun Yong Hwang, Department of laboratory medicine, College of Medicine, Kosin University, 34 Amnamdong, Seo-gu, Busan, 602-702, Korea
TEL: 051) 990-6279 FAX: 051) 990-3010 E-mail: terminom@hanmail.net

Received: November 16, 2011
Revised: December 8, 2011
Accepted: December 26, 2011

자가면역 질환에서 이들 ENA항체의 검출에 있어 검사 방법에 따른 차이가 있기 때문에 질환의 진단에 대한 민감도와 특이도에 차이가 발생한다.

근래에 Phadia EliA ENA (Phadia, Uppsala, Sweden)가 소개되었으나 아직 널리 사용되지 않고 또한 기존의 검사법과 비교된 자료가 없다. 따라서 본 연구에서는 ENA 항체를 검출하기 위한 Phadia EliA ENA와 현재 널리 사용되고 있는 Euroimmun line immunoassay (EUROIMMUN, Lübeck, Germany)를 비교함으로써 두 검사법 간의 대체 가능성을 가늠해 보고 개별 항체 검출 능력의 차이를 평가하고자 하였다.

연구대상과 방법

1. 연구대상 및 디자인

2010년 6월부터 2011년 6월까지 ANA 선별 검사와 ENA에 대한 항체 검사를 시행한 환자 중 무작위로 추출된 총 82명의 환자 검체를 사용하였다.

2. 간접면역형광염색법(indirect immunofluorescence assay)

Fluoro HEPANA test (MBL, Nagoya, Japan)를 사용하였으며 제조자의 지시대로 시험하였다. 실험방법을 간략히 설명하면, HEp-2 세포를 기질로 사용하는 슬라이드에 환자의 혈청을 1:20으로 희석하여 떨어뜨린 후 실온에서 20분간 반응시키고 세척 후 FITC 형광물질이 부착된 2차 항체를 다시 반응시킨다. 실온에서 20분간 반응시키고 세척한 다음 암실에서 형광현미경으로 HEp-2 세포에 염색된 형광의 강도와 형태를 관찰한다.

3. Line immunoassay (LIA)

EUROLINE (EUROIMMUN, Germany)를 사용하였으며 제조자의 지시대로 시험하였다. 실험 방법을 간략히 설명하면, 모두 15개의 자가항체(RNP, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, Centromere, PCNA, ds DNA, Nucleosome, Histone, Ribosomal protein 및

AMA-M2)에 대한 항원이 부착된 직사각형의 기다란 막 스트립에 관찰하고자 하는 혈청을 떨어뜨린다. 5분간 반응을 시킨 후, 혈청을 흡인해 내고 다시 혈청으로 30분간 반응 시키고 세척해 낸 후 효소기질 반응을 위한 효소를 떨어뜨린다. 효소의 항체 부착 반응을 위해 30분간 반응 시킨 후 3회 연속 세척한다. 색소원이 부착된 기질을 떨어뜨려 효소기질 반응을 유발시킨다. 10분간 반응 시킨 후 증류수로 세척하고 물기를 흡인해 낸다. 항체가 부착된 밴드에 색소가 염색된 것이 관찰되며 스캐너와 판독 프로그램을 이용하여 판독한다. 검사를 시행한 15개 항체 중 Sm, RNP, Ro, La, Scl-70, Centromere 및 Jo-1 항체 검사 결과를 사용하였다.

4. Phadia EliA ENA

환자의 혈청을 사용하여 7종류의 자가항체(Sm, U1RNP, Ro, La, Scl-70, Centromere, 및 Jo-1) 검사를 자동화된 면역검사 장비인 Phadia 250 (Phadia, Uppsala, Sweden)에서 시행하였고 Euroimmun LIA 결과와 비교하였다.

5. 통계적 분석

두 검사법 간의 일치도(degree of agreement)를 분석하기 위하여 kappa 통계를 사용하였다. 각 통계적 분석에서 유의확률 P 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. 통계적 분석을 위해 SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

결 과

1. 환자 분포 및 ANA 검사 결과

총 82명의 환자 검체를 사용하였으며 남녀 비율은 M:F = 21:61이었고 평균 연령은 41.0세(8-79)였다. 74명의 환자 검체가 ANA 양성이었다고 8명의 검체는 음성이었다. HEp-2 세포의 염색 형태에 따른 분류에서는 homogenous pattern이 30검체, speckled pattern이 17검체, mixed pattern 이 8검체, discrete speckled pattern이 3검체, nucleolar pattern이 3검체, 그리고 cytoplasmic

pattern이 13검체였다.

