

ANA 선별 검사가 음성이면 ENA 자가항체 검사는 안해도 되는가?: IIFA에 의한 ANA 선별 검사 결과와 LIA에 의한 Ro60과 Ro52 자가항체 검사 결과의 연관성 분석

황현용¹, 김종국²

고신대학교 의과대학 진단검사의학과학교실¹, 신경과학교실²

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

Hyun Yong Hwang¹, Jong Kuk Kim²

Department of Laboratory Medicine¹, Department of Neurology², Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background: Differently from a theory, the test results of anti-extractable nuclear antigen antibody (ENA Ab) are sometimes positive when those of antinuclear antibody are negative in the same patient. We performed the association analysis between the result of ANA and that of Ro60 and Ro52 ENA Abs which are prevalently identified in the laboratory practice.

Methods: From January 2006 to June 2007, a total of 133 patients' test results of ANA by indirect immunofluorescence assay (IIFA) and 13 ENA Abs by line immunoassay (LIA) were analyzed. The patients were divided into 3 groups depending on the results of Ro antibodies: 1) Ro60 (+)-Ro52 (+), 2) Ro60 (+)-Ro52 (-), 3) Ro60 (-)-Ro52 (+). The associations between the results of IIFA and those of LIA in between the groups were analyzed. The associations between the results of IIFA and those of LIA and the prevalence of ENA Abs were analyzed in the ENA (+) group. The prevalence of ENA Abs in the IIFA (-)-LIA (+) group was analyzed. The distributions of ENA Abs identified in the same patient were analyzed in LIA (+), IIFA (+)-LIA (+), and IIFA (-)-LIA (+) groups.

Results: There were no statistical differences between the results of ANA and those of ENA Abs in between the groups, but significant difference was suspected between the Ro60 (+)-Ro52 (+) and the Ro60 (-)-Ro52 (+) groups ($p=0.052$). The prevalence of Ro60 and Ro52 were high among 13 ENA Abs identified (18.8% and 24% respectively). Statistically significant association between the results of ANAs and those of Ro60 was observed ($p=0.005$). The prevalence of Ro52 was highest in the IIFA (-)-LIA (+) group (28.6%). The numbers of ENA Abs identified in the same patient decreased in the IIFA (-)-LIA (+) group.

Conclusion: When the autoimmune diseases associated with Ro52 autoantibody are suspected, an ENA profile test should be performed regardless of the ANA results.

Key words: Ro60, Ro52, ANA, ENA

서론

교신저자 : 황 현 용

주소 : 주소: 602-702, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 진단검사의학과학교실
TEL:051-990-6279, FAX: 051-990-3010
E-mail : terminom@hanmail.net

자가면역 질환의 진단은 주로 임상적 병력, 이학적 검사 및 자가항체의 검출에 의존하게 된다. 특히, 항핵항체

(antinuclear antibody, ANA)를 이용하여 자가항체의 선별 검사를 하게 되며, extractable nuclear antigen (ENA) 항체에 특이한 항핵항체에 대한 분류는 1959년에 처음 언급되었다¹⁾. 이후 많은 ENA 항체들이 기술되어 자가면역 질환의 진단과 환자 치료 및 추적 관찰에 중요한 역할을 해왔다²⁻⁵⁾. 흔히 임상적으로 쇼그렌 증후군이나 전신성 홍반성 루푸스와 같이 자가항체와 연관된 질환이 의심될 때 항핵항체 선별 검사에서 양성인 경우 더 세부적인 검사를 추가로 하게 된다. 일반적으로 많이 사용되는 항핵항체 선별 검사법인 간접면역형광염색법(indirect immunofluorescence assay, IIFA)에서 양성인 경우, 그 염색 형태에 따라 추가적인 검사를 시행하게 된다. Homogenous pattern만 관찰 되는 경우 double-stranded DNA (ds DNA)항체를, 그 외의 형태거나 복합적인 형태인 경우는 ENA profile 검사를 추가로 시행한다.

