

# Laser Nephelometry 와 Latex 응집검사법을 이용한 류마토이드 인자 측정치의 비교 연구

충남대학교 의과대학 임상병리과

송 인 숙

= Abstract =

## A Comparative Study on the Value of Rheumatoid Factor Determined with Nephelometric and Latex Agglutination Methods

In Suck Song, M.D.

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Chung-Nam National University,  
Daejeon Korea

The present study was done to compare the laser nephelometry with the latex agglutination test for the determination of rheumatoid factor.

The following results were obtained.

- 1) The latex agglutination method was simple for qualitative tests but the nephelometry method was simpler and more accurate than the other for quantitative tests.
- 2) With the nephelometric method, endpoints were objectively assessed and standardization was easy.
- 3) In quantitative tests, the data were highly reproducible with the nephelometry method.
- 4) Both methods were generally similar in specificity and sensitivity but the nephelometry was more specific than the other in progressive and convalescent stages of the disease.

## 서 론

류마토이드인자는 Human IgG 와 반응하는 자가항체로이 antiglobulin 의 혈청내 존재는 류마토이드 관절염의 특징적인 양상이다<sup>1)</sup>.

류마토이드 관절염, 이외에 교원병, 만성간염, 간경화증, 결핵, 유육종증의 질환이 있는 사람의 혈청에서도 류마토이드 인자가 발견되고 있으며 이들의 측정법 또한 다양하다.

이들 방법중 현재 널리 쓰고있는 검사법으로는 Latex 응집반응검사가 있다. 그러나 Latex 응집반응검사는 표준화와 정량검사가 어렵고 재현성에도 문제점이 있어 좀 더 정밀하고 편리하게 류마토이드 인자를 검출

하기 위해 새로운 방법이 발견하게 되었다. 그중 최근에 많이 사용하는 법으로 Laser Nephelometry 법이 있다. 이는 혈청내에 immunoglobulin 과 Complement 를 측정하는 것으로 존재하는 항체 항원복합체 농도에 비례하여 광선을 분산하는 원리를 이용해서 류마토이드양 인자를 정량적으로 검출할 수 있는 검사법이다. 저자는 건강인, 관절통을 주소로 하는 류마토이드관절염 환자와 여러가지 만성염증을 가진 환자의 혈청을 가지고 새로 개발된 Laser Nephelometry 와 전통적인 Latex 응집검사를 시행하여 그 결과를 비교 분석하였던바 의의있는 소견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 검사대상 및 방법

### 1) 대 상

1981년 9월 1일부터 1982년 6월 30일까지 충남대학

접 수 : 1983년 3월 14일

Table 1.

Cuvette	Function	Saline	Specimen	Antigen
BB	Buffer Blank	1.2ml	—	—
AB	Antigen Blank	1.1ml	—	200ul
IB	Positive Control Level I Blank	1.2ml	100ul	—
IT	Positive Control Level I Test	1.0ml	100ul	200ul
IB	Positive Control Level II Blank	1.2ml	100ul	—
IIT	Positive Control Level II Test	1.2ml	100ul	200ul
NB	Negative Control Blank	1.2ml	100ul	—
NT	Negative Control Test	1.0ml	100ul	200ul
B <sub>1</sub>	Unknown Specimen 1, Blank	1.2ml	100ul	—
T <sub>1</sub>	Unknown Specimen 1, Test	1.0ml	100ul	200ul
B <sub>2</sub> , ect.	Unknown Specimen 2, Blank, ect.	1.2ml	100ul	—
T <sub>2</sub> , ect.	Unknown Specimen 2, Test, etc.	1.0ml	100ul	200ul

교 의과대학 부속병원에 내원한 환자중 류마토이드 관절염으로 진단되었던 환자 117명 백혈병 환자 21명 전신성홍반성낭창 3명 만성 염증환자 39명 건강인 26명 등 총 206예에서 혈액을 채취하였다.

## 2) 검사방법

채취한 혈액에서 혈청을 분리후  $-20^{\circ}\text{C}$  이하에 냉동 저장하였다가 측정하기 전에 30분동안  $56^{\circ}\text{C}$  수조에 넣어 불활성화하여 사용하였다.

### (1) Latex 응집반응 검사

시약 : Latex-RF Reagent(Behring Institute)

방법 : Glycine-NaCl buffer pH 8.2로 검체를 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128로 희석한후 검사관유리에 희석한 검체 0.05 ml와 양성과 음성 control serum 0.05 ml을 넣고, 여기에 Latex-RF reagent을 첨가하고 잘 혼합하여 1~3분후에 대조군과 비교하여 응집여부를 관찰하였다. titer는 Latex 응집이 검출되는 가장 높은 희석의 역가로 나타내었다.

