

Anti-ds DNA 항체 검사 시 Lipemic 검체의 영향에 관한 보고

서울아산병원 핵의학과

천준홍 · 김외정 · 김성호 · 문형호 · 유선희

Report on the Effects Lipemic Specimen in Anti-ds DNA Antibody Test

Jun Hong Cheon, Whe Jung Kim, Sung Ho Kim, Hyoung Ho Moon and Seon Hee Yoo

Department of Nuclear Medicine, Asan medical Center, Seoul, Korea

Purpose: SLE (systemic lupus erythematosus) is an inflammatory autoimmune disease, characterized by various autoantibody. The detection of Anti double-stranded DNA (Anti-ds DNA) is important in the diagnostics of SLE, and include the American College of Rheumatology (ACR) diagnostic criteria for SLE. Also SLE disease activity and correlativity with the level Anti-ds DNA antibody have been reported and Anti-ds DNA antibody quantitative test is very useful for tracing before and after SLE treatment. When These Anti-ds DNA antibody test (Farr assay: ^{125}I labeled ds-DNA and bound Anti-ds DNA antibodies complex in serum is precipitated by ammonium sulfate and used to centrifugation, measured it) inhaled supernatant after centrifugation, a lipemic specimen does not facilitate the formation of precipitate and also occurs situation was inhaled with precipitate. To solve these problems, The Influence of the degree of lipemic specimen was evaluated. **Materials and Methods:** September 2012 to February 2013, We selected lipemic samples (n=81) of specimen commissioned by Anti-ds DNA antibody test. Lipemic samples were done pre-treatment (high-speed centrifugation: 14,000 rpm 5 mins) used a micro-centrifuge (Eppendorf Model 5415D). At the same time lipemic specimen and pre-treatment samples were performed Anti-ds DNA antibody test (Anti-ds DNA kit, Trinity Biotech, Ireland). Statistical analysis were analyzed Pearson's correlation coefficients and regression and paired *t*-test, and Difference (%). **Results:** Experimental group 1 (Lipemic Specimen Anti-ds DNA Ab concentration ≤ 7 IU/mL) at $y=0.368X+4.732$, $R^2=0.023$, Pearson's correlation coefficient was 0.154, paired *t*-test ($P=0.003$), Difference (%) mean 65.7 and showed a statistically significant difference. Experimental group 2 (Lipemic Specimen Anti-ds DNA Ab concentration ≥ 8 IU/mL) at $y=0.983X+0.298$, $R^2=0.994$, Pearson's correlation coefficient showed 0.997, paired *t*-test ($P=0.181$), Difference (%) mean -5.53 made no statistically significant difference. **Conclusion:** Lipemic sample of low Anti-ds DNA Ab concentration (2.5-7 IU/mL) and the result is obtained pre-treatment (high-speed centrifugation: 14,000 rpm 5 mins) were made a significant difference statistically. Anti-ds DNA is one of the primary auto-antibodies present in patients with SLE, and remain an important diagnostic test for SLE. Therefore, we recommend preprocessing (high-speed centrifugation: 14,000 rpm 5 mins) in order to exclude the influence of lipemic specimen. (*Korean J Nucl Med Technol* 2014;18(1):153-157)

Key Words : SLE, lipemic specimen, Anti-ds DNA antibodies, high-speed centrifugation

서 론

- Received: March 28, 2014. Accepted: April 21, 2014.
- Corresponding author : **Jun Hong Cheon**
Department of Nuclear Medicine, Asan medical Center, 88
Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel: +82-2-3010-4577, Fax: +82-2-3010-4588
E-mail: jhcheon@amc.seoul.kr

전신홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)는
염증성 자가면역질환으로 다양한 자가 항체를 특성으로 하
고 있다. Anti double-stranded DNA (Anti-ds DNA) 항체

의 검출은 SLE의 진단에 중요하며¹⁾ American College of Rheumatologists의 SLE 진단기준에 포함되어 있다.²⁾ 또한 SLE 질병의 활성도와 Anti-ds DNA 항체 수준의 상관성이 보고되어 있으므로 Anti dsDNA항체 정량검사는 SLE의 치료 전·후 추적에 매우 유용하다.^{1,3-5)}

