

A Study of the Standardization and the External Quality Assessment for Antinuclear Antibody, Anti-Double-Stranded DNA, and Anti-Extractable Nuclear Antigen Antibody Testing

Jaehyeon Lee^{1,2,3,*}, Dal Sik Kim^{1,2,3,*}, and Joonhong Park^{1,2,3}

¹Department of Laboratory Medicine, Jeonbuk National University Hospital, Jeonbuk National University Medical School;

²Research Institute of Clinical Medicine, Jeonbuk National University; ³Biomedical Research Institute, Jeonbuk National University Hospital, Jeonju, Korea

Corresponding author:

Joonhong Park
Department of Laboratory Medicine,
Jeonbuk National University Hospital,
Jeonbuk National University Medical
School, 20 Geonji-ro, Deokjin-gu, Jeonju
54907, Korea

Tel +82-63-250-1218

E-mail miziro@jbnu.ac.kr

*These authors contributed equally
to this work and shared the first
authorship.

Received: November 22, 2021

Revised: January 12, 2022

Accepted: January 17, 2022

This is an Open Access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution Non-Commercial License
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted
non-commercial use, distribution, and
reproduction in any medium, provided
the original work is properly cited.

Autoantibodies to nuclear antigens (antinuclear antibodies, ANAs), double-stranded DNA (dsDNA), and extractable nuclear antigens (ENAs) are useful for the early diagnosis and appropriate treatment of autoimmune diseases. This study aimed to investigate autoimmune tests' standardization and external quality assessment (EQA). To investigate the standardization and operational status of the EQA program for ANA, anti-dsDNA, and anti-ENA antibody testing, online resources were searched, including MEDLINE, PubMed, and Embase. The search terms used were autoimmune disease, ANA, indirect immunofluorescent assay (IIFA), anti-dsDNA, anti-ENA, international consensus/recommendation, or external quality assurance/assessment. Relevant peer-reviewed studies, reviews, and commentaries were also selected. The two reviewers independently assessed data quality, with selection standards based on consensus, recommendations, and assessment criteria. A total of 14 references for standardization (n=8) and EQA (n=6) were selected and provided valuable consensus guidelines for standardization and EQA programs for ANA, anti-dsDNA, and anti-ENA antibody testing. Clinical laboratories should perform IIFA-ANA, anti-dsDNA, and anti-ENA testing based on standard recommendations, actively participate in EQA, and conduct inter-trial tests to verify accuracy, if necessary. Through regular training, medical technicians should be familiar with the principle of the method, reagents, and report results. A laboratory physician should pay attention to the interpretation of results and discuss inconsistent test results with a clinician.

(Lab Med Qual Assur 2022;44:21-8)

Key Words Standardization, External quality assessment, Autoimmune diseases, Indirect immunofluorescent assay, Antinuclear antibody, Anti-dsDNA, Anti-extractable nuclear antigen