### (2) Nephelometry 법

시약 : Las-R Rheumatoid Factor Antigen(Human)

0.85%식염수 : 사용하기전에  $0.4\mu\times 25\text{mm}$  filter로 여과하였다.

모든 control과 검체는 30분동안  $56^{\circ}\text{C}$  수조에 넣어 불활성화 시켰다. 검사하기전 모든 reagent와 specimen을 실온에 둔다. pipett으로 100 ul의 specimen, control과 200 ul의 Rheumatoid factor Antigen을 Table 1과 같이 넣는다. parafilm으로 cuvette을 덮고

잘 혼합한후 20분 방치후 지시에 따라서 기계를 조작한후 각 cuvette에 상대적 광산도를 측정한다.

10 RLS 이하인 것은 90분 방치한후 다시 측정하였다. 90분에서 3 RLS 이하인 것은 류마토이드 양인자가 없는 것으로 보았다.

## 결 과

Table 2에서 보는바와 같이 류마토이드 관절염 환자중에서 Latex 응집검사에는 73%가 양성이었고 Nephelometry 법에 의해서는 81%가 양성으로 나타났으며, Latex 응집검사에서 낮은 titer를 나타냈으나 Nephelometry 법으로는 높은 score을 나타낸 환자의 임상기록부를 Review한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 류마티스 관절염이 진행하고 있는 상태임을 알 수 있었으며, Nephelometry 법으로 낮은 score이었으나, Latex 응집검사로 높은 titer를 나타낸 환자는 Table 3에서와 같이 회복기에 있는 환자임을 알 수 있었다. 각 sample의 조작시간은 Latex 응집검사에선 정성검사는 Nephelometry 법보다 훨씬 간편하나 tube dilution법을 요한 정량검사는 평균 45분이 걸렸으며 Nephelometry 법에서는 조작시간이 평균 20분이 소요되었다. Latex 응집검사는 류마토이드 양 인자가 양성인 환자의 검체를 가지고 14일간 반복 시험한 결과 평균 titer가 112, S.D.는 6.3 C.V.는 5.6%이었고 Nephelometry 법으로는 평균 RLS가 123 S.D.는 4.0 C.V.는 3.3%로 Nephelometry 법이 재현성이 더 좋았다.

고 안

전형적인 류마토이드 양 인자는 IgG의 FC fragment와 반응하는 자가항체로서<sup>2)</sup> Gell<sup>3)</sup> 등은 류마토이드 인자를 IgG class의 면역글로브린에서 나타나는 각종의 결정요소에 대한 특수한 항체로서 작용하는 면역글로브린이라고 하였다. 류마티스 질환에서 이들의 정확한 생물학적 역할은 모르나 혈청내에서의 류마토이드양인자 측정은 류마토이드 관절염의 진단<sup>4)</sup>과 치료<sup>5-9)</sup>와 예후<sup>10)</sup>에 대한 의의있는 정보를 제공한다.

이러한 류마토이드 인자는 사람의 IgG와만 작용하는 것이 아니고 수종의 동물의 IgG와도 교차반응을 일으키기 때문에 rabbit의 IgG로 coating된 Sheep cells을 이용하여 류마토이드 양 인자를 검출할 수 있다. 그러므로 흔히 이용하는 류마토이드 양 인자 검출방법은 erythrocyte<sup>11)</sup>나 Latex<sup>12)</sup> 또는 bentonite<sup>13)</sup> particle에 IgG로 coating시킨후 류마토이드양 인자와 반응시 나

타나는 multivalent molecule의 2차적인 양상을 기초로 한 것으로 대부분 Singer와 plotz<sup>12)</sup>에 의한 Latex 응집검사가 널리 사용되고 있다. 그러나 Latex 응집검사는 여러가지 문제점이 있다. 즉 이들은 표준화가 어렵고 day to day variability을 나타내고 semiquantitation만 가능할 뿐이다<sup>14)</sup>. 이러한 단점을 보충하기 위해 Latex 응집검사 이외에 최근에는 radioimmunoassays<sup>15)</sup>, fluorimetry<sup>16)</sup>, Enzyme linked immunosorbent assays(ELISA)<sup>17)</sup>, immunosorbent<sup>18)</sup>와 Laser Nephelometric assay<sup>19)</sup>가 개발되었다.

singh. I.<sup>1)</sup> 등은 류마토이드양 인자는 정상인과 노년층의 혈청에서 낮은 titer로 발견되고 류마티스 이외의 질환 예들들면 SLE 같은 질환에서 증가된 titer를 나타낸다고 하였다.

