

전신 자가면역질환에서 Line Immunoassay를 이용한 항 ENA항체 및 항 dsDNA항체의 검출

김지명¹ · 임춘화¹ · 신동혁² · 임미경² · 심승철²

울지대학병원 진단검사의학과¹, 류마티스내과²

Detection of Anti-ENA and anti-dsDNA Antibodies Using Line Immunoassay in Systemic Autoimmune Diseases

Ji Myung Kim, M.D.¹, Chun Hwa Ihm, M.D.¹, Dong Hyuk Sin, M.D.², Mi Kyung Ihm, M.D.², and Seung Chul Sim, M.D.²

Departments of Laboratory Medicine¹ and Rheumatology², Eulji University Hospital, Daejeon, Korea

Background : Detection of antibodies to extractable nuclear antigens (ENAs) and dsDNA is needed for the diagnosis of and predicting prognosis in systemic autoimmune diseases. Recently introduced line immunoassay (LIA) has the advantage of detecting several autoantibodies simultaneously, and we evaluated its usefulness in the diagnosis of autoimmune diseases in comparison with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Methods : Samples were collected from 437 patients referred by rheumatologists. FANA (fluorescent antinuclear antibody) test and LIA for the detection of 13 different autoantibodies, including 6 ENAs and dsDNA were performed. LIA-positive samples for ENA or dsDNA antibodies were further tested with ELISA. Final diagnosis was made by rheumatologists according to the diagnostic criteria. Agreement of results between LIA and ELISA was analyzed in 53 selected patients with systemic autoimmune diseases.

Results : The LIA detected antibodies to ENA and dsDNA in 118 and 22 patients, respectively, and ELISA detected 70.3% (83/118) and 45.5% (10/22) of LIA positive samples. Especially, 60.2% (71/118) of patients with positive ENA antibody on LIA was diagnosed as systemic autoimmune diseases. Patients having strong FANA titer and homogenous/speckled pattern showed higher prevalence of autoantibodies, but a small proportion of FANA negative patients also showed positive reactivity (LIA 10.8%, ELISA 5.2%). LIA showed a good agreement with ELISA for the anti-ENA antibodies ($\geq 80\%$), and a lower agreement for the anti-dsDNA antibody (67.9%).

Conclusions : LIA detecting several autoantibodies simultaneously might replace ELISA for anti-ENA antibodies, but not for anti-dsDNA antibodies. When LIA is performed considering clinical manifestations and FANA, it could contribute to the diagnosis of systemic autoimmune disease. (*Korean J Lab Med* 2008;28:353-61)

Key Words : Autoimmune disease, Anti-ENA antibody, Anti-dsDNA antibody, Line immunoassay

접 수 : 2008년 2월 18일

접수번호 : KJLM2121

수정본접수 : 2008년 6월 30일

게재승인일 : 2008년 7월 21일

교신저자 : 김 지 명

우 302-120 대전광역시 서구 둔산동 1306

울지대학병원 진단검사의학과

전화 : 042-611-3477, Fax : 042-611-3464

E-mail : jmkim@eulji.ac.kr

서론

전신 자가면역질환은 핵, 세포질 및 핵막의 특정 항원을 인지하는 자가항체의 존재를 특징으로 하는 질환이다. 항핵항체 (anti-nuclear antibodies, ANA) 검사는 전신 자가면역질환에

서 자가항체의 존재 유무를 검사하는 선별검사로 다양한 검사법이 있으나 현재는 HEp-2 세포를 이용하는 간접면역형광법(indirect immunofluorescent assay, IFA)과 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)이 주로 활용되고 있다. 그러나, ELISA법은 상대적으로 양성 예측도가 낮은 단점이 있어 형광 양상을 통하여 원인 항원의 추정이 가능한 IFA법의 FANA (fluorescent ANA)가 가장 일반적으로 이용되고 있다[1, 2].

자가면역질환에서 FANA 양성이면 특정 질환을 감별하기 위해 항 dsDNA 항체 및 항 추출성핵항원(extractable nuclear antigen, ENA) 항체 검사를 추가적으로 시행하며 이러한 검사의 순서를 따르는 것은 HEp-2 세포를 이용한 FANA가 자가항체 검출 시 비교적 높은 민감도를 나타내므로 적합한 것으로 받아들여져 왔다[3]. 그러나 최근 FANA가 일부 핵항원, 특히, SSA/Ro과 SSB/La에 대한 항체에 대해 위음성을 나타내는 경우도 있으며 FANA 음성의 경우에도 항 ENA 항체가 추가 검사상 증명됨이 보고되기도 하면서[4, 5] 항 ENA 항체의 검출에 있어 FANA 검사의 제한점이 알려졌다. 이는 FANA의 추가 검사로 한정되던 항 ENA 항체 검사의 적용이 보다 확대되어야 함을 암시한 것이나[4] 항 ENA 항체 검사의 확대 적용은 방법적, 비용적 측면에서 제한점이 있어 왔다.