2. 일치도(degree of agreement) 분석

비교 평가할 7개의 개별 항체에 대해 Phadia EliA ENA와 Euroimmun LIA 두 검사법에서 각각 양성, 음성으로 판정된 검체를 비교하였다. 이때 Euroimmun LIA에서 trace로 판정된 경우는 양성으로 간주하였고 Phadia EliA ENA에서 판독불가(equivocal)로 판정된 경우는 양성 혹은 음성 어떤 범주에도 포함시키지 않았다. 이러한 기준으로 비교하였을 때 74.39%에서 두 검사법의 결과값이 일치하였다(Table 1). Kappa 통계를 이용한 일치도 분석에서 중등도의 일치도를 나타내었다($k = 0.521$, $P = 0.000$).

3. 개별 항체 분포

두 검사법에서 개별 항체 검사 결과가 일치하는 경우는 82검체 중에 65검체(양성, 45검체; 음성, 16검체)였고 두 검사법에서 모두 양성(Phadia EliA ENA 양성-Euroimmun LIA trace 이상 양성)인 45검체에서 개별 항체가 일치하지 않는 경우는 2검체였다. 여기서 한 검체에서는 Phadia EliA ENA에서는 U1RNP 항체가 Euroimmun LIA에서는 Ro 항체가 검출되었고 나머지 한 검체에서는 U1RNP,

centromere, Ro, La, Scl-70이 Phadia EliA ENA에서 Ro 항체가 Euroimmun LIA에서 각각 검출되었다.

각 검사에서 개별 항체의 분포를 조사하였을 때 Phadia EliA ENA에서는 Ro 항체가 53.5%로 가장 높았고 La와 RNP가 18.3%로 두 번째로 많이 검출되었으며 나머지는 centromere, Sm 및 Scl-70 순서로 검출되었다(Table 2). Euroimmun LIA에서는 Ro가 35.8%로 가장 높았으나 Phadia EliA ENA와 달리 RNP (14.2%) 다음으로 Sm (13.5%)이 검출되었으며 La, Scl-70 순으로 그리고 Centromere와 Jo-1이 가장 낮게 검출되었다(Table 3).

4. Phadia EliA ENA 음성 Euroimmun LIA 양성 검체에서의 개별항체

Phadia EliA ENA에서는 음성이었으나 Euroimmun LIA 검사에서는 trace 이상인 17검체에서 개별 항체의 분포를 조사하였다(Fig. 1). 7개의 개별 항체의 검출 횟수는 중복을 허용하여 총 46회였다. 한 검체에서 여러 항체가 한꺼번에 검출되는 경우가 많았으며 Ro 항체가 11회 (23.9%)로 가장 빈번히 검출되었고 RNP와 Jo-1이 7회 (15.2%), La, Sm 및 Centromere 항체가 6회(13.0%), 그리고 Scl-70이 3회(6.5%) 검출되었다.

Table 1. Concordance between Phadia EliA ENA and Euroimmun LIA

		Phadia EliA ENA			Total
		Positive	Equivocal	Negative	
Euroimmun LIA	Positive	43	0	9	52
	Trace	2	2	8	12
	Negative	0	2	16	18
Total		45	4	33	82

Table 2. Individual antibodies in Phadia EliA ENA

ENA	Phadia EliA ENA		Total	%
	Positive	Equivocal		
Ro	36	2	38	53.5
La	11	2	13	18.3
U1RNP	12	1	13	18.3
Sm	1	1	2	2.8
Centromere	3	1	4	5.6
Scl-70	1	0	1	1.4
Total	64	7	71	100

Table 3. Individual antibodies in Euroimmun LIA

ENA	Euroimmun LIA		Total	%
	Positive	Trace		
Ro	44	9	53	35.8
La	13	6	19	12.8
RNP	18	3	21	14.2
Sm	7	13	20	13.5
Centromere	10	1	11	7.4
Scl-70	3	10	13	8.8
Jo-1	7	4	11	7.4
Total	102	46	148	100

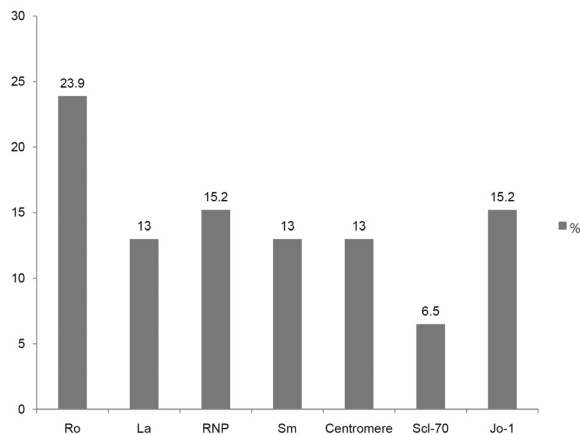


Fig. 1. Individual antibodies in Phadia EliA negative- Euroimmun LIA positive or trace