Pansh<sup>18)</sup> 등은 류마토이드 관절염이 있는 환자에서 류마토이드 양인자의 검출빈도는 사용하는 방법에 따라 다양하다고 하였으며 류마토이드 관절염 환자에서 Latex 응집검사로 75%가 양성으로 나타났으며 Sheep cell 용

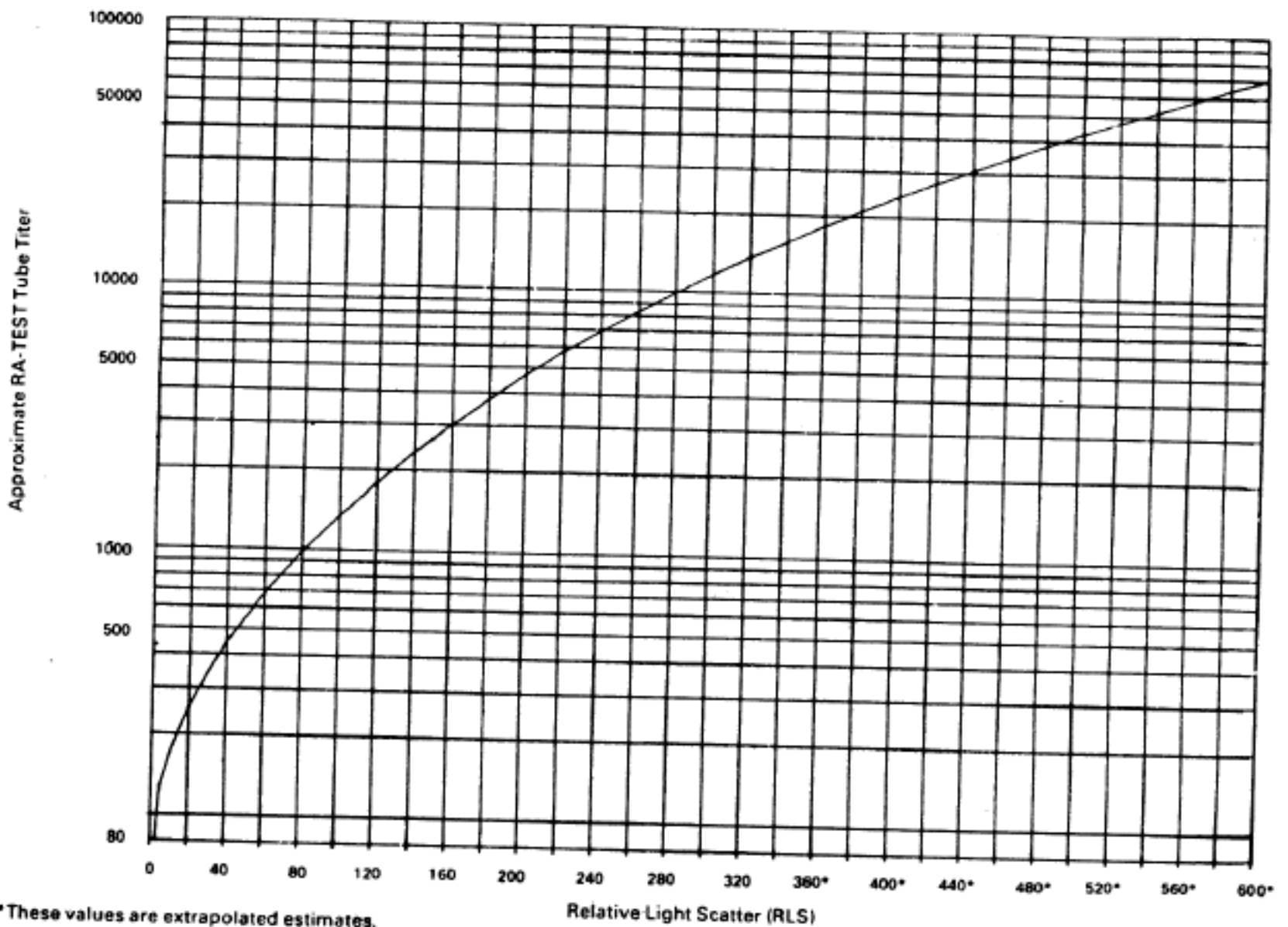


Fig. 1. Nephelometric Relative Light Scatter(RLS) Versus Approximate RA-TEST\* Reagent Tube Titer 100  $\mu$ l(Specimen)/200  $\mu$ l(Antigen) System