서론

자가면역질환은 세포의 핵, 세포질, 또는 표면 등에 존재하는 특정 성분(항원)에 대해 원인을 알 수 없는 하나 또는 두 종류 이상의 자가항체를 생성하는 전신성 면역질환이다. 자가면역질환은 American College of Rheumatology에서 정한 진단기준에 따라 진단하며, 일부 자가면역질환의 경우 특정 자가항체의 유무 확인이 진단에 도움이 되기도 한다. 그러나 자가면역질환은 보통 전신을 침범하는 다양한 임상증상을 보이고 임상증상이 서로 겹치기도 하며 원인이 뚜렷하지 않아 다른 질환과 감별이 쉽지 않다[1]. 항핵항체(anti-nuclear antibody, ANA) 검사는 자가면역질환에서 자가항체의 존재 유무를 확인하는 선별검사로 사용되며, 형광양상을 통하여 원인 항원의 추정 가능성이 높은 HEp-2 세포를 이용한 간접면역형광법(indirect immunofluorescent assay, IIFA)이 주로 사용되고 있다. IIFA-ANA 검사는 루푸스와 같은 특정 자가면역질환에서 높은 민감도를 보이며, 형광양상을 통하여 다양한 원인 항원을 추정할 수 있어 자가면역질환의 선별검사로 이용되고 있다. 그러나 검사마다 사용하는 시약 제조사, 혈청 희석배수, 참고치 등이 서로 다르고 형광양상의 판독과 보고에도 주관적인 요소가 있어 검사실 간의 표준화가 어려운 검사이다. 항 double-stranded DNA (dsDNA) 항체(anti-dsDNA antibody)는 dsDNA의 deoxyribose-phosphate determinant에 대한 자가항체이며, 루푸스 환자의 진단, 치료 및 예후판정에 가장 중요한 검사항목으로 루푸스의 진단기준에 포함되어 있는 표지항체이다. 추출성 핵항원(extractable nuclear antigen, ENA)은 다양한 조직으로부터 추출할 수 있는 수용성 고분자로, 항 ENA 항체검사에는 여러 종류의 자가항체가 포함되어 있고 개별 자가항체는 특정 자가면역질환의 진단에 필수적인 표지항체가 된다. 예를 들어 항 Sm, 항 rRNP, 항 PCNA 항체는 루푸스의 진단에, 항 Ro 항체와 항 La 항체는 쇼그렌증후군의 진단에, 항 RNP 항체가 단독으로 높은 역가를 나타내면 혼합결합조직질환의 진단에, 항 Scl-70 항체는 전신성 경피증의 진단에, 항 Jo-1 항체는 다발성 근염의 진단에 각각 유용한 자가항체이다. 자가면역질환에서 IIFA-ANA 양성일 경우, 특정 질환을 감별하기 위해 항 dsDNA 항체와 항 ENA 항체검사를 추가적으로 시행하며, 이러한 검사의 순서를 따르는 것은 HEp-2 세포를 이용한 IIFA-ANA가 자가항체 검출 시 비교적 높은 민감도를 나타내므로 적절한 검사의 순서로 인정되었다. 따라서 자가면역질환의 진단에 사용되는 체외진단검사에 대한 검사과정, 결과해석, 결과보고의 표준화 및 유지를 위한 외부정도관리(external quality assessment, EQA) 프로그램 운영을 통해 각 검사에 적용되는 검사원리, 기질, 희석배수 등의 검사요인과 판독, 보고 등의 표준화와 일치화에 대한 합의 또는 권고안이 필요하다.

본 연구에서는 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사에서 항핵/항 세포질/항유사분열 항체에 대한 HEp-2 세포 형광양상의 표준 명명법에 대한 권고안과 IIFA-ANA, 항 dsDNA 항체, 항 ENA 항체검사에 대한 표준화 및 정확도 평가를 위한 EQA 운영방안에 대해 조사연구를 시행하였다.

재료 및 방법

IIFA-ANA, 항 dsDNA 항체, 항 ENA 항체검사의 표준화 및 EQA 프로그램 운용 현황조사를 위해 관련 연구에 관한 문헌을 수집하기 위한 질환 영역의 주요어로 autoimmune disease, IIFA, ANA, anti-dsDNA, anti-ENA, international consensus, international recommendation, external quality assurance, external quality assessment를 사용하였다. 지침에 해당하는 주요어로는 consensus, recommendation, assessment를 사용하여 논리연산자 AND로 결합하여 검색하였다. 검색원은 국외 전자 데이터베이스인 MEDLINE (<https://www.nlm.nih.gov/medline/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBASE (<https://www.embase.com>) 사이트를 검색하였다. 1차 선정과정에서 제목 및 초록을 검토하여 관련이 없는 문헌을 배제하였으며, 2차 선정과정에서 전문을 확보하여 선정기준에 부합하는 지침을 최종 선정하였다. 선정기준은 다음과 같이 자가면역질환에서 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사의 표준화를 기술한 문헌, EQA 운영을 기술한 문헌, 국제적인 또는 조사지역 내 합의 또는 권고를 기술한 문헌, 표준화 및 EQA에 대해 체계적 근거를 기반으로 작성된 문헌 또는 표준화 및 EQA에 대해 체계적 동료검토를 기반으로 작성된 문헌을 선정하였다.

결과 및 고찰

1. 항핵항체, 항 dsDNA 항체, 항 ENA 항체검사에 대한 표준화

자가면역질환 관련 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사에 대한 포괄적인 표준화 권고안을 기술한 문헌 8편을 선정하였다[2-9]. 자가면역질환 관련 검사에 대한 표준화의 권고안에 대한 주요 내용은 다음과 같다. 자가면역질환의 진단과 치료를 위한 자가항체검사 시행 시 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사로 구성된 특이적인 체외진단 패널검사를 추천한다. IIFA-ANA 검사는 기본적으로 진단을 위해 시행하는 첫 단계의 선별검사이며 질환의 진행을 추적 관찰하는 목적을 위해 시행하지 않는다.