저자 등의 경험에 의하면, 직접 눈으로 그 형광의 강도로 판정하는 IIFA 검사에서 음성이지만 line immunoassay (LIA)법을 주로 이용하는 ENA profile 검사에서는 양성인 경우가 간혹 있다. 이런 경우 LIA에 의한 결과를 확인하기 위해 western blot 등의 더욱 특이도가 높은 검사 방법을 시도하기도 한다. 반면에 임상적으로 다소 자가항체와 연관된 질환을 의심 하더라도 ANA 선별 검사 결과가 음성인 경우 환자의 추적관찰이 제대로 이루어 지지 못한 경우나 임상적으로 다른 질환에 비중을 더 두어 추가의 자가항체 검사를 하지 않는 경우가 있다.

따라서 본 연구에서는 LIA로 검사되는 13가지의 ENA 항체 중 그 검출 빈도가 높은 Ro60과 Ro52 자가항체와 ANA 선별 검사와의 연관성과 이에 따른 임상적 문제점을 분석하여 검사 결과에 따른 합리적인 대처방안을 찾고자 하였다.

연구대상과 방법

1. 연구대상 및 디자인

2006년 2월부터 2007년 6월까지 ANA 선별 검사와 LIA를 시행한 총 133명의 환자를 대상으로 하였다. Ro60과 Ro52 자가항체의 결과에 따라 환자를 3개의 군으로 나누었다: 1)Ro60 양성-Ro52 양성, 2) Ro60 양성-Ro52 음성, 3) Ro60 음성-Ro52 양성. 모두 4가지를 분석하였

다. 첫째, Ro60 혹은 Ro52가 적어도 하나가 양성인 환자 군들에서 IIFA에 의한 ANA 선별 검사 결과를 조사하여 각 군에서 ANA 선별 검사 결과에 유의한 차이가 있는지를 조사하였다. 둘째, LIA에서 양성인 여러 자가항체들과 ANA 선별 검사 결과 사이의 연관성 및 검출되는 자가항체의 빈도를 분석하였다. 셋째, LIA에서 자가항체가 검출되지만 ANA 선별 검사에서는 음성인 군에서 검출되는 자가항체의 빈도를 조사하였다. 마지막으로 LIA 양성인 군, IIFA 양성-LIA 양성인 군, 및 IIFA 음성-LIA 양성인 군에서 동시에 검출되는 자가항체의 양상을 분석하였다.

2. 간접면역형광염색법(indirect immunofluorescence assay)

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

3. Line immunoassay

EUROLINE (EUROIMMUN, Germany)를 사용하였으며 제조자의 지시대로 시험하였다. 실험 방법을 간략히 설명하면, 모두14개의 자가항체에 대한 항원이 부착된 직사각형의 기다란 막 스트립에 관찰하고자 하는 혈청을 떨어뜨린다. 5분간 반응을 시킨 후, 혈청을 흡인해 내고 다시 희석된 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.

4. 통계적 분석

각 군별 ANA 선별 검사와 LIA 검사 결과 사이의 연관성 분석을 위해 Pearson's chi-square test를 시행하였고, 교차표에서 어느 한 칸의 기대값이 5 미만인 경우 정확한 유의확률의 계산을 위해 Fisher's exact test를시행하였

다. 각 통계적 분석에서 유의확률 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. 통계적 분석을 위해 SPSS for window (version 12.0) 프로그램을 사용하였다.

결 과

ANA 선별 검사와 LIA를 모두 시행한 총 133명 중 남자와 여자는 각각 44명, 89명이었으며 평균 연령은 45.4 ± 18.8 세였다. 이중 ANA 선별 검사와 LIA에서 양성인 환자는 각각 59명(44.4%), 45명(33.8%)이었고 동시에 양성인 환자는 32명(24.1%)이었다. LIA 양성이고 ANA 선별 검사 음성인 경우는 13예(9.8%)였다. Ro 자가항체 양성인 28명 환자 중 남성이 7명, 여성이 21명으로 여성에서 양성율이 높았으며, 이 때 ANA 선별 검사상 Hep-2 세포의 형광형태는 speckled pattern이 가장 우세하였다 (Table 1).