현재 가장 일반적인 항 ENA 항체 검사법은 면역확산법, 역류면역전기영동, ELISA법이 있는데 면역확산법과 역류면역전기영동은 재연성이 우수하고 저렴하나 소요시간이 길고 민감도가 낮으며 해석 시 경험을 요하는 단점이 있어 상대적으로 민감도가 높고 소요시간이 짧으며 정량이 가능한 ELISA법이 도입되는 추세이다[6, 7]. 그러나, ELISA법의 항-ENA 항체 검사는 각각의 항체에 대한 동시 검사가 어렵고 증상이 유사한 류마티스성 질환의 특성상 임상 증상을 바탕으로 하는 임상상의 적절한 검사 선택은 제한적이므로 검사 비용의 상승을 초래할 가능성이 있다. 최근 ELISA법의 이러한 단점을 보완하여 여러 항체를 동시에 검사하는 line immunoassay (LIA)를 이용한 항 ENA 항체 검사가 개발되었는데 이전 보고에 의하면 LIA법은 민감도 및 특이도 면에서 기존의 검사법인 ELISA법에 뒤지지 않으며 비용 효율적이었다[7]. 그러나, 현재 국내에는 LIA법을 이용한 항 ENA 항체 검사의 임상적인 적용의 유용성을 평가한 연구는 없는 실정이다.

이에 저자들은 류마티스성 질환이 의심되는 환자군을 대상으로 진단시 기존의 선별검사인 FANA 검사 외에 LIA법을 이용한 항 ENA 항체 검사를 추가로 시행하여 진단상의 유용성을 평가하고 현재 항 ENA 항체 검사로 널리 쓰이는 ELISA법과 LIA법 간의 일치도를 비교하여 LIA법이 ELISA법을 대체할 수 있는지 보았다.

대상 및 방법

1. 대상

2005년 4월부터 2006년 12월까지 류마티스내과를 최초로 방문한 환자 중 FANA 검사상 형광 양상이 중심절 양상인 경우는 배제하고 437명을 대상군으로 하였다. 대상군 중 남자는 75명, 여자는 362명이었으며 평균 연령은 43.8 ± 13.1 세였다. 대상군의 임상 진단은 최초 내원 후 최소 1년의 추적 관찰 기간을 두어 증상 및 검사 소견을 바탕으로 임상상에 의해 결정되었다. 전신 자가면역질환은 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 쇼그렌증후군, 피부경화증 또는 전신피부경화증, 중첩증후군, 다발근육염으로 정의하였다.

2. IFA법을 이용한 ANA 검사

최초 내원 시 전신 자가면역질환의 진단을 위하여 선별검사로 FANA 검사를 실시하였다. 환자의 혈청을 phosphate buffered saline (PBS)으로 40배 희석한 후 HEp-2 세포가 고정된 슬라이드(Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA)에 도포하고 실온 암소에서 20분간 반응시켰다. 슬라이드는 PBS로 세척 후 FITC-labeled conjugate를 도포하여 실온 암소에서 20분간 반응시키고 PBS로 다시 세척 후 coverslip으로 덮어 형광현미경하에서 형광강도를 관찰하였다. FANA 검사상 양성인 경우 희석배수를 추가하여 정량검사를 시행하였으며 항체 역가가 1:80 이상인 경우 양성, 1:40의 경우는 약양성, 1:40 미만의 경우 음성으로 판정하였다. 모든 대상군에 대해 최초 검사 후 6개월 내 FANA 검사를 추가로 시행하여 항체 역가의 변화가 나타나지 추적 관찰하였다.

3. LIA법의 항 ENA 항체 및 항 dsDNA 항체 검사

항 ENA 및 항 dsDNA 항체 검사는 최초 내원 시 모든 대상군에 대해 LIA법(Euroimmun, Oberlausitz, Germany)으로 시행하였다. LIA법을 이용한 항체 검사는 6종의 ENA (RNP, Sm, SSA, SSB, Scl-70, Jo-1)가 분석 가능하였고 그 외 중심절, dsDNA, histone, PM-Scl, PCNA, ribosomal P 단백, 미토콘드리아 M2 항원에 대한 항체 분석도 가능하였다. 그러나, 본 연구에서는 추가적인 ELISA법 추가 검사가 가능한 6종의 ENA 및 dsDNA에 대한 항체만을 분석하였다. 검사 과정은 우선 검사용 스트립을 incubation tray의 각 채널 안에 넣은 후 완충액

을 분주하고 shaker에 올려놓고 5분간 전처리하였다. 전처리 후 환자의 혈청을 분주하고 shaker에 둔 상태로 30분, 실온에서 반응시키고 5분씩 3차례 세척 후 alkaline phosphatase labeled anti-human IgG를 분주하여 30분, 실온에서 반응시켰다. 5분씩 3차례 세척 후 기질액을 가하여 갈색의 대조선이 나타나도록 10분, 실온에서 반응시켰다. 10분 후 증류수를 가하여 반응을 중지시키고 3차례 세척한 후 결과는 스캐닝 프로그램을 활용하여 0에서 4+까지 반응강도로 표시하였다. 제조사 기준상 양성 판정 기준은 1+ 이상이였다.