자가면역질환 관련 검사를 직접 수행하고 운영 관리하는 임상 검사실 관점에서 IIFA-ANA 검사의 결과보고를 표준화하는 것은 매우 중요하다. 루푸스 환자에서 IIFA-ANA 검사의 양성률은 95% 이상으로 보고되고 있으나 제한된 소수의 항원에 의존한 검사를 시행할 경우 낮은 양성률을 보일 수 있다. 또한 IIFA-ANA 검사는 자가면역질환, 악성종양, 감염질환뿐만 아니라 건강인에서도 검출될 수 있다. 따라서 어떤 종류의 ANA 검사를 시행하여도 검사 전 개연성에 의해 위양성률을 보일 수 있으며, 검사결과 해석은 환자의 임상증상을 고려해야만 한다. IIFA-ANA 검사를 시행할 경우, IIFA-ANA 형광양상에 대한 분류, 검사수행을 위한 최소한의 요구사항, 형광양상에 대한 기술, 추천하는 확진검사, 불일치 결과에 대한 해결방안, 세포질/유사분열 형광양상에 대한 분류 등에 대한 지침이 기술되어야 한다. IIFA-ANA 검사 시 추천되는 기질은 HEp-2 또는 HEp2000을 사용하고, 검사 슬라이드 내에 적절한 수와 비율로 간기세포와 중기세포가 분포해야 한다[2]. 특정 핵 항원의 혼합물로 제조된 ANA 검사를 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사로 기술해서는 안 된다[2]. 2차 conjugate는 fluorescein isothiocyanate (FITC) 또는 검증된 형광물질이 부착된 anti-human immunoglobulin G 특이항체를 사용해야 한다[2]. IIFA-ANA 형광양상을 보고할 경우에는 2명 이상의 검사자가 독립적으로 판독한 후 결과를 해석해야 한다. IIFA-ANA 양성인 경우, 질병 활성도를 평가하기 위해 형광양상과 최대 희석역가를 보고하는 것을 추천한다[3]. IIFA-ANA 역가의 양성 판정기준은 1:80 또는 1:160이고, 최대 희석역가를 보고할 경우 1:5,000 이상의 희석역가는 추천하지 않는다[3]. IIFA-ANA 검사의 형광양상 보고 시, 항핵 형광양상뿐만 아니라 항세포질 형광양상, 항유사분열 형광양상도 보고하는 것을 추천한다[4-8].

HEp-2 세포기질을 이용한 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사의 형광양상에 대한 구체적인 국제표준화 권고안은 선정기준에 따라 5개의 문헌이 선정되었다[4-8]. International Consensus on Antinuclear antibody Pattern에서 제안된 IIFA-ANA 형광양상의 명명법은 nuclear, nucleolar, cytoplasmic, mitotic으로 분류되어 기술되었다. HEp-2 세포의 형광양상은 AC-1에서 AC-28까지 총 28가지로 정의되었으며, 항핵 형광양상은 AC-1에서 AC-14까지, 항세포질 형광양상은 AC-15에서 AC-23까지, 항유사분열 양상은 AC-24에서 AC-28까지로 중분류되었다. 주요 항핵 형광양상은 homogeneous (AC-1), speckled (AC-2, AC-4, AC-5), centromere (AC-3), discrete nuclear dots (AC-6, AC-7), nucleolar (AC-8, AC-9, AC-10)로 소분류되었다. 항세포질 형광양상은 fibrillary (AC-15, AC-16, AC-17), speckled (AC-18, AC-19, AC-20), reticular/anti-mitochondrial antibodies (AC-21), polar/golgi-like (AC-22), rods and rings (AC-23)로 소

분류되었다. 항유사분열 양상은 centrosome (AC-24), spindle fibers (AC-25), nuclear mitotic apparatus-like (AC-26), intercellular bridge (AC-27), mitotic chromosome coat (AC-28)로 소분류되었다. 각 항핵 항체, 항세포질 항체, 항유사분열 항체의 형광양상에 대한 자세한 설명은 Table 1로 통합하여 기술하였다(Table 1).