Table 1. Patients' sex, age and patterns of ANA screening tests in the Ro autoantibody- positive patients. A total of 28 patients were positive in the Ro autoantibodies. Among them 4 patients were negative in the ANA screening test.

Sex	Male	7
	Female	21
Age	Mean (sd)	45.1(20.1)
ANA Pattern	Homogenous+speckled	6
	Speckled	6
	Homogenous	4
	Speckled+nucleolar	2
	Discrete speckled	1
	Discrete speckled+homogenous	1
	Homogenous+nucleolar	1
	Nucleolar	1
Total		22

1. Ro60과Ro52 자가항체로 분류된 군에 따른 ANA 선별 검사 결과의 차이

총 133예 중 Ro60 혹은 Ro52 양성인 28 예였으며 (21.1%), 이들 Ro60 혹은 Ro52 양성인 28 예 중 IIFA 양성인 22 예(78.6%), 음성은 6 예(21.4%)였다. Ro60 혹은 Ro52가 양성인 환자의 군별 비교에서 IIFA 음성인 6 예 중 5 예가 Ro60 음성-Ro52 양성 환자 군에서, 나머지 1예는 Ro60 양성-Ro52 양성 군에서 관찰되었다($p=0.052$).

Ro60 양성-Ro52 음성인 군과 Ro60 양성-Ro52 양성인 군 사이에서 IIFA 결과값에는 유의한 차이가 없었다 ($p=0.101$) (Table 2).

Table 2. IIFA positive rates and association between the groups divided by Ro autoantibody results. Fisher's exact test was performed to calculate p values in the cross tabulation between the groups.

Groups by Ro results	IIFA		IIFA positive rate (%)	p
	Positive	Negative		
Ro60(+)-Ro52(-) (n=5)	5	0	100	0.101
Ro60(-)-Ro52(+) (n=10)	5	5	50	
Ro60(+)-Ro52(+) (n=13)	12	1	92.3	0.052

2. LIA 양성 군에서 관찰되는 자가항체에 따른 ANA 선별 검사 결과의 차이 및 검출되는 자가항체의 빈도
총 45명의 LIA 양성 환자 군에서 13가지의 자가항체가 양성이었으며 이 중 Ro52와 Ro60의 빈도가 각각 18.8% 및 24%로 가장 높았다. LIA에서 양성인 13개의 자가항체 중 Ro60 자가항체에서만 그 결과에 따라 ANA 선별 검사 결과에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.005$). (Table 3).

Table 3. Chi-square test between the results of IIFA and autoantibodies in the LIA positive group. Chi-square may be problematic when any cell has a joint prevalence of less than five in the cross tabs. In this case (underlined) Fisher's exact test has a more significant meaning. A total of 45 patients who were positive in the LIA were included in the analysis.

Autoantibody	Prevalence No.(%)	p values in the analyses of the cross tabulation between autoantibodies and IIFA results	
		Pearson chi-square test	Fisher's exact test
Ro60	18(18.8)	0.005	0.006
Ro52	23(24.0)	0.672	0.749
Jo1	5(5.2)	0.104	0.136
Histon	12(12.5)	0.729	1.000
Centromere	7(7.3)	0.066	0.089
RNP	5(5.2)	0.131	0.301
Nucleosome	7(7.3)	0.354	0.654
AMA-M2	2(2.1)	0.500	0.499
La/SSB	4(4.2)	0.182	0.308
Ribosomal P	3(3.1)	0.860	1.000
Pm-SCL	1(1.0)	0.113	0.289
PCNA	5(5.2)	0.104	0.136
Smith	4(4.2)	0.857	1.000

3. ANA 선별 검사에서 음성이나 LIA에서 양성인 군에서 검출된 자가항체의 빈도

IIFA 음성-LIA 양성인 군(n=13)에서는 Ro60 (4.8%, n=1), Ro52 (28.6%, n=6), Jo1 (14.3%, n=3), histone (14.3%, n=3), nucleosome(4.8%, n=1), AMA-M2(4.8%, n=1), ribosomal P protein(4.8%, n=1), Pm-SCL(4.8%, n=1), PCNA(14.3%, n=3), 및 Smith(4.8%, n=1) 자가항체 반응이 양성이었다(Fig 1).