4. ELISA법의 항 ENA 항체 및 항 dsDNA 항체 검사

LIA법에서 양성으로 판정된 해당 항체에 대해 ELISA법(Bio-Rad Laboratories)을 이용한 항체 검사를 추가로 시행하여 양성 여부를 재확인하였다. 희석액을 이용하여 40배(단, 항 dsDNA 항체 검사는 100배) 희석한 혈청을 해당되는 자가 항원이 부착되어 있는 well에 분주한 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 각 well의 혈청을 제거한 후 세척액을 가하여 well을 5차례 세척하였으며 마지막 세척 후에는 물기가 well에 남지 않도록 하였다. 세척 후 conjugate (Goat anti-human IgG horseradish peroxidase)를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 conjugate를 제거하고 well을 5차례 세척하였다. 기질액을 가하여 실온에서 30분간 반응시켜 well의 색상이 변화하면 반응 정지액을 가하였다. 450 nm에서 ELISA reader기로 well의 OD값을 측정한 후 calibrator의 OD값과 비교하여 항체가를 Enzyme Units

(EU) 혹은 International Units (IU)로 정량화하였다. ELISA법 상 양성을 판정하는 경계치는 항 ENA 항체는 25 EU, 항 dsDNA 항체는 30 IU이고 보고 가능범위는 0-200이었다.

5. 항 ENA 항체 및 항 dsDNA 항체의 LIA법과 ELISA법의 비교

대상군 중 최종적으로 전신 자가면역질환으로 진단된 환자 53명(20명의 SLE, 20명의 쇼그렌증후군, 9명의 피부경화증 또는 전신성 경화증, 3명의 중첩증후군, 1명의 다발근육염)을 선택하여 7종의 항체(6종의 항 ENA 항체와 항 dsDNA 항체)에 대하여 LIA법과 ELISA법을 이용한 검사를 시행하여 ELISA법에 대한 LIA법의 각 항체별 일치도, 불일치양성률 및 불일치음성률을 평가하였다. 각 항체별 일치도는 두 방법에서 동일한 결과를 나타낸 환자수의 %로 규정하였으며 불일치양성률은 ELISA 음성 중 LIA 양성인 환자수의 %로, 불일치음성률은 ELISA 양성 중 LIA 음성인 환자수의 %로 각각 정의하였다.

결 과

1. FANA 역가에 따른 항 ENA 항체의 양성을 분석

437명의 FANA 역가의 분포는 268명(61.3%)은 음성(<1:40), 39명(8.9%)은 약양성(1:40), 130명(29.7%)은 양성(≥1:80)이었다.

FANA의 역가에 따른 각 분류군에서 1단계 LIA법과 2단계

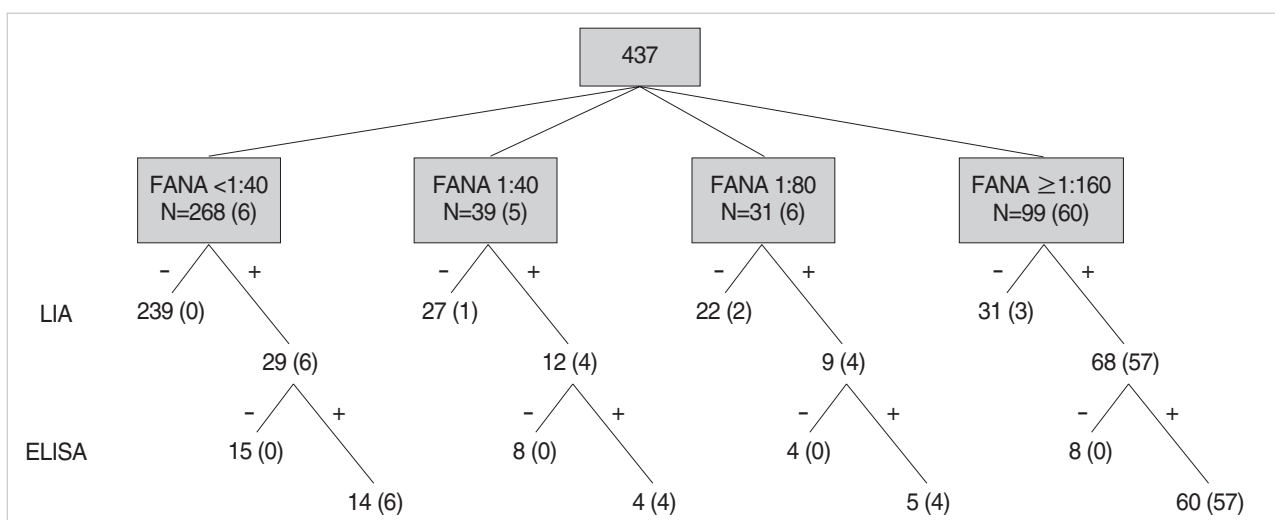


Fig. 1. Results of fluorescent ANA (FANA), line immunoassay (LIA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for anti-extractable nuclear antigen (ENA) antibodies in 437 patients. Numbers in parentheses represent the number of patients with systemic autoimmune diseases.

ELISA법에 의한 항 ENA 항체의 결과는 Fig. 1과 같았다. FANA 역가가 높을수록 1단계 LIA법에서 관찰된 자가항체가 2단계 ELISA법을 통해 양성으로 최종 확인되는 빈도가 보다 높음을 알 수 있었다.