항 dsDNA 항체를 검출하는 가장 적절한 검사법을 결정하는 것은 여전히 논쟁의 대상이다. 항 dsDNA 항체검사법 중 Farr assay와 Crithidia luciliae immunofluorescence test (CLIFT)는 높은 임상적 특이도를 제공한다[2]. Farr assay는 높은 결합항체 (avidity antibody)를 검출할 수 있으므로 루푸스 진단과 관련된 항 dsDNA 항체에 대해 특이적인 검사법이다. 그러나 Farr assay는 방사성 동위원소를 사용하고, 약물(예, anti-tumor necrosis factors)에 의해 유발된 항 dsDNA 항체를 검출할 수 있는 단점이 있다. CLIFT는 정량적 측정이 어렵고 상대적으로 낮은 민감도를 보인다. 항 dsDNA 항체를 검출할 수 있는 대체 검사법인 자동화 효소면역검사법은 높은 민감도를 제공하지만 낮은 특이도를 보이고 각 효소면역검사법 간의 상관성이 부족하다. 따라서 이러한 대체 검사법으로 검출된 양성 결과는 Farr assay와 CLIFT로 확인할 것을 추천한다. 그럼에도 불구하고 검사법 간 검사결과가 불일치한 경우, 검사결과를 모두 보고해야 한다. 이러한 경우 검사실은 정확한 결과해석을 위해 상세한 검사정보를 제공해야 하고 검사결과와 최종해석은 환자의 임상정보와 IIFA-ANA 형광양상을 고려하여 판정해야 한다[2]. 임상검사실에서 항 dsDNA 항체검사를 시행할 경우, 사용된 검사원리 또는 방법을 기술하고 사용된 검사방법의 양성 판정기준 검증과 정상 참고치를 검증해야 한다. 자가면역질환의 활동성 추적 관찰을 평가하기 위해 항 dsDNA 항체검사는 정량적 결과로 제공하는 것을 추천하고 객관적인 검사결과를 제공하기 위해 동일한 검사법으로 시행해야 한다. 검사원리가 다른 검사법으로 변경할 경우 기존 검사법과 상관성 비교평가를 시행하여 일치도를 확인해야 한다. IIFA-ANA 검사의 형광양상이 homogeneous인 경우 항 dsDNA 항체검사를 추가 시행할 것을 추천해야 한다. 그러나 IIFA-ANA 검사결과가 음성인 경우 항 dsDNA 항체검사의 추가 시행은 추천하지 않는다[2].

임상검사실에서 항 ENA 항체검사를 시행할 경우, 사용된 검사원리 또는 검사방법을 기술해야 하고, 가능할 경우 정량적 결과로 제공하는 것을 추천한다. 그리고 사용된 검사방법의 양성 판정기준 검증과 정상 참고치를 검증해야 한다. 항 ENA 항체검사를 다중 검사로 시행할 경우, 항 SS-A/Ro60, 항 SS-B/La, 항 Sm, 항 RNP, 항 CENP-B, 항 Scl-70, 항 Jo-1 항체를 포함해야 한다. 항 ENA 항체검사로 사용되는 항 Sm 항체는 SmD 항원에 특이적이어야 한다[3]. IIFA-ANA 검사가 양성인 경우 형광양상, 최대 희석

Table 1. International consensus for nuclear, cytoplasmic, and mitotic patterns associated with autoimmune diseases [4-8]

Patterns	Category	Synonyms	Related antigens	Related diseases
Nuclear pattern	Homogeneous (AC-1)	Diffuse	Double-stranded DNA, nucleosomes, histones	SLE, drug-induced lupus, juvenile idiopathic arthritis
	Speckled	Granular	hnRNP, U1RNP, Sm, SS-A/Ro (Ro60), SS-B/La, RNA polymerase III, Mi-2, Ku	MCTD, SLE, SjS, DM, SSs/PM overlap
	Dense fine speckled (AC-2)	None	DFS70/LEDGF	Rare in SLE, SjS, SSs
	Fine speckled (AC-4)	Fine granular	SS-A/Ro (Ro60), SS-B/La, Mi-2, TIF1, TIF1, Ku, RNAhelicaseA, ReplicationproteinA	SjS, SLE, DM, SSs/PM overlap
	Large/coarse speckled (AC-5)	Spliceosome/nuclear matrix	hnRNP, U1RNP, Sm, RNA polymerase III	MCTD, SLE, SSs
	Centromere (AC-3)	Kinetochore	CENP-A/B (C)	Limited cutaneous SSs, PBC
	Multiple nuclear dots (AC-6)	6–20 nuclear dots, NSpl, PML bodies	Sp100, PML proteins, MJ/NXP-2	PBC, SARD, PM/DM
	Few nuclear dots (AC-7)	1–6 nuclear dots, Cajal bodies	p80-coilin, SMN	SjS, SLE, SSs, PM
	Homogeneous nucleolar (AC-8)	None	PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleophosmin, nucleolin, No55/SC65	SSs, SSs/PM overlap
	Clumpy nucleolar (AC-9)	None	U3-snoRNP/fibrillarin	SSs
	Punctate nucleolar (AC-10)	Nucleolar speckled	RNA polymerase I, hUBF/NOR-90	SSs, SjS
	Smooth nuclear envelope (AC-11)	Nuclear rim, nuclear membrane, membranous	Lamins A, B, C, or lamin-associated proteins	SLE, SjS, seronegative arthritis
	Punctate nuclear envelope (AC-12)	Nuclear membrane pores	Nuclear pore complex proteins	PBC
	PCNA-like (AC-13)	None	PCNA	SLE, other conditions
	CENP-F-like (AC-14)	MSA-3, NSp-II	CENP-F	Cancer, other conditions