고찰

검사실에서 ENA 개별 항체의 동정은 자가면역질환의 진단에 매우 중요하다. 임상적으로 흔히 동정되는 항체인 Ro 항체의 경우 쇼그렌 증후군과 같은 질환의 진단과 밀접하게 연관되고,⁷ 간혹 간접면역형광법을 이용한 ANA는 음성이나 ENA는 양성인 경우가 있으며 간접면역형광법을 사용하는 경우 드물게 관찰된다.⁸⁻¹⁰ 본 연구에서도 ANA 검사 결과 음성인 8검체 중 7검체에서 ENA 항체가 검출되었다. 따라서 개별항체의 동정 능력이 환자의 예후에 매우 중요하게 작용할 수 있다.

ENA 항체를 검출에 Immunodiffusion assay를 사용할 경우 특이도가 떨어지는 단점이 지적되었고 ELISA는 검사 시간이 길고 노동 집약적인 단점이 있다.^{4,11,12} 그래서 최근에는 이러한 단점을 극복하고자 luminex-based assay와 같은 자동화된 검사법들이 소개되고 있다.¹³ 이러한 검사법들을 검사실에 도입할 때 가장 중요한 고려점 중 하나가 기존 검사법과의 일치도다. 즉, 노동력 해소와 재현성을 높이기 위해 자동화를 원하지만 검사 결과가 기존의 검사법과 의미있는 차이가 있다면 실제 사용하기는 어렵다.

Table 1에서 Phadia EliA ENA와 Euroimmun LIA 두 검사법이 74.4%에서 일치하였지만 kappa 통계를 이용한 일치도 분석에서는 중등도의 일치도를 나타내었다(k

= 0.521, $P = 0.000$). 따라서 두 검사법을 혼용하는데 큰 무리는 없어 보이나 17검체에서 Euroimmun LIA에서 양성이나 Phadia EliA ENA에서는 음성이었다. 동정된 총 항체의 검출 횟수를 보면 Phadia EliA ENA의 경우 71회였으나 Euroimmun LIA의 경우 148회로 모든 개별 항체가 높은 횟수로 검출되어 후자의 검사가 좀 더 민감해 보였다(Table 2, 3).

Fig. 1에서 Phadia EliA ENA에서는 음성이나 Euroimmun LIA에서는 양성인 항체로는 Ro 항체가 23.9%로 가장 높았다. Ro 자가 항체는 Ro60 혹은 Ro52 항원과 반응하는 항체의 결과물이며 반응 항원의 구성은 제조사에 따라 다르다. Phadia EliA ENA는 비록 52 kDa과 60 kDa 두 항원으로 구성되어 있다고 하지만 Euroimmun LIA처럼 Ro60과 Ro52를 각각 독립된 밴드에서 검출하고 있는 경우보다 검출력이 상대적으로 떨어져 보였다. 또한 ANA 선별 검사가 음성인 경우 Ro60은 음성이지만 Ro52는 양성인 경우가 있기 때문에 임상적으로 Ro52와 연관된 자가면역질환이 의심되는 경우에 ANA 선별 검사의 결과와 관계없이 Ro 자가항체 검사의 결과가 상대적으로 매우 중요하게 된다.¹⁴ 따라서 Ro 항체의 검출 능력이 쇼그렌 증후군과 같이 Ro 항체와 밀접하게 연관된 질환의 진단에 매우 중요하다.

RNP의 경우 Phadia EliA ENA에서 두 번째로 많이 검출되기는 하였으나 Phadia EliA ENA 음성이고 Euroimmun LIA 양성인 검체에서도 두 번째로 많아 두 검사법에서 차이가 있어 보였다. Sm 항체가 있는 경우 거의 모든 경우에서 RNP 항체가 함께 존재한다.¹⁵ 또한 RNP 항체가 높은 역가로 있으면서 Sm 항체가 없는 경우가 종종 mixed connective tissue disease (MCTD)에서 관찰된다.^{16,17} 따라서 RNP 항체와 Sm 항체의 정확한 검출은 진단에 매우 중요하다.