임상 진단에서 FANA 음성군 268명 중 6명, FANA 양성군 169명 중 71명이 전신 자가면역질환으로 진단되어 FANA의 민감도는 92.2%, 특이도는 72.8%이었으며 양성 예측도는 42.0%, 음성 예측도는 97.8%이었다. 또한, 항 ENA 항체 LIA법의 경우 항 ENA 항체 LIA 음성군 319명 중 6명, 양성군 118명 중 71명이 전신 자가면역질환으로 진단되어 항 ENA 항체 LIA 검사법의 민감도는 92.2%, 특이도는 86.9%, 양성 예측도는 60.2%, 음성 예측도는 98.1%이었다.

1) ANA 음성군

내원시 ANA 음성을 나타낸 268명 중 239명(89.2%)은 LIA법의 항 ENA 항체 검사상 음성이었다. 이들은 최초 내원 후 추

적 관찰 기간 내 시행된 FANA 검사에서도 두 단계 이상의 의미있는 역가의 상승은 관찰되지 않았으며 임상 소견상 전신 자가면역질환의 진단 기준에 부합되지 않았다.

나머지 29명(10.8%)은 LIA법상 항 ENA 항체 양성 반응을 나타냈으며 24명은 한 종류의 항체에, 5명은 두 종류의 항체에 양성 반응을 보여 34예의 양성 반응이 관찰되었다. 34예의 양성 반응 중 14예는 1+, 20예는 2+ 이상의 반응강도를 나타냈다. ELISA법에 의한 항체 검사에서 14예의 LIA1+ 양성 중에서는 1예의 SSA(7.1%)만 양성을 나타낸 반면 20예의 LIA2+ 이상 양성 중에서는 16예(80.0%)가 양성을 보여 LIA법에서의 반응강도가 2+ 이상인 경우 ELISA법에서 일지된 양성 반응을 나타내는 비율이 높았다.

ELISA법으로 14명(5.2%)에서 17예의 항체가 최종 확인되었는데 항 SSA 항체(76.5%, 13/17)가 가장 많았고 항 SSB 항체(17.6%, 3/17)와 항 Jo 1 항체(5.9%, 1/17)가 일부를 차지하였으며 6명이 전신 자가면역질환으로 진단되었다(Table 1).

Table 1. Clinical findings and test results of 29 patients with negative FANA and positive ENA antibodies by LIA

No. Case	LIA (grade)	ELISA	Clinical diagnosis
1	SSA(3+)	Negative	Behcet's disease
2	SSA(3+)	Negative	Inflammatory arthralgia
3	SSA(3+)	Positive	Sjogren syndrome
4	SSA(3+)	Positive	Sjogren syndrome
5	SSA(3+)	Positive	Sjogren syndrome
6	SSA(3+)	Positive	Raynaud's syndrome
7	SSA(3+)/SSB(3+)	Positive/Positive	Sjogren syndrome
8	SSA(3+)/SSB(3+)	Positive/Positive	SLE
9	SSA(3+)/SSB(3+)	Positive/Positive	SLE
10	SSA(3+)/SSB(1+)	Positive/Negative	Raynaud's syndrome
11	SSA(3+)/SSB(1+)	Positive/Negative	Raynaud's syndrome
12	SSA(2+)	Negative	Rheumatoid arthritis
13	SSA(2+)	Positive	Rheumatoid arthritis
14	SSA(2+)	Positive	Arthritis
15	SSA(2+)	Positive	Adult onset Still's disease
16	SSA(1+)	Negative	Fibromyalgia
17	SSA(1+)	Negative	Fibromyalgia
18	SSA(1+)	Negative	Inflammatory arthralgia
19	SSA(1+)	Negative	Synovitis
20	SSA(1+)	Positive	Behcet's disease
21	SSA(1+)	Negative	Stomatitis
22	SSA(1+)	Negative	Stomatitis
23	SSA(1+)	Negative	Synovitis
24	SSB(1+)	Negative	Fibromyalgia
25	RNP(2+)	Negative	Osteoarthritis
26	RNP(1+)	Negative	Synovitis
27	Scl-70(1+)	Negative	Osteoarthritis
28	Jo-1(3+)	Positive	Polymyositis
29	Jo-1(1+)	Negative	Fibromyalgia

Abbreviations: FANA, fluorescent antinuclear antibodies; ENA, extractable nuclear antigen; LIA, line immunoassay; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; SLE, systemic lupus erythematosus.

2) ANA 약양성군

39명의 ANA 약양성군에서는 12명(30.8%)이 LIA법상 항 ENA 항체 양성 반응을 나타냈으며 9명은 한 종류의 항체에, 3명은 두 종류의 항체에 양성 반응을 보여 15예의 양성 반응이 관찰되었다. 15예의 양성 반응 중 LIA1+는 9예, LIA2+ 이상은 6예이었다. ELISA법상 6예의 LIA2+ 이상 양성 중 5예에서만 양성을 보였고 가장 빈도가 높은 것은 항 SSA 항체(80.0%, 4/5)이었다. ELISA법에서도 항체가 확인된 4명(10.3%)은 모두 전신 자가면역질환으로 진단되었고 FANA 검사상 모두 speckled 혹은 homogenous 양상을 띄었다. LIA법상 음성을 보인 27명 중 1명이 전신 자가면역질환이었으며 LIA법 양성이나 ELISA법에서 음성을 보인 8명은 전신 자가면역질환이 아니었다.