(Continued on next page)

Table 1. Continued

Patterns	Category	Synonyms	Related antigens	Related diseases
Cytoplasmic pattern	Linear/actin fibrillar (AC-15)	Actin-like	Actin, non-muscle myosin	MCTD, chronic active hepatitis, liver cirrhosis, myasthenia gravis, Crohn's disease, PBC, long-term hemodialysis, rare in SARD other than MCTD
	Filamentous/microtubules (AC-16)	None	Vimentin, cytokeratins	Infectious or inflammatory conditions, long-term hemodialysis, alcoholic liver disease, SARD, psoriasis, healthy controls
	Segmental fibrillary (AC-17)	None	Alpha-actinin, vinculin, tropomyosin	Myasthenia gravis, Crohn's disease, ulcerative colitis
	Discrete dots (AC-18)	GW body, processing body, lysosome	GW182, Su/Ago2, Ge-1	PBC, SARD, neurological and autoimmune conditions
	Dense fine speckled (AC-19)	Homogeneous	PL-7, PL-12, ribosomal P proteins	Anti-synthetase syndrome, PM/DM, SLE, juvenile SLE, neuropsychiatric SLE
	Fine speckled (AC-20)	Speckled	Jo-1/histidyl-tRNA synthetase	Anti-synthetase syndrome, PM/DM, limited SS, idiopathic pleural effusion
	Reticular/AMA (AC-21)	Mitochondrion-like	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1 subunit of PDC, E3BP/proteinX	Common in PBC, SS, rare in other SARD
	Polar/Golgi-like (AC-22)	None	Giantin/macrogolgin, golgin-95/GM130, golgin-160, golgin-97, golgin-245	Rare in SJS, SLE, RA, MCTD, GPA, idiopathic cerebellar ataxia, paraneoplastic cerebellar degeneration, viral infections
	Rods and rings (AC-23)	None	IMPDH2, others	HCV patients post-IFN/ribavirin therapy, rare in SLE, Hashimoto's and healthy controls
	Centrosome (AC-24)	Centrioles	Pericentrin, ninein, Cep250, Cep110, enolase	Rare in SS, Raynaud's phenomenon, infections
Mitotic pattern	Spindle fibers (AC-25)	MSA-2	HsEg5	Rare in SJS, SLE, other SARD
	NuMA-like (AC-26)	MSA-1	Centrophilin	SJS, SLE, other
	Intercellular bridge (AC-27)	Stem body, midbody	Aurora kinase B, CENP-E, MSA-2, KIF-14, MKLP-1	Rare in SS, Raynaud's phenomenon, malignancy
	Mitotic chromosome coat (AC-28)	Chromosome coat protein, dividing cell antigen, MCA	Modified histone H3, MCA-1	Rare in discoid lupus erythematosus, chronic lymphocytic leukemia, SJS, and polymyalgia rheumatica

Abbreviations: SLE, systemic lupus erythematosus; MCTD, mixed connective tissue disease; SJS, Sjögren's syndrome; DM, dermatomyositis; SS, systemic sclerosis; PM, polymyositis; PBC, primary biliary cirrhosis; SARD, systemic autoimmune rheumatic disease; AMA, anti-mitochondrial antibody; RA, rheumatoid arthritis; GPA, granulomatosis with polyangiitis; HCV, hepatitis C; IFN, interferon; NuMA, nuclear mitotic apparatus; MCA, mitotic chromosome autoantigen.