Anti dsDNA항체의 검출을 위한 검사 방법으로 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)을 이용한 Farr assay, *Crithidia luciliae*를 이용한 면역형광측정법(immunofluorescence Test, CLIFT), 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 화학발광면역 측정법(chemiluminescence immunoassay, CLIA)이 있다(Table 1). 여러 가지 검사법 가운데 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)은 높은 총결합력(high avidity)을 가진 Anti dsDNA항체만을 선택적으로 검출하여 SLE의 진단에 높은 특이도를 가지고 있다.⁶⁾

그러나 Anti-ds DNA 항체 검사(Farr assay: ¹²⁵I표지된 ds-DNA와 결합한 혈청내 Anti-ds DNA 항체 complex는 ammonium sulfate에 의해 침전되고 이를 원심분리 하여 측

정한다.) 시 원심분리 후 상층액을 제거할 때 lipemic한 검체의 경우 침전물의 형성이 원활하지 않거나 침전물도 같이 흡입되는 상황이 발생하였다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 lipemic 검체가 검사 결과에 미치는 영향 정도를 평가하였고 이를 보고 하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

2012년 9월부터 2013년 2월까지 Anti-ds DNA 항체 검사가 의뢰된 검체 중 lipemic한 검체 81개를 대상으로 하였다. 대상군 중 남자 21명, 여자 60명이었으며 cholesterol의 평균 농도는 181.3±48.2 mg/dL이었고 대상군의 SLE 유병률은 48.14%이다. Lipemic 검체는 마이크로 원심분리기(Model 5415D, Eppendorf AG Hamburg, Germany)를 이용하여 전처리(고속 원심분리: 14,000 rpm 5 mins)를 시행하였다. Lipemic

Table 1. Characteristics of EIAs, farr and the *Crithidia luciliae* immunofluorescence test

Assay	Manufacture	Method	Isotypes detection	dsDNA origins	Manufacturer cut off
Diastat [®] Anti-ds DNA	Axis Shield, UK	Microplate/manual	IgG,IgM	Calf-thymus Anti-ds DNA	30 IU/mL
Liason [®] dsDNA	Diasorin, Antony, France	Automate, Liason [®]	IgG	Human recombinant dsDNA	20 IU/mL
Elia [®] dsDNA	Phadia, Freiburg, Germany	Automate, Unicp [®]	IgG	Circular recombinant plasmid dsDNA	15 IU/mL
Anti-ds DNA CL	Diasorin, Antony, France	CLIFT/manual	IgG	Kinetoplast DNA	Presence of a fluorescence of the kinetoplaste for a serum diluted at 1/10
Farr	Trinity Biotech, Ireland	RIA/manual	IgG,IgM	Recombinant recombinant dsDNA	7 IU/mL

Table 2. Procedure of Anti-ds DNA antibody assay

Assay Tubes	Total	Standards	Controls	Samples
Numbering	1-2	3~14	15~18	19
	Standards	25µL		
Pipette	Controls		25µL	
	Samples			25µL
125I-labelled dsDNA	200µL	200µL	200µL	200µL
Mix	Vortex mix			
Incubate	37°C 60±10 minutes			
Ammonium sulfate		Dispense 1 mL cold ammonium sulfate		
Vortex, Centrifuge		Vortex, Centrifuge 4°C 2800 rpm 30 mins		
Decant or Aspiration		Decant or Aspiration		
Count		1 min count		

검체와 전처리 과정을 통해 혈청 내 지질성분을 제거한 검체를 대상으로 Anti-ds DNA 항체 검사를 실시하였다.

2. 검사방법

Anti-ds DNA항체 측정은 검사 키트(Anti-ds DNA kit, Trinity Biotech, Ireland) 내 설명서의 권고사항을 준수하여 실시하였다(Table 2).