3) ANA 양성군

31명의 ANA 1:80 양성군에서는 9명(29.0%)이 LIA법상 항 ENA 항체 양성 반응을 나타냈으며 6명은 한 종류의 항체에, 3명은 두 종류의 항체에 양성 반응을 보여 12예의 양성 반응이 관찰되었다. 12예의 양성 반응 중 LIA1+는 3예, LIA2+ 이상은 9예이었다. ELISA법에서는 LIA2+ 이상 양성 중 6예에서만 양성을 보였다. ELISA법에서도 항체가 확인된 5명(16.1%) 중 4명은 전신 자가면역질환이었으며 FANA 검사상 모두 speckled 양상을 보였다. LIA법상 음성을 나타낸 22명 중 2명이 전신 자

가면역질환이었으며 LIA법 양성이나 ELISA법에서 음성을 보인 4명은 전신 자가면역질환이 아니었다.

99명의 ANA 1:160 이상의 양성군에서는 68명(68.7%)이 LIA법상 항 ENA 항체 양성 반응을 나타냈으며 19명은 한 종류의 항체에, 49명은 두 종류 이상의 항체에 양성 반응을 보여 123예의 양성 반응이 관찰되었다. 123예의 양성 반응 중 LIA1+는 16예, LIA2+ 이상은 107예이었다. ELISA상 60명(60.6%)에서 94예의 항체가 확인되었는데 모두 LIA2+ 이상의 양성이었다. 항체가 확인된 60명의 FANA 양상은 speckled 양상 28명, homogenous 양상 23명, 기타 형광 양상 9명이었으며 57명이 전신 자가면역질환으로 진단되었다. ELISA법에서 항체 음성을 보인 8명 중 임상적으로 전신 자가면역질환군에 포함되는 경우는 없었다.

ANA 1:160 이상의 양성이며 LIA법의 항 ENA 항체 검사상 음성을 나타낸 환자는 31명이었으며 3명이 전신 자가면역질환군이었다. FANA 역가별 분포는 1:160 역가군이 27명으로 가장 많았으며 1:320 역가군이 3명, 1:640 역가군도 1명이었다.

2. 항 dsDNA 항체 분석

LIA법상 항 dsDNA 항체는 대상군 437명 중 22명(5.0%)에서만 관찰되었다. FANA 음성군 7명은 LIA법상의 반응강도와

Table 2. Clinical findings and ELISA results of 22 patients with positive dsDNA antibody by LIA

No. Case	FANA titer	LIA (grade)	ELISA	Clinical diagnosis
1	Negative	dsDNA(3+)	Negative	Reactive arthritis
2	Negative	dsDNA(2+)	Negative	Behcet's disease
3	Negative	dsDNA(2+)	Negative	Fibromyalgia
4	Negative	dsDNA(2+)	Negative	Behcet's disease
5	Negative	dsDNA(1+)	Negative	Osteoarthritis
6	Negative	dsDNA(1+)	Negative	Osteoarthritis
7	Negative	dsDNA(1+)	Negative	Gout
8	Homogenous 1:40	dsDNA(1+)	Negative	Inflammatory polyarthropathy
9	Homogenous 1:40	dsDNA(1+)	Positive	SLE
10	Speckled 1:80	dsDNA(2+)	Positive	SLE
11	Homogenous 1:80	dsDNA(1+)	Negative	Synovitis
12	Speckled 1:160	dsDNA(2+)	Negative	Rheumatoid arthritis
13	Speckled 1:160	dsDNA(1+)	Negative	Rheumatoid arthritis
14	Homogenous 1:160	dsDNA(1+)	Negative	Stomatitis
15	Homogenous 1:640	dsDNA(2+)	Positive	Overlap syndrome
16	Homogenous 1:640	dsDNA(1+)	Positive	SLE
17	Homogenous 1:1,280	dsDNA(2+)	Positive	SLE
18	Speckled 1:1,280	dsDNA(1+)	Positive	SLE
19	Speckled >1:1,280	dsDNA(2+)	Positive	SLE
20	Homogenous >1:1,280	dsDNA(2+)	Positive	Overlap syndrome
21	Homogenous >1:1,280	dsDNA(1+)	Positive	SLE
22	Homogenous >1:1,280	dsDNA(1+)	Positive	SLE

Abbreviations: See Table 1.

Table 3. Agreement and discordances of LIA compared with ELISA in 53 patients with systemic autoimmune diseases

Group (Cutoff of LIA=grade 1)	No. of patients						
	SSA	SSB	RNP	Sm	Scl-70	Jo-1	dsDNA
ELISA+/LIA+	23	14	10	4	3	1	12
ELISA+/LIA-	0	0	1	0	0	0	8
ELISA-/LIA+	11	9	10	9	8	5	9
ELISA-/LIA-	19	30	32	40	42	47	24
Agreement (%)	79.2	83.0	79.2	83.0	84.9	90.6	67.9
PD (%)	36.7	23.1	23.8	18.4	16.0	9.6	27.3
ND (%)	0	0	9.1	0	0	0	40.0

Group (Cutoff of LIA=grade 2)	No. of patients						
	SSA	SSB	RNP	Sm	Scl-70	Jo-1	dsDNA
ELISA+/LIA+	22	14	10	4	3	1	9
ELISA+/LIA-	1	0	1	0	0	0	10
ELISA-/LIA+	5	4	5	2	2	1	2
ELISA-/LIA-	25	35	37	47	48	51	31
Agreement (%)	88.7	92.5	88.7	96.2	96.2	98.1	75.5
PD (%)	16.7	10.3	11.9	4.1	4.0	1.9	6.1
ND (%)	4.3	0	9.1	0	0	0	52.6

Agreement is defined as the concordance of the LIA with the ELISA. Positive discordance (PD) is calculated as the number of ELISA-/LIA+, divided by the total number of ELISA-. Negative discordance (ND) is calculated as the number of ELISA+/LIA-, divided by the total number ELISA+.