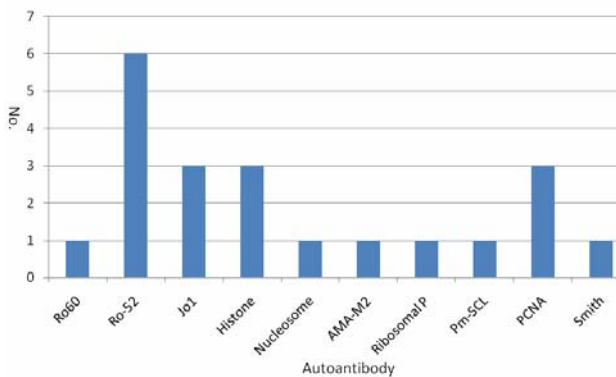


Figure 1. Prevalence of autoantibodies in the ANA screening negative-LIA positive group by IIFA

4. LIA 양성, IIFA 양성-LIA 양성, 및 IIFA 음성-LIA 양성군에서 동시에 검출되는 자가항체의 양상

LIA 양성(n=45), IIFA 양성-LIA 양성(n=32), 및 IIFA 음성-LIA 양성(n=13)에서 동시에 양성인 자가항체는 1개에서 7개까지 관찰되었으며 IIFA 음성-LIA 양성 군에서는 13예 중 8예에서 1개의 자가항체만이 분리되었고 (Ro52, 2예 histone, 2예 Pm-SCL, 2예 AMA-M2, 1예, Smith, 1예), 동시에 양성인 자가항체의 수는 최대 3개로 다른 군의 개수 보다는 적었다(Fig 2).

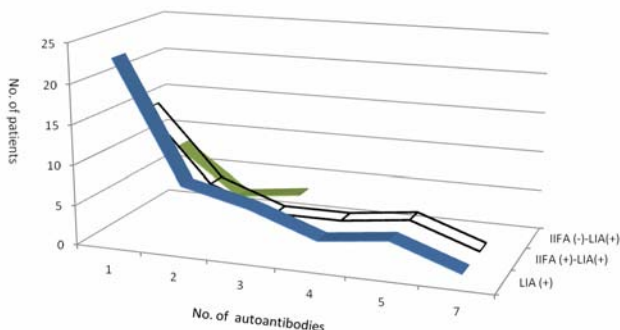


Figure 2. Numbers of different autoantibodies positive at the same test in a LIA. The autoantibodies positive in LIA were plotted according to the number of autoantibodies in the

IIFA(-)-LIA(+), IIFA(+)-LIA(+), and LIA(+) groups. A total of 7 autoantibodies were appeared at the same test in LIA. In the IIFA(-)-LIA(+) group, the maximum number of autoantibodies appearing at the same test was three.