대략 40%의 RNP 항체는 U1 RNP에 결합하며,¹⁸ RNP 항체는 U1 snRNP-specific polypeptides (68K, A, 및 C 항원)와 반응하는데 68K U1 RNP가 MCTD RNP 항원의 주요 구성 성분이며,¹⁹ U1 RNP A와 C는 Sm 항원과 유사하다.²⁰ Euroimmun LIA에서 21검체에서 RNP가 양

성이었으며 이들 검체 중 17검체에서 Sm 항체도 검출되었다(81.0%). 반면에 Phadia EliA ENA에서는 U1 RNP 양성인 13검체 중 2검체에서만 Sm이 함께 검출되었다(15.4%). 따라서 두 검사법에서 RNP와 Sm 항체 비율의 차이는 두 검사법에 사용된 RNP 항원의 구성에 따른 효과로 사료된다.

결론적으로 Phadia EliA ENA를 사용하여 개별 항체를 동정하는 경우 Euroimmun LIA 검사법과 비교하였을 때 개별 항체의 검출에 있어 일부 항체의 차이가 있으나 전반적인 일치도를 감안할 때 두 방법 간에 의미있는 차이는 없었다. 다만, Ro 항체 및 RNP/Sm 항체 간의 비율을 포함하는 일부 ENA 항체의 검출에 차이가 있는 부분에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

참고문헌

- Orton SM, Peace-Brewer A, Schmitz JL, Freeman K, Miller WC, Folds JD. Practical evaluation of methods for detection and specificity of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:297-301.
- Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989;44:93-151.
- von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995;24:323-58.
- Kim Y, Park Y, Lee EY, Kim HS. Comparison of automated multiplexed bead-based ANA screening assay with ELISA for detecting five common anti-extractable nuclear antigens and anti-dsDNA in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta* 2012;413:308-11.
- Lora PS, Laurino CC, Becker BS, Monticelo OA, Brenol JC, Xavier RM. Clinical diagnostic performance of different methods for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens in connective tissue diseases: a cohort study. *Clin Lab* 2011;57:625-9.
- Siracusano A, Agelli M, Ioppolo S, Quintieri F, Bombardieri S. Detection of anti-extractable nuclear antigens in connective tissue diseases: comparison between passive hemagglutination, counterimmunoelectrophoresis and double immunodiffusion. *Ric Clin Lab* 1985;15:33-8.
- Fujimoto M, Shimozuma M, Yazawa N, Kubo M, Ihn H, Sato S, et al. Prevalence and clinical relevance of 52-kDa and 60-kDa Ro/SS-A autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:667-70.
- Thomson KF, Murphy A, Goodfield MJ, Misbah SA. Is it useful to test for antibodies to extractable nuclear antigens in the presence of a negative antinuclear antibody on Hep-2 cells? *J Clin Pathol* 2001;54:413.
- Manoussakis MN, Garalea KL, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Testing for antibodies to ENA and to dsDNA is not indicated in FANA-negative sera. *Clin Rheumatol* 1988;7:465-9.
- Malleson PN, Sailer M, Mackinnon MJ. Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic diseases. *Arch Dis Child* 1997;77:299-304.
- Sinico RA, Bollini B, Sabadini E, Di Toma L, Radice A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol* 2002;15 (Suppl. 6):S20-7.
- Fenger M, Wiik A, Hoier-Madsen M, Lykkegaard JJ, Rozenfeld T, Hansen MS, et al. Detection of antinuclear antibodies by solid-phase immunoassays and immunofluorescence analysis. *Clin Chem* 2004;50:2141-7.
- Desplat-Jego S, Bardin N, Larida B, Sanmarco M. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen for the detection of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:245-55.
- Hwang HY, Kim JK. Is there no need to perform an additional ENA antibody test when the ANA screening test is negative? : Association analysis between the results of ANA screening test by IIFA and those of Ro60 and Ro52 autoantibody tests by LIA. *Kosin medical journal* 2007;22:120-5.
- Van Venrooij WJ, Sillekens PT. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:635-45.
- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972;52:148-59.
- Sharp GC, Irvin WS, May CM, Holman HR, McDuffie FC, Hess EV, et al. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective-tissue disease, systematic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N Engl J Med* 1976;295:1149-54.
- Fritzer MJ and Elkon KB. Autoantibodies in SLE. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. *Rheumatology*. 3rd ed. NY: Mosby; 2003. P1340-1.

19. Francoeur AM. Anti-SM and anti-U1-RNP lupus antibody fine specificities. *J Clin Immunol* 1989;9:256-63.
20. Habets WJ, Sillekens PT, Hoet MH, McAllister G, Lerner MR, van Venrooij WJ. Small nuclear RNA-associated proteins are immunologically related as revealed by mapping of autoimmune reactive B-cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:4674-8.