Abbreviations: ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; LIA, line immunoassay; ND, negative discordance; PD, positive discordance.

무관하게 ELISA법에서 모두 음성이었으며 임상소견상 SLE는 배제되었다. FANA 약양성군 2명에서 LIA1+가 관찰되었으며 SLE 1명만 ELISA법상 양성 반응을 나타냈다.

FANA 1:80 양성군 2명이 LIA법 상 각각 1+와 2+의 양성 반응을 나타냈으며, 이 중 2+를 보인 경우에만 ELISA법상 양성을 보였고 임상진단은 SLE이었다. FANA 1:160 이상 양성군에서는 6명은 1+, 5명은 2+를 나타내었는데, 이 중 4명의 1+, 4명의 2+만이 ELISA법상 양성을 보였고 6명은 SLE, 2명은 중첩 증후군으로 최종 진단되었다(Table 2).

3. 항 ENA 항체 및 항 dsDNA 항체의 ELISA법에 대한 LIA법의 일치도

전신 자가면역질환군 53명의 6종류의 항 ENA 항체의 ELISA법에 대한 LIA법의 일치도는 제조사의 양성 기준을 따를 경우 대부분 80% 이상이었으며 LIA 음성은 대부분 ELISA에서도 음성을 나타내는 반면 LIA 양성은 ELISA 음성으로 판명되는 불일치양성률이 높았다. 양성 기준을 2+ 이상으로 조정할 경우보다 일치도가 상승하며 불일치양성률도 감소하는 소견을 보였다. 그러나 항 dsDNA 항체의 두 방법 간 일치도는 67.9%로 다른 항 ENA 항체에 비해 낮았으며 불일치양성률뿐 아니라 ELISA 양성임에도 LIA상 음성을 나타내는 불일치음성률의 빈도도 높

았다(Table 3).

고 찰

항 ENA 항체의 분석은 다양한 전신 자가면역질환의 감별 및 예후에 중요한 작용을 한다. 예를 들어 항 Sm 항체는 SLE, 항 SSA 및 SSB 항체는 쇼그렌 증후군의 진단에 유용하며 항 Scl-70 항체는 전신피부경화증의 불량한 예후와 관련되어 있다[8, 9]. 이러한 항 ENA 항체 동정의 진단적 및 예후적 가치는 임상 의에 의한 검사의 요구도를 증대시켜왔다.

항 ENA 항체는 초기에는 면역확산법으로 주로 검사되었으나 80년대 초반 재조합 기술에 의한 ELISA법의 개발로 기존의 검사법이 ELISA법으로 많이 대체되었다. 그리고 최근에는 단독 항체 검사만이 가능한 ELISA법을 보완하여 서로 다른 항 ENA 항체들의 동시 검출이 가능한 LIA법이나 유세포분석법 등의 multiplex 방법들이 개발되었다[10, 11]. 특히, LIA법은 임상적 적용이 용이하여 수년간 여러 연구자들에 의해 유용성이 검토되어 왔다[7, 10]

항 ENA 항체의 검출에 있어 LIA법은 기존의 방법들과 비교해 우수한 민감도와 특이도를 나타내는 것으로 보고되어 왔으며 특히 민감도가 가장 우수하다고 알려진 ELISA법과의 일치도는 각각의 항체에 따라 70-90%이었다[7, 10, 12]. 본 연구에서도

53명의 전신 자가면역질환군에 대한 항 ENA 항체의 LIA법과 ELISA법 간의 일치도는 대부분 80% 이상으로 이전 보고와 유사하였다. 그러나, 항 dsDNA 항체의 LIA법과 ELISA법 간의 일치도는 항 ENA 항체와 비교하여 상대적으로 낮았다. 그리고, ELISA상의 양성을 LIA에서 검출하지 못하는 불일치음성의 빈도도 항 ENA 항체는 낮았으나 항 dsDNA 항체는 높았다. 또한, 1차 LIA법과 2차 ELISA법을 통한 자가항체의 확인 결과에서도 항 ENA 항체의 경우 LIA 양성인 ELISA 양성으로 확인되는 비율은 70.3%로 높았으나 항 dsDNA 항체는 45.5%로 낮았다. 이는 LIA법의 항 ENA 항체 검사는 ELISA법을 대체할 수 있으나 항 dsDNA 항체의 LIA법은 적합하지 않음을 나타내는 것이다.