3. 분석방법

측정된 혈청 Anti-ds DNA 결과는 Microsoft Excel (Microsoft® Office Excel® 2007, Redmond, WA)를 이용하여 Pearson 상관계수 및 회귀분석, 차이 백분율(difference %)을 분석하였고 통계 프로그램 MedCalc (MedCalc® Ver 12.4.0 Ostend, Belgium)를 통해 paired t-test로 비교 분석하였다(유의수준 $P < 0.05$).

결 과

1. 실험군 1 (Lipemic 검체의 Anti-ds DNA항체 농도 ≤ 7 IU/mL, n=39)에서 $y=0.3636x + 4.7322$, $R^2=0.0238$, Pearson 상관계수는 0.154, paired t-test ($P=0.003$), Difference (%) mean 65.7을 보였으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (Fig. 1, Table 3).

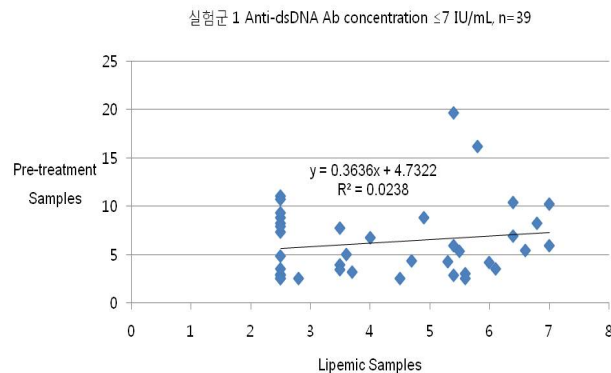


Fig. 1. Correlation between lipemic and pre-treated samples (Experimental group 1).

2. 실험군 2 (Lipemic 검체의 Anti-ds DNA항체 농도 ≥ 8 IU/mL, n=42)에서 $y=0.9837x + 0.2982$, $R^2=0.994$, Pearson 상관계수는 0.997, paired t-test ($P=0.181$), Difference (%) mean -5.53을 보였고 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Fig. 2, Table 3).

결 론

두 개의 실험군에서 얻어진 Anti-ds DNA 항체 농도를 통계 분석 처리한 결과 실험군 2 (Lipemic 검체의 Anti-ds DNA 항체 농도가 ≥ 8 IU/mL)에서는 lipemic 검체와 전처리(고속 원심분리: 14,000 rpm 5 mins)과정을 통해 혈청 내 지질성분을 제거한 검체의 결과 값은 유의한 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 그러나 Anti-ds DNA 항체 농도가 낮은(2.5-7 IU/mL) lipemic 검체와 전처리(고속 원심분리: 14,000 rpm 5 mins)과정을 진행한 검체에서 얻어진 결과 값은 통계적으로 유의한 수준에서 차이를 보였다. Anti-ds DNA 항체 검사는 임상에서 SLE의 진단과 SLE의 치료 전, 후 추적에 매우 유용한 역할을 한다. 따라서 Anti-ds DNA 항체 검사 시 cut off value인 7 IU/mL를 기준으로 혈청 내 지질 성분에 의한 검사 결과의 영향을 배제하기 위해서 lipemic 검체는 반드시 전처리(고속 원심분리: 14,000 rpm 5 mins)과정을 선행 하여야 한다. 이런 과정을 통해 Anti-ds DNA 항체 검사 결과는 보다 신뢰성 있는 정보로 임상에 제공될 수 있다.

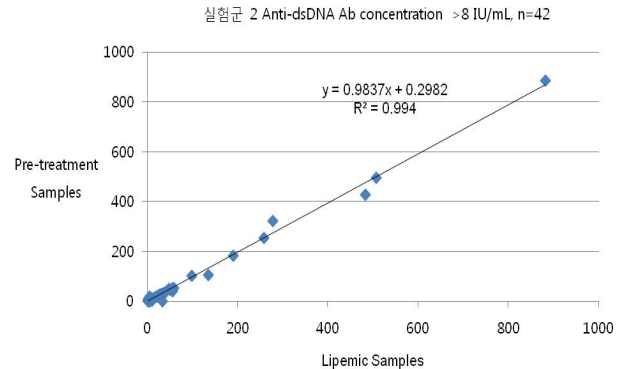


Fig. 2. Correlation between lipemic and pre-treated samples (Experimental group 2).