Table 2. Comparison between nephelometric rheumatoid factor test and latex slide test

Disease state	Total Number of Specimens	Latex slide test		Nephelometric test	
		No.	%	No.	%
RA	447	85	73	95	81
Leukemia	21	3	14	4	19
SLE	3	1	33	1	33
Chronic inflammatory disease	39	10	26	10	26
Normal adult	26	4	15	3	12

집검사에서 일반적으로 양성결과가 더 낮은 것으로 보고 하였다. Waller<sup>20)</sup> 등은 관절통을 호소하는 환자에서 Latex 응집검사를 한 결과 70~80% 양성반응을 보였으며 다른 질환이나 정상인중에서도 양성반응을 보인다고 보고하였다. 저자의 실험결과에서도 Latex 응집검사에서 73% Nephelometry 법에서 81% 양성으로 Waller 등의 결과와 일치했으며 3명의 SLE 환자에서 1명 26명의 건강인 중에서 4명이 양성반응을 보였다. clarence<sup>21)</sup> 등은 220 RLS 을 나타낸 goat antihuman IgG 의 예상 RA-Test tube titer 는 5,700이었으나, Latex 응집검사법으로 측정된 결과 160임을 보고했다. 저자의 실험에서도 Fig. 1. 에서 보는바와 같이 150.5 RLS 을 나타낸 양성검체의 예상 RA-Test tube titer 는 2,700이었으나 실제 Latex 응집법으로 검사하였을 시 그 titer 가 128을 나타냈다. Las-R 류마토이드양 인자는 Latex 응집검사에 사용되었던 입자(Latex 또는 적혈구)보다 적기 때문에 낮은 친화력의 IgG 항체를 함유한 항혈청제작이 IgG-coated Latex 입자보다 좀 더 효과적으로 Las-R 류마토이드양 인자항원을 응집한다는 것을 의미한다<sup>21)</sup>. 그러므로 상기같은 결과를 나타내며 따라서 Nephelometric test 는 친화력이 낮은 류마토이드양 인자를 측정하기 위해 좀더 효과적이라고 예상된다. Latex 응집검사는 관독시 endpoints 가 주관적인 시각적 검출에 의존하는 반면 Nephelometry 법은 객관적인 수치로 나타내므로 표준화가 용이하다. 정성검사에서는 Latex 응집검사가 시행하기에 간편하나 정량검사에서는 Nephelometry 법이 시행하기에 더욱 간편하고 정확한 값을 얻을 수 있었다.

Hansen<sup>22)</sup> 등은 Latex 응집검사법으로(Behring Diagnostics) 류마토이드 인자에 대한 양성 titer로서의 의의는  $\geq 1:80$ 이라고 했고 류마토이드 관절염환자의 약 75%에서 양성이었다고 류마토이드 인자가 높은 titer 인 경우는 질환이 상당히 진행되어 있고 전신증상과 혈관염이 상호 연관되어 나타난다고 보고하였다.

Table 3. Low Latex tube titer patients with high Nephelometry score

Patient	Nephelometry score(RLS)	Latex tube titer	Clinical state
1	112	16	Progressive stage
2	123	8	
3	91	4	
4	37	4	
5	83	8	

Table 4. High Latex tube titer patients with low Nephelometry score

Patient	Nephelometry score(RLS)	Latex tube titer	Clinical state
1	3	128	Remission stage
2	9	64	
3	5	128	
4	2	64	
5	11	128	

Table 2에서 Nephelometry 법은 Latex 응집검사법보다 류마토이드양 인자의 검출에 Specificity 또는 Sensitivity 는 증가되어 있지 않지만 Table 3과 4에 보는 바와같이 진행되는 류마티스 관절염환자에서 Latex tube titer 로는 낮은 titer 를 Nephelometry Score 로는 높은 RLS 을 나타냈고 회복기 환자에서는 Latex 응집에서 높은 titer 로 Nephelometry Score 로는 낮은 RLS 로 나타냈다. 질병이 진행되는 환자와 회복기 상태의 환자에서는 Latex 응집검사 보다는 Nephelometry 법이 더 Specificity 가 있음을 알 수 있다. 이로서 질환에 대한 류마토이드양 인자치의 변화에 대한 상호연관관계가 Latex 응집법보다 Nephelometry 법이 더 좋은 것을 알 수 있다.