한번의 검사로 동시에 주요 자가항체의 유무를 검토할 수 있는 LIA법의 항 ENA 항체 검사는 전신 자가면역질환의 진단에 있어 FANA 검사의 비특이적 양성 반응, 일부 항체에 대한 위음성과 같은 제한점을 보완하는데 도움이 되었으며 임상 증상 및 FANA 결과와 함께 판단될 경우 비교적 초기에 정확한 진단이 가능하였다.

FANA에서 1:40 이상의 양성이나 LIA법에서 항 ENA 항체 음성이었던 80명 중 6명의 SLE를 제외한 74명은 최종적으로 전신 자가면역질환이 아니었다. 이는 FANA 양성이나 항 ENA 항체 음성인 경우 일부 SLE의 가능성도 있으나 많은 경우 FANA의 비특이적 양성 반응임을 제시한 것이며 진단 시 유용할 것으로 사료되었다. 또한, 6명의 SLE는 ELISA의 항 dsDNA 항체에서는 모두 양성을 나타낸 반면 LIA에서는 3명만이 양성을 나타내어 항 dsDNA 항체 LIA법의 한계를 재확인할 수 있었다.

FANA 음성이나 항 ENA 항체가 확인되어 FANA 위음성으로 추측되는 경우도 빈도는 낮으나 관찰되었다. 이전에도 FANA 음성에서 항 ENA 항체의 빈도는 1-4%로 다양하게 보고되었는데[3, 4, 13] 본 연구에서도 FANA 음성의 5.2%에서 항 ENA 항체가 확인되었으며 항 SSA 항체가 가장 흔하였다. 이전 보고들과 비교하여 양성 빈도가 상대적으로 높았는데 이는 대상군의 선정상 류마티스성 질환이 의심되는 환자군이 다수 포함되었기 때문으로 추측하였으며 항 SSA 항체는 IFA의 기질세포의 개선에도 불구하고 FANA법으로 발견되지 않을 가능성이 높은 항체 중 하나임을 알 수 있었다. FANA 음성이지만 항 ENA 항체가 확인된 환자 중 일부는 전신 자가면역질환으로 진단되었으나 임상 진단이 분명하지 않은 경우도 있었는데 Arbuckle 등에 의하면 임상 증상이 분명해지기 수년 전부터 항 ENA 항체가 발현할 수 있다고 하였으므로[14] 이러한 환자들에 대해서는 지속적인 추적 관찰이 필요하리라 사료되었다. 그러나, 대부분의 FANA 음성은 항 ENA 항체 검사상 음성을 나타냈으며 이들은 추적 관

찰에서 전신 자가면역질환이 배제되었다. 항 ENA 항체 검사는 FANA 양성에서 시행되는 것이 유효하나 임상 증상이 의심되는 경우에는 FANA 음성이더라도 고려되어야 함을 알았으며 이는 Hoffman 등의 주장과 일치하였다[4].

항 ENA 항체의 존재는 SLE의 진단 시 ANA 양성과 함께 질환을 강력히 시사하는 소견이 되며[15] SLE 외의 다른 자가면역질환과도 밀접히 연관되어 있다. 본 연구에서도 LIA상 항 ENA 항체 양성을 나타낸 118명 중 71명(60.2%)이 최종적으로 전신 자가면역질환으로 진단되어 항 ENA 항체와 질환과의 높은 연관성을 확인할 수 있었다. 또한, 본 연구에서 LIA법의 항 ENA 항체 검사는 전신 자가면역질환의 진단 시 FANA와 비교하여 민감도는 동일하나 특이도 및 양성예측도가 더 우수하였다. 이는 시간, 비용 및 방법의 간편성 등 기존의 제한점을 개선한[16] 항 ENA 항체의 LIA 검사법이 전신 자가면역질환의 진단 및 감별 진단에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸 것이다.

그러나, 항 ENA 항체 LIA법은 FANA보다 고가의 검사비용이 소요되며 항 ENA 항체를 동반하지 않는 SLE의 진단에는 제한점이 있으므로 선별검사보다는 FANA의 추가 검사로 적절하리라 사료되었다.

항 ENA 항체 검사는 추가적인 비용이 소요되므로 비용적인 측면을 고려한 효율적 이용이 필요한데 특히, FANA의 형광 양상과 역가는 중요한 역할을 하였다. 이전 연구에 의하면 형광 양상은 homogenous 및 speckled 양상, 역가는 1:80을 초과하는 경우 항 ENA 항체의 양성률이 높은 것으로 보고되었다[13]. 본 연구에서도 LIA법과 ELISA법을 통해 항 ENA 항체가 확인된 빈도는 FANA 1:80 이하의 환자군(6.8%, 23/338)보다 FANA 1:160 이상의 환자군(60.6%, 60/99)에서 의미 있게 높았으며 FANA 1:40 이상의 양성군 중 항 ENA 항체가 확인된 69명 중 homogenous 및 speckled 형광 양상의 비율은 86.9% (60/69)로 다른 형광 양상보다 월등히 많았다. 그러므로 FANA 검사상 1:160 이상 역가를 보이며 homogenous 및 speckled 양상을 나타내는 경우는 전신 자가면역질환의 감별을 위하여 반드시 추가적인 항 ENA 항체 검사가 필요하고 FANA 역가는 낮으나 homogenous 및 speckled 양상인 경우는 임상 증상을 고려하여 선택적으로 항 ENA 항체 검사를 고려해야 한다. 그러나, FANA 역가가 낮고 homogenous 및 speckled 양상 외의 형광 양상을 나타내는 경우는 상대적으로 항-ENA 항체 검사의 효용성이 낮으므로 추가적인 검사는 불필요하다고 여겨졌다.