Table 3. Summary of statistical analysis data by assay

실험군	N	상관관계식	상관계수	Pearson 상관계수	P value	Difference (%)
실험군 1	39	$y = 0.3636x + 4.7322$	$R^2=0.0238$	0.154	0.003	65.7
실험군 2	42	$y = 0.9837x + 0.2982$	$R^2=0.994$	0.997	0.181	-5.53

고 찰

다수의 연구자들은 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)을 이용한 Farr assay (Farr assay: ^{125}I 표지된 ds-DNA와 결합한 혈청 내 Anti-ds DNA 항체 complex는 ammonium sulfate에 의해 침전되고 이를 원심분리하여 측정한다.)를 Anti-ds DNA 항체의 검출을 위한 gold standard 검사법으로 인정하고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 이러한 방사면역측정법을 통해 Anti-ds DNA 항체 분석 시 lipemic 검체의 선택 기준은 먼저 육안으로 확인 후, chemistry lab 항목 중 lipemic index (LIP: 0.5% intrafat 용액의 혼탁을 1 Lip 단위로 표시, 0-4+)를 참조 하여 선정하였다. 분석검체 81개의 lipemic index 분포는 +1 (n=41), 2+(n=27), 3+(n=10), 그리고 4+(n=3)이다.

제조사인 Trinity Biotech는 lipemic 검체에 대한 Anti-ds DNA 항체 검사 시, triolein 67.8 mmol/L 농도까지는 검사 결과에 영향을 주지 않는다고 기술하고 있다. triolein은 트리아실글리세롤의 일종으로 구성 지방산이 올레인산만인 단일 글리세리드이며, triolein 67.8 mmol/L를 혈청 내 대표적인 지질 성분인 cholesterol 농도로 변환할 경우 약 2,600 mg/dL에 해당한다. 이는 혈청 내 지질 성분이 고농도로 존재하더라도 검사 결과에 특별한 영향을 미치지 않는다는 의미로 해석된다.

그러나 Anti-ds DNA 항체 검사를 시행한 검체(n=81)의 혈청 cholesterol 평균 농도는 181.3 ± 48.2 mg/dL이며 실험군 1 (Lipemic 검체의 Anti-ds DNA 항체 농도 ≤ 7 IU/mL, n=39)의 cholesterol 평균 농도는 189.4 ± 41.6 mg/dL이다. 이는 Trinity Biotech에서 언급한 triolein 67.8 mmol/L에 해당하는 cholesterol 2,600 mg/dL보다 낮은 농도 수준이다. 그러나 cholesterol의 농도가 높은 lipemic 검체와 전처리 검체에 대한 Difference (%)는 65.4에서 84.2로 증가하였다. 따라서 Anti-ds DNA 항체 검사 시 cut off value (7 IU/mL) 이하의 분석 결과에는 혈청 내 지질 성분에 의해 영향을 받는 것으로 생각되며 추후 많은 수량의 검체 분석을 통해 이를 좀 더 명확하게 검증할 수 있으리라 생각된다.

요 약

Anti double-stranded DNA (Anti-ds DNA)항체의 검출은 SLE의 진단에 중요하며 American College of Rheumatologists의 SLE 진단기준에 포함되어 있다. 또한 SLE 질병의 활성도와 Anti-ds DNA 항체 수준의 상관성이 보고되어 있으며 Anti-ds DNA 항체 정량검사는 SLE의 치료 전, 후 추적에

매우 유용하다. Anti-ds DNA 항체의 검출을 위한 검사 방법으로 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)을 이용한 Farr assay, *Critidia luciliae*를 이용한 면역형광 측정법(immunofluorescence Test, CLIFT), 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 화학발광면역 측정법(chemiluminescence immunoassay, CLIA)이 있다. 본원에서 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)으로 Anti-ds DNA 항체 검사 과정에서 lipemic한 검체의 경우 침전물의 형성이 원활하지 않거나 침전물도 같이 흡입되는 상황이 발생하였고, 이러한 문제점을 해결하기 위해 lipemic 검체가 분석 결과에 미치는 영향 정도를 평가하였다.