고찰

Ro60 양성군과 음성군에서 IIFA 결과의 유의한 차이가 관찰되었다($p=0.005$). 그러나 Ro52 양성군과 음성군에서는 ANA 선별 검사에서 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.672$). 또한 Table 2에서, Ro60 음성-Ro52 양성군과 Ro60 양성-Ro52 양성군 사이의 유의수준을 0.1로 확장시켜 평가한다면 0.05에서는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 판단되지만 경계역의 유의한 차이는 인정할 수 있다($p<0.1$). 즉, IIFA의 결과가 이들 두 군에 유의한 차이가 있을 수 있음을 암시한다. LIA 양성군에서 다양한 자가항체들이 검출되었지만 Ro60을 제외한 모든 자가항체는 ANA 선별 검사 결과와 의미 있는 연관성이 없는 것으로 분석되었다. 또한 LIA 양성인 자가항체 중 Ro52와 Ro60의 빈도가 가장 높은 점을 감안하면 ANA 결과가 음성일 경우 Ro60 자가항체는 통계적으로 음성일 것을 예측할 수 있다(Table 3). ANA 선별 검사 음성-LIA 양성군에서의 자가항체 빈도를 보면, 단연 Ro52의 빈도가 높다(Fig 3). 이들을 종합해보면, ANA 선별 검사가 음성이고 자가항체가 양성일 때, Ro 자가항체의 경우 Ro60이 양성일 확률은 떨어지며 Ro60 음성-Ro52 양성을 포함하는 자가항체 표현 양상을 기대할 수 있다.

LIA에서 동시에 양성인 자가항체의 개수는 ANA 선별 검사와 LIA에 동시에 양성인 군에서 그 수가 증가하는 것처럼 보인다(Fig 2). ANA 선별 검사와 LIA에서 동시에 양성인 경우, 최고 7개의 자가항체가 동시에 감지됨에 반해 LIA에서만 양성인 군에서는 상대적으로 한 개의 자가항체만 감지되는 경우가 많았고 최대 3개의 자가항체만이 동시에 양성이었다. ANA 선별 검사에서 음성인 경우 LIA에서 동시에 양성일 수 있는 자가항체의 개수는 상대적으로 소수일 것이라고 짐작할 수 있다. LIA 양성인 경우 ANA 선별 검사 양성인 군과 음성인 군에서 LIA 검사 당 검출되는 평균 자가항체의 수는 전자는 2.3개, 후자는 1.6개로 ANA 선별 검사가 음성인 군에서 더 적

다. 물론 ANA 선별 검사 음성인 경우의 개체 수가 적어서 그렇게 보일 수도 있으나 경험적으로 ANA 역가 검사에서 약양성일수록 그리고 항체의 형광 패턴이 간단할수록 강양성인 경우와 혼합된 경우보다 동시에 양성인 자가항체의 개수가 줄어드는 경향이 있는 것 같다.

Ro 자가항체는 Ro60 kDa과 Ro52 kDa의 적어도 두 개의 단백질로 구성된 복합구조물을 인지한다^{6,7)}. 일반적으로 항 Ro/SSA 항체 검사는 Ro60 혹은 Ro52 어느 하나에 반응하여 양성을 나타내는 경우가 많으나 제조사에 따라 그 양상에 차이가 있다. 따라서 단순히 항 Ro/SSA 항체 검사 결과만으로 Ro 자가항체의 유무를 결론 짓는 것은 엄밀히 말하자면 잘못된 것이다. 이들 자가항체와 관련이 많은 것으로 알려진 쇼그렌 증후군이나 전신성 홍반성 루푸스의 진단시 반드시 검사 기관의 진단시약의 특성을 파악할 필요가 있다.

Table 1에서 Ro 자가항체 양성인 검체의 ANA 선별 검사에서의 핵의 형광 염색 형태는 매우 다양하게 나타난다. ANA의 혼합된 유형까지 포함하면 speckled pattern이 우세하기는 하지만 다양한 형광 염색 형태가 관찰되었다. 이것은 한번에 다양한 항체가 분리되는 상황과도 일치하지만 형광염색 검사법의 특수성의 결과이기도 한 것으로 생각된다. 즉, 비특이적 결합이 존재하는 경우나 비록 형광 염색 형태가 speckled pattern일지라도 그 형태가 다른 강한 형광 패턴에 가려지거나 아예 약한 경우 homogenous와 같은 다른 형태로 판독될 수 있다. 따라서 형광 형태가 충분히 강하지 않거나 불명확할 때에는 dsDNA 항체뿐 아니라 ENA profile 검사도 해보는 것이 필요할 것으로 생각된다.