결론적으로 LIA법의 항 ENA 항체 검사는 기존의 ELISA법과의 일치도가 우수하므로 이를 대체하는 검사로 유용하였으나 항 dsDNA 항체 검사는 ELISA법과 비교 시 일치도가 비교적 낮

아 유용하지 않았다. 또한, LIA법의 항 ENA 항체 검사는 임상 증상 및 FANA 소견을 고려하여 시행된다면 전신 자가면역질환의 진단 및 감별을 위한 자가 항체의 증명에 도움이 될 것으로 사료되었다.

요 약

배경 : 항 extractable nuclear antigen (ENA) 및 항 dsDNA 항체 검사는 전신 자가면역질환의 진단 및 예후 예측에 필요하다. 최근 여러 새로운 검사법들이 소개되었는데 이 중 line immunoassay (LIA)법은 여러 항체를 동시에 검사하는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서 저자들은 LIA법이 자가면역질환의 진단시 유용한지 평가하고 효소면역법과 비교하고자 하였다.

방법 : 류마티스내과를 방문한 437명을 대상으로 간접면역형 광법의 항핵항체 검사(FANA)와 LIA법을 이용한 13종의 자가 항체(항 ENA 항체 6종 및 항 dsDNA 항체 포함)검사를 실시하였다. LIA법상 항 ENA 또는 dsDNA 항체 양성을 나타낸 경우에는 효소면역법으로 추가 검사를 시행하였다. 최종 진단은 진단 기준에 의거하여 임상상에 의해 이루어졌다. LIA법과 효소면역법간의 일치도는 437명 중 선택된 전신 자가면역질환군 53명에서 분석되었다.

결과 : 항 ENA 및 dsDNA 항체는 LIA법상 각각 118명, 22명에서 관찰되었으며 이 중 각각 83명(70.3%), 10명(45.5%)이 효소면역법에서도 양성을 보였다. 특히, LIA법상 항 ENA 항체 양성인 118명 중 60.2%는 전신 자가면역질환으로 진단되었다. 자가항체는 강한 FANA 역가와 homogenous/speckled 양상을 보이는 환자군에서 보다 높은 빈도로 관찰되었으나 FANA 음성군에서도 낮은 빈도(LIA법 10.8%, 효소면역법 5.2%)로 관찰되었다. 항 ENA 항체에 대해 LIA법은 효소면역법과 80% 이상의 일치도를 보였으나 항 dsDNA 항체는 비교적 낮은 일치도 (67.9%)를 나타냈다.

결론 : 여러 자가항체들을 동시에 검출할 수 있도록 고안된 LIA법은 항 ENA 항체의 경우 효소면역법을 대체할 수 있는 검사이나 항 dsDNA 항체 대체에는 부적합하였다. LIA법은 임상 증상과 FANA 소견을 고려하여 시행될 때 전신 자가면역질환의 진단에 기여하리라 사료된다.

참고문헌

1. Reisner BS, DiBlasi J, Goel N. Comparison of an enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of antinuclear antibodies. *Am J Clin Pathol* 1999;111:503-6.
2. 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.
3. Homburger HA. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease. *Mayo Clin Proc* 1995;70:183-4.
4. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clin Chem* 2002;48:2171-6.
5. Bossuyt X and Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples. *Clin Chem* 2005;51:2426-7.
6. Delpech A, Gilbert D, Daliphard S, Le Loet X, Godin M, Tron F. Antibodies to Sm, RNP and SSB detected by solid-phase ELISAs using recombinant antigens: a comparison study with counter immunoelectrophoresis and immunoblotting. *J Clin Lab Anal* 1993;7:197-202.
7. Lopez-Longo FJ, Rodriguez-Mahou M, Escalona-Monge M, Gonzalez CM, Monteagudo I, Carreno-Perez L. Simultaneous identification of various antinuclear antibodies using an automated multiparameter line immunoassay system. *Lupus* 2003;12:623-9.
8. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.
9. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363-73.
10. Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, Austen J, Tervaert JW. Evaluation of a novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:340-7.
11. Rouquette AM, Desgruelles C, Laroche P. Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Am J Clin Pathol* 2003;120:676-81.
12. Villalta D, Bizzaro N, Tonutti E, Visentin D, Manoni F, Piazza A, et al. Detection of anti-ENA autoantibodies in patients with systemic connective tissue disease. Analytical variability and diagnostic sensitivity of 4 methods. *Recent Prog Med* 1999;90:579-84.

1. Reisner BS, DiBlasi J, Goel N. Comparison of an enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of

13. Damoiseaux JG and Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev* 2006;5:10-7.
14. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Eng J Med* 2003;349:1526-33.
15. Sanchez-Guerrero J, Lew RA, Fossel AH, Schur PH. Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, and anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:1055-61.
16. Vos PA, Bast EJ, Derksen RH. Cost-effective detection of non-anti-double-stranded DNA antinuclear antibody specificities in daily clinical practice. *Rheumatology* 2006;45:629-35.