2012년 9월부터 2013년 2월까지 Anti-ds DNA 항체 검사가 의뢰된 검체 중 lipemic한 검체(n=81)를 선택하여 마이크로 원심분리기로 전처리(고속 원심분리: 14,000 rpm 5 mins)한 후 동시에 Anti-ds DNA 항체 검사(Anti-ds DNA kit, Trinity Biotech, Ireland)를 시행하였다.

실험군 1 (lipemic 검체의 Anti-ds DNA 항체 농도 ≤ 7 IU/mL)에서 $y=0.3636x+4.7322$, $R^2=0.0238$, Pearson 상관계수는 0.154, paired *t*-test ($P=0.003$), Difference (%) mean 65.7의 결과를 얻었으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 그러나 실험군 2 (lipemic 검체의 Anti-ds DNA 항체 농도 ≥ 8 IU/mL)에서 $y=0.9837x+0.2982$, $R^2=0.994$, Pearson 상관계수는 0.997, paired *t*-test ($P=0.181$), Difference (%) mean -5.53을 보였고 통계적으로 유의한 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

임상에서 SLE (systemic lupus erythematosus)의 진단에 중요한 역할을 하는 Anti-ds DNA 항체 검사는 lipemic 검체의 영향을 배제하기 위해서 반드시 전처리(고속 원심분리: 14,000 rpm 5 mins) 과정을 통해 혈청 내 지질 성분을 제거한 후 검사를 시행하여야 한다.

REFERENCES

1. Kavanaugh AF, Solomon DH. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guideones. Guidelines for Immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum* 2002;47: 546-55
2. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
3. Reveile JD. Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004;13:290-297.
4. Isenberg D and Smeenk R. Clinical laboratory assays for measuring anti-ds DNA antibodies. Where are we now? *Lupus* 2002;11:797-800.

5. 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(S6):S20-S27.
6. Neogi T, Gladman DG, Lbanez D, Urowitz M. Anti-ds DNA antibody testing by Farr and ELISA techniques is not equivalent. *J Rheumatol* 2006;33:1785-1788.
7. Yang JY, Oh EJ, Kim YG, Park YJ. Evaluation of Anti-ds DNA Antibody Tests: Crithidia luciliae Immunofluorescence Test, Immunoblot, Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Chemiluminescence Immunoassay. *Korean J Lab Med* 2010;30:675-684.
8. Kim JM, Ihm CH, Sin DH, Ihm MK, Sim SC. Detection of Anti-ENA and anti-ds DNA antibodies using Line Immunoassay in Systemic Autoimmune Disease. *Korean J Lab Med* 2008;28:353-361.
9. Choi HS, Kim TH. Reevaluation of Standard RIA to Detect dsDNA Antibodies Using Crithidia Luciliae & IT-1 Cell Lines. *J Rheum Dis* 2000;7:220-232.
10. Kim KN. Systemic lupus erythematosus. *Korean Journal of Pediatrics* 2007;50:1180-1187.
11. AM Rouquette, C Desgruelles. Detection of antibodies to ds DNA: an overview of laboratory assays. *Lupus* 2006;15:403-407.
12. JJG Hillebrand, HJ Bernelet, Moens, AHL Mulder. Changes in Farr radioimmunoassay and Elia fluorescence immunoassay anti-dsDNA in relation to exacerbation of SLE. *Lupus* 2013;22:1169-1173.
13. Launay D, Schmidt J, Lepers S, Mirault T, Lambert M, Kyndt X, et al. Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and Crithidia luciliae immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta* 2010;411(13-14):959-964.
14. D. A Isenberg, J. J Manson, M. R. Ehrenstein, A. Rahman. Fifty years anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology* 2007;46:1052-1056.
15. Rouquette AM, Desgruelles C. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. *Lupus* 2006;15:403-407.