역가, 임상증상 등을 고려하여 질환 특이적인 항 ENA 항체검사를 시행할 것을 추천한다. IIFA-ANA 검사가 음성인 경우에도 자가면역질환이 강력히 의심되는 경우 임상증상과 관련된 질환 특이적인 항 ENA 항체검사를 시행할 것을 추천한다. 항 Jo-1 항체는 다발성 근염, 항 ribosomal P 항체는 루푸스, 항 SS-A/Ro 항체는 쇼그렌 증후군, 항 Sm/U1-RNP 항체는 루푸스, 항 anti-U1-RNP 항체의 단독 존재는 결합조직질환과 연관된 것으로 알려져 있다[2]. 임신을 원하는 자가면역질환 환자의 경우 주로 항 anti-Ro52/TRIM21 항체와 관련되므로 다중 항 ENA 항체검사를 시행하여 항 SS-A/Ro60 항체와 항 Ro52 항체를 동시에 평가하고 검사결과를 구분하여 보고해야 한다[2]. 임상검사실은 ANA 검사 시행 이후 검사결과에 따라 자동으로 항 dsDNA 항체검사와 항 ENA 항체검사를 추가 시행하는지 또는 임상과의 요청이 있는 경우에만 추가 시행하는지에 대한 검사지침이 필요하다[3]. 특이적인 ENA에 대한 항체에 대한 검사결과는 음성결과를 포함해서 각각 보고해야 하고, 항 ENA 항체검사가 음성이어도 기타 항 ENA 항체가 존재할 수 있음을 안내해야 한다. 항 dsDNA 항체검사와 항 ENA 항체검사 결과를 보고할 경우 ANA 검사결과를 참조할 수 있다[2].

IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사의 정상 참고치는 양성과 음성을 구분하는 기준이 된다. 양성 판정기준은 일반적으로 검사를 시행하는 지역의 인구 집단에서 나이와 성별이 비슷한 건강인의 혈청을 이용하여 결과 범위의 95% 이상으로 정의되어야 한다. 또는 적합한 자가면역질환 환자군과 건강인 대조군으로부터 적절한 수의 검체를 사용하여 receiver operating characteristic 곡선분석을 이용하여 정상 참고치를 정의한다[9].

2. 항핵항체, 항 dsDNA 항체, 항 ENA 항체검사에 대한 외부정도관리 프로그램 운영

자가면역질환 관련 검사인 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사의 EQA 운영에 관한 지침을 기술한 문헌 6편을 선정하였다[10-15]. 자가면역질환 관련 검사에 대한 EQA 운영을 위한 권고안의 주요 내용은 다음과 같다. EQA에 참여하는 임상검사실은 EQA 평가와 검사실 간 비교평가를 위한 인증을 위해 International Organization for Standardization (ISO) 15189와 ISO/International Electrotechnical Commission (IEC) 17043 지침을 참고한다[10]. ISO 15189 지침은 일반적인 임상검사분석의 검사단계에서의 정도관리 평가를 목적으로 한다. 평가항목은 경영능력 및 공정성 심사기준, 계약 검토, 자격에 따른 인력의 역량, 준수 평가, 자문 서비스, 역량 평가, 전문성 개발, 검사환경, 검사장비, 검사 전 단계 평가, 검사 단계 평가, 결과보고를 포함한 검사 후 단계 평가

등을 포함한다. ISO 15189 지침은 관리(management)와 기술(technical) 분야로 나뉘어지는데, 기술분야는 검사 전 과정에 대한 이행과 EQA 프로그램에 선택적인 참여를 포함하고 있다. 특히 ISO/IEC 17043 인증 EQA 프로그램에 참여할 것을 추천하고 있다[10]. ISO/IEC 17043에 기반한 EQA 프로그램 시행 시, 검체 안정성, 검사결과 취급과 보고, 합의에 도달하지 못한 참여기관에 대한 통계적인 인증 감시체계 등 EQA 운영에 대한 전반적인 사항이 기술되어야 한다. ISO/IEC 17043 지침에 기반한 EQA를 운영할 경우 EQA용 정도관리물질의 안정성, EQA 결과의 분석 및 배포, 부적격 참여기관에 대한 인증감시체계 운영사항 등을 명시해야 한다[10]. 검사의 정확도에 대한 기준검사법이 존재하지 않을 경우 동일한 검사원리 또는 검사법별로 참여기관의 검사결과를 비교 분석하여 부분적으로 정확도 검증은 시행할 수 있다. EQA에 참여하는 참여기관에 대한 검사실 인증은 검사실 간에 질 관리 중심의 경쟁을 유도하고 검사의 표준화를 높일 수 있다[10].