ANA 음성이고 ENA 항체 양성인 환자에서 실제로 자가면역질환이 진단되는 경우는 매우 드물며, 임상적으로 의심이 되지 않는다면 반드시 추가적인 ENA 항체 검사는 할 필요가 없다고 주장되기도 한다⁸⁻¹²⁾. 그러나 자가항체는 환자의 건강 상태에 매우 민감하게 반응하며 면역억제제와같은 병용 약제에 의한 일시적 억제 효과도 반드시 확인되어야 한다. 일반적으로 Ro 자가항체는 쇼그렌 증후군 환자의 60-75%에서 양성이다¹³⁾. 또한 최근 연구에 의하면 항-Ro/SSA 양성인 전신성 경화증 (systemic sclerosis)에서 Ro52에 양성인 경우 쇼그렌 증후군의 존재를 의심할 수 있다고 주장되기도 하였다¹⁴⁾. 따라서 임상

적으로 쇼그렌 증후군처럼 Ro52와 연관되는 자가면역질환이 의심이 되는 경우에는 ANA 선별 검사 결과와 상관없이 Ro60 및 Ro52 자가항체를 포함하는 ENA 항체 검사를 하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

결 론

흔히 ANA 선별검사 음성인 경우 추가로 Ro 자가항체의 검사를 하지 않는 경우가 많다. 그러나 Ro60은 음성이고 Ro52만 양성인 검체에서 ANA가 음성으로 판독되는 경우가 의미 있게 관찰되는 것으로 믿어진다. 따라서 임상적으로 Ro52와 연관된 자가면역질환이 의심되는 경우 IIF에 의한 ANA 선별검사 결과와 관계없이 Ro 자가항체를 포함하는 ENA 항체 검사를 실시하는 것이 임상적으로 더 합리적일 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Holman HR, Deicher HR, Kunkel HG : The LE cell and the LE serum factors. Bull NY Acad Med 35:409-418, 1959
2. 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 11:297-301, 2004
3. Lee, LA, Alvarez K, Gross T, Harley HB : The recognition of human 60 kDa Ro ribonucleoprotein particles by antibodies associated with cutaneous lupus and neonatal lupus. J Invest Dermatol 107:225-230, 1996
4. Tan EM :Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 44:93-151, 1989
5. Von Muhlen CA, Tan EM : Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum 24:323-358, 1995
6. Ben Chetrit E, Chan EK, Sullivan KF, Tan EM : A 52-kDa protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 167:1570-1571, 1988
7. Ben Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF : Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. J Clin Invest 83:1284-1292, 1989
8. Thomson KF, Murphy A, Goodfield MJD, 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 54:413, 2001
9. Manoussakis MN, Garalea KL, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM :Testing for antibodies to ENA and to dsDNA is not indicated

ANA 선별 검사가 음성이면 ENA 자가항체 검사는 안해도 되는가?: IIFA에 의한 ANA 선별 검사 결과와 LIA에 의한 Ro60과 Ro52 자가항체 검사 결과의 연관성 분석

- in FANA-negative sera. Clin Rheumatol 7:465-469, 1988
10. Homburger HA : Cascade testing for autoantibodies in connective tissue diseases. Mayo Clin Proc 70:183-184, 1995
 11. Malleson PN, Sailer M, Mackinnon MJ : Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic disease. Arch Dis Child 77:299-304, 1997
 12. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P :Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. Ann Intern Med 94:553-592, 1981
 13. Fujimoto M, Shimjizuma M, Yazawa N, Kubo M, Ihn H, Sato S, Tamaki K, Kikuchi K, Tamaki K : Prevalence and clinical relevance of 52-kDa and 60-kDa Ro/SS-A autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 6:667-670, 1997
 14. Garberg H, Jonsson R, Brokstad KA : The serological pattern of autoantibodies to the Ro52, Ro60, and La48 autoantigens in primary Sjögren' s syndrome patients and healthy controls. Scand J Rheumatol 34:49-55, 2005