## 결 론

충남대학 병원 임상병리과에 류마토이드 인자 검출이 의뢰된 류마토이드 관절염 환자 117명 백혈병환자 21명 전신성홍반성낭창 3명 만성염증환자 39명 26명의 건강인을 대상으로 Latex 응집반응과 Laser-Nephelometry 법을 이용하여 류마토이드 인자 검출을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

류마토이드 인자에 대한 Nephelometric test 는

1) 정성검사에서는 Latex 응집검사가 조작도 간편하고 시간도 적게 걸렸으나 정량검출에서는 Nephelometry 법이 더 간편하고 정확하였다.

2) endpoints 가 객관적으로 측정되고 standardization 이 용이하였다.

3) 정량검사시 Reproducibility 가 더 좋았다.

4) 류마티스 관절염의 전체적인 specificity 와 sensitivity 는 차이가 없었으나, 진행성기와 회복기에는 Nephelometry 법이 Specificity 가 더 좋음을 알 수 있다.

## 참 고 문 헌

- 1) Irene S and Friencis GE: *A direct binding assay for rheumatoid factor serum antiglobulins using fluorecein-labelled Fc fragment of human immunoglobulin-G. J Clin Path* 31(10):963-73, 1978
- 2) Johnson PM, Faulk WP: *Rheumatoid factor: Its nature, specificity and production in rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol* 6:414-430, 1976
- 3) Gell B, Combs RRA, Lachman PJ: *Clinical Aspect of immunology. 3rd ed. Blackwell Scientific publications. Oxford 1975, P 1099*
- 4) Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC: *Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. JAMA* 140:659-662, 1949
- 5) First DE, Levine S, Srinivasan R, et al: *A double blind trial of high versus conventional dosages of gold salts for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum* 20:1473-1480, 1977
- 6) Multicenter Trial Group: *Control trial of D-Penicillamine in severe rheumatoid arthritis JAMA* 140:659-662, 1949
- 7) Runge LA, Pinals RS, Lourie SH, Lourie SH, et al: *Treatment of rheumatoid arthritis with levamisole. Arthritis Rheum* 20:1445-1448, 1977
- 8) Shiokawa Y, Horiuchi Y, Mitsuo H, et al: *Clinical evaluation of D-Penicillamine by multicentric double-blind comparative study in chronic rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum* 20:1464-1472, 1977
- 9) Srinivasan R, Miller BL, Paulus HE: *Long term chrysotherapy in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum* 22:105-110, 1979
- 10) Feigenbaum SL, Masi AT: *Prognosis in rheumatoid arthritis Am J Med* 66:377-384, 1979
- 11) Cathcart EW, O sullivan J B: *Standardization of the sheep cell agglutination test. Arthritis Rheum* 8:530-537, 1965
- 12) Singer JM, Plotz CM: *The latex fixation test. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Am J Med* 21:888-896, 1956
- 13) Bozicevich J, Bunim JJ, Freund DJ?: *Bentonite flocculation test for rheumatoid arthritis. Proc Soc Exp Biol Med* 97:180-183, 1958
- 14) Chandler RQ, Robinon H, Masi AT: *Investigations of variables affecting rheumatoid factor reactivity and tests. Am J Clin Pathol* 61:47-58, 1974
- 15) Knez V, Reimer CB: *An indirect solid-phase microimmunoassay for human IgM-anti IgG (rheumatoid factor). J Immunol Method* 18:105-121, 1977
- 16) Lea DJ, Ward DJ: *Estimation of IgM rheumatoid factors by fluorimetry. Ann Rheum Dis* 37:247-251, 1978
- 17) Engvall E, Perlmann P: *Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). Immunochemistry* 8:874-879, 1971
- 18) Panush RS, Boano NE, Schur PH: *Serum and synovial fluid IgG, IgA and IgM antigamma globulins in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum* 41:737-747, 1971
- 19) Michael EW weinblatt, et al: *Rheumatoid factor detection by nephelometry. Arthritis and Rheu-*

- matism 23(6):777-779, 1980*
- 20) Waller M, Tomas EC, Vaugham E: *Study of rheumatoid factors in a normal population. Arth and Rheumatism 7:513, 1964*
- 21) Clarence EJ: *Quantitation of rheumatoid factor: analysis of various species of IgG for detection by radioimmunoassay. J Lab Clin 97(6):842-853, 1981*
- 22) Hansen SL, et al: *A clinical evaluation of a card agglutination test for rheumatoid factor. Am J C P 73(1):110-3, 1980*
-