EQA용 정도관리물질을 제조할 경우, 다수의 환자의 잔여혈청을 혼주하는 것보다는 헌혈 또는 치료적 혈장교환술 등으로 수집된 단일 환자 유래의 잔여 검체를 추천한다. 루푸스로 진단받은 한 명의 환자에서 혈장교환술을 시행한 후 잔여 혈장을 이용하여 항 dsDNA 항체검사의 EQA 평가를 위한 World Health Organization (WHO) 표준물질이 제조되어 평가되었다[11]. 제조된 WHO 표준물질은 WHO Standard 15/174로 명명되었고, 물질의 안정성은 -20°C에서 0.09%/yr의 감소를 보였다. 제조된 WHO 표준물질은 42개 유럽 임상검사실이 참여하는 EQA에 사용되어 항 dsDNA 항체검사와 ANA 검사항목에서 각각 anti-dsDNA와 homogeneous 또는 AC-1 형광양상으로 보고되어 검사실 간 우수한 일치도를 보였다[11]. WHO Standard 15/174는 100 units/ampoule 수준에서 항 dsDNA 항체검사에 대한 WHO 표준물질로 승인되었고 구매하여 사용 가능하다(https://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=15/174). EQA용 정도관리물질 제조를 위해 고려해야 할 주의사항으로는 주요 바이러스 감염을 예방하기 위해 B형 간염, C형 간염, 인간 면역결핍 바이러스의 항원항체검사상 음성인 잔여 검체로 제조해야 한다[12].

EQA용 정도관리물질의 구성은 다음과 같다. IIFA-ANA 검사의 경우 1개의 음성 검체와 역가 1:80 이상인 서로 다른 형광양상을 나타내는 2개 이상의 양성 검체를 포함해야 한다[12,13]. 그리고 양성 검체의 형광양상은 복합형광양상(예, homogenous와 nucleolar)이나 드문 형광양상(예, cytoplasmic)을 선택할 경우 흔히 검출되는 단일형광양상(예, homogenous, speckled)과 함께 구성해야 한다[14]. EQA용 정도관리물질을 평가기관에 배포하기 전에 3개 이상의 임상검사실에서 정확도 검증은 시행하여 검사

결과가 모두 일치할 경우에만 배포한다. EQA용 정도관리물질을 평가기관에 배포할 경우, 냉동(-20°C 이하)으로 익일배송을 추천한다. EQA에 참여하는 임상검사실은 EQA용 정도관리물질을 수령한 후 즉시 냉동보관하고, EQA 시행 전 물질을 용해하여 냉장보관한 후 실온에서 가동화한 후 검사를 시행해야 한다[12]. EQA에 참여하는 임상검사실은 IIFA-ANA, 항 dsDNA 항체, 항 ENA 항체 검사의 EQA 결과 작성 시, 사용 중인 검사원리, 사용 중인 시약의 항원세포 종류, 사용 중인 시약의 lot 번호, 사용 중인 시약의 제조일, IIFA-ANA 양성일 경우 보고하는 형광양상의 종류, 희석역가, 현미경의 배율 등을 보고할 것을 추천한다[12,13]. 이러한 검사정보는 EQA에 참여하는 임상검사실 간 EQA 결과가 불일치할 경우 원인분석에 활용되어 검사결과의 동등도 및 일치도 향상에 도움을 줄 수 있다.

IIFA-ANA 검사를 자동 이미지 분석프로그램을 이용하여 결과 판독을 할 경우에도 임상검사실 간에 양성 형광양상과 최종 희석역가의 일치도 향상을 위한 EQA가 필요하다. 평가항목에는 이미지 자동분석에 사용되는 현미경의 종류, 현미경의 배율, FITC 이미지를 확인하여 양성 여부를 판정하는 평균 형광강도 값, 기본적으로 구분할 수 있는 양성 항핵 형광양상(예, homogenous, speckled, centromere, nucleolar, nuclear dots) 특이희석곡선을 이용하여 측정된 평균 형광강도의 최종역가 등을 포함한다. 또한 검사결과를 최종 판정할 경우, 자동 이미지 분석프로그램의 결과를 그대로 통보하는지 또는 추가적인 검사자의 수검을 시행하는지도 기술되어야 한다[15].

결론

자가면역질환에서 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사를 시행하는 것은 자가면역질환 환자의 진단 및 치료에 있어 필수적인 요소이다. 따라서 신규 검사체계에 대한 임상검사실 검증, 서로 다른 인구집단에서 자가항체 역가와 자가항체 양상의 차이점, 자가면역질환의 다

른 진행양상(예, pre-clinical vs. fully established; active vs. quiescent), 수기검사법으로 시행 시 고려되는 여러 제한점을 극복하기 위해 적절히 설계된 EQA가 필요하다. EQA 운영을 통해 검사실 간 검사결과의 동등성 및 일치도와 표준화를 확보하고, 각 자가항체검사법의 표준화를 위한 합의와 권고안을 도출할 수 있는 노력이 필요하다. 다양한 종류의 검사법으로 시행한 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사 결과의 동등성과 일치도를 표준화하기 위해 검사자 간, 임상 의사 간 뿐만 아니라 검사실 관리 의사 간에도 합의가 필요하다. 또한 자가면역 진단영역에서 체외진단검사를 수행하고 결과를 해석하는 검사자를 위한 교육이 강조된다. 자가면역질환과 관련된 새로운 자가항체를 발견하고 새로운 검사원리와 검사법을 개발하기 위해 체외진단기기산업 종사자를 위한 교육프로그램도 필요하다. 결론적으로, 임상검사실은 자가면역질환 관련 IIFA-ANA를 이용한 ANA 선별검사, 항 dsDNA 항체검사, 항 ENA 항체검사를 표준 권고안에 근거하여 운영해야 하고, 적극적으로 EQA에 참여할 뿐만 아니라 필요 시 정확도 검증을 위한 검사실 간 비교검사를 시행해야 한다. 검사자는 정기적인 교육을 통해 자가면역질환 검사원리, 검사법, 검사시약, 결과보고 등을 숙지해야 한다. 검사 의학 전문의는 결과 판독 및 해석에 주의하고 불일치 검사결과에 대해 임상 의사와 논의해야 한다.

감사의 글

이 연구는 대한임상검사정도관리협회의 2018년도 학술연구과제 연구비(과제번호: 2018-11) 지원으로 수행되었다.

ORCID

Jaehyeon Lee	https://orcid.org/0000-0003-3211-8903
Dal Sik Kim	https://orcid.org/0000-0001-7467-2086
Joonhong Park	https://orcid.org/0000-0001-7354-4234

REFERENCES

1. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1151-9.
2. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17-23.
3. Van Blerk M, Bossuyt X, Humbel R, Mewis A, Servais G, Tomasi JP, et al. Belgian recommendations on ANA, anti-

- dsDNA and anti-ENA antibody testing. *Acta Clin Belg* 2014;69:83-6.
4. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015;6:412.
 5. Chan EK, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PL, et al. Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus* 2016;25:797-804.
 6. Damoiseaux J, von Muhlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, et al. International Consensus on ANA Patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto Immun Highlights* 2016;7:1.
 7. Bizzaro N, Bossuyt X, Haapala AM, Shoenfeld Y, Sack U. Accreditation in autoimmune diagnostic laboratories: a position paper of the European Autoimmunity Standardisation Initiative (EASI). *Autoimmun Rev* 2017;16:81-6.
 8. Herold M, Klotz W, Andrade LE, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Damoiseaux J, et al. International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns: defining negative results and reporting unidentified patterns. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1799-802.
 9. Damoiseaux J, Andrade LE, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PL, Fritzler MJ, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis* 2019;78:879-89.
 10. Peterson LK, Tebo AE, Wener MH, Copple SS, Fritzler MJ. Assessment of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence assay: report from a survey by the American Association of Medical Laboratory Immunologists. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1489-97.
 11. Fox BJ, Hockley J, Rigsby P, Dolman C, Meroni PL, Ronnelid J. A WHO Reference Reagent for lupus (anti-dsDNA) antibodies: international collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1677-80.
 12. Van Blerk M, Van Campenhout C, Bossuyt X, Duchateau J, Humbel R, Servais G, et al. Current practices in antinuclear antibody testing: results from the Belgian External Quality Assessment Scheme. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:102-8.
 13. Pham BN, Albarede S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus* 2005;14:113-9.
 14. Jearn LH, Kim TY. Should the external quality assessment sample of antinuclear antibodies be of a typical monospecific pattern? *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1189-90.
 15. Van den Bremt S, Schouwens S, Van Blerk M, Van Hoovels L. ANA IIF automation: moving towards harmonization?: results of a multicenter study. *J Immunol Res* 2017;2017:6038137.