

GREEN VET NEWSLETTER

09
APRIL



ABOUT CONTENTS

면역 검사

자가 항체의 검사 및 진단

일반 검사

혈액 채취 및 검체 관리
오류 TOP5

면역 검사

자가 항체의 검사 및 진단

Antinuclear antibodies란?

Antinuclear antibodies(ANA)는 다양한 세포 핵의 항원들에 대한 여러가지 종류의 자가항체들을 일컫습니다. ANA가 결합하는 핵 항원에는 double-stranded DNA(dsDNA), RNA, histone, nucleoprotein 등이 있습니다. 인의에서는 ANA 검사 결과에 따른 결합 조직 질환 진단이 체계적으로 확립되어 있습니다. 그러나 아직까지 수의학에서는 ANA 검사 결과를 전신 자가면역질환인 Systemic Lupus Erythematosus (SLE) 보조 진단 지표로 그 사용이 제한되어 있습니다. 건강한 개체뿐만 아니라 다른 면역 매개 질환 (류마티스성 관절염, 면역매개성 비재생성 빈혈), 병원체 감염 (Bartonella, Ehrlichia, Leishmania), 비면역매개성 염증 질환에서도 ANA 검사 양성으로 확인될 수 있습니다. 또한 항경련제, 항부정맥제, 항고혈압제, 항진균제, 항생제와 같은 일부 약물을 투여했을 경우에도 양성으로 검출될 수 있습니다.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

SLE는 다양한 조직 및 장기에 침착된 면역 복합체에 의한 염증을 동반하는 치명적인 자가면역 질환입니다. 임상 증상으로 비미란성 다발성 관절염, 피부 병변, 유래를 알 수 없는 발열, 사구체신염, 용혈성 빈혈, 혈소판 감소증, 다발성 근염 등이 있으며, 주로 여러 장기가 영향을 받는 양상으로 나타납니다 (그림 1). 일부 특정 품종의 개들은 SLE 또는 루푸스와 연관된 질환 발생 가능성이 높은 유전적 소인을 가지고 있습니다. 저먼 셰퍼드는 보고된 케이스가 가장 많은 품종이며, 노바 스코셔 덕 톨링 리트리버는 SLE 뿐만 아니라 면역 매개성 류마티스성 질병 발생 가능성이 높습니다. SLE는 만성적인 질환으로 완치가 어려우며 평생동안 관리가 필요한 질병입니다. SLE가 있는 거의 모든 (97-100%) 개에서 ANA가 검출되어 SLE 진단에 ANA test 결과가 사용됩니다. 그러나 건강한 개체, 병원체 감염시에서도 ANA가 검출될 수 있으므로, 임상 증상, 다른 검사 결과 등을 종합하여 SLE를 진단하여야 합니다(표 1).



<그림 1> SLE 진단 기준에 부합하는 임상 증상 (A) 척행성 (Plantigrade) 보행 자세, (B) 홍반, (C) 짓무름 (D) 탈색 (E) 궤양화 피부 병변

1	약물 투여, 중양, 병원체 감염이 없이 높은 ANA 역가
2	SLE 증상에 적합한 피부 병변
3	구강 / 비인두 궤양
4	비미란성, 비감염성 2곳 이상의 관절염
5	요로 감염이 없는 사구체 신염, 지속적인 단백뇨
6	용혈성 빈혈, 혈소판 감소증
7	백혈구 감소증
8	다발성 근염 또는 심근염
9	원인 불명의 발작 또는 정신증
10	비감염성, 염증 삼출물
11	PTT 측정을 저해하는 항인지질항체

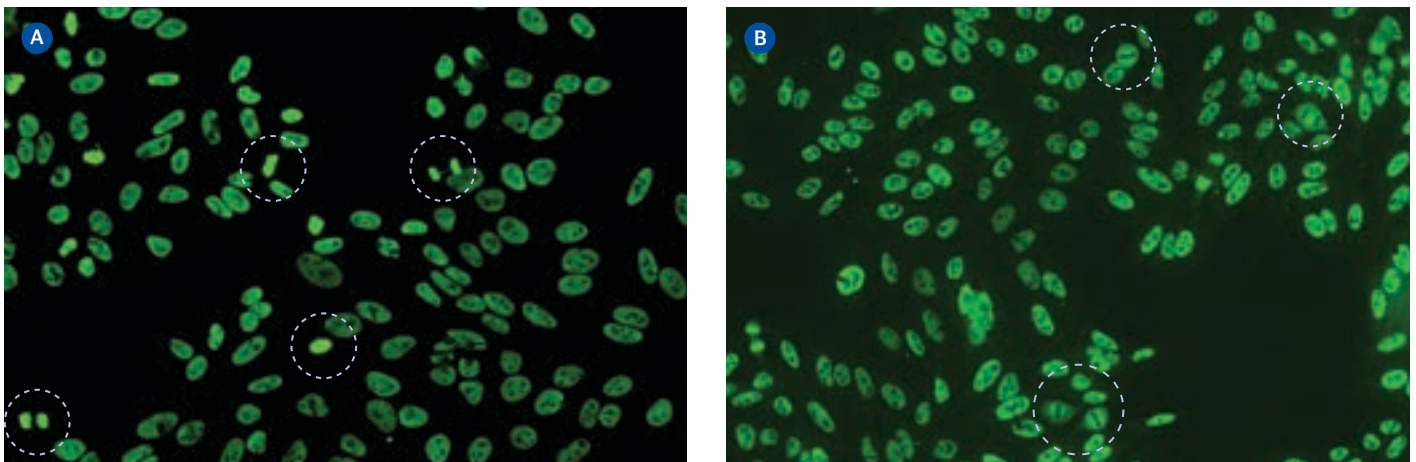
<표 1> 개 SLE 진단 기준

ANA test

ANA를 검출하는 standard 검사 방법은 Indirect immunofluorescence(IIF)로, SLE 의심 환축의 자가항체를 검출할 때 주로 사용됩니다. 혈액 검체 내 자가항체는 세포 핵의 항원에 부착되며, 최종적으로 항원에 부착된 자가항체에 형광을 붙여 형광현미경으로 형광 염색된 양상을 관찰합니다. 인의에서는 주로 간 유래 세포인 Hep-2 세포로 IIF를 진행합니다. 동일한 방식을 적용하여 수의학에서도 Hep-2 cell로 ANA test를 진행할 수 있습니다.

Hep-2 cell를 사용한 IIF에서 다양한 형광 pattern이 관찰되며, 그 중 개에서 가장 특징적으로 관찰되는 형광 pattern은 Homogeneous pattern과 Speckled pattern입니다 (그림 2). Homogeneous pattern은 유사분열기 세포의 염색체가 염색된 pattern으로 dsDNA, DNA와 연관 단백질에 대한 자가항체와 연관이 있습니다.

Speckled pattern은 유사분열기 세포의 염색체가 염색되지 않은 pattern으로 extractable nuclear antigen (ENA)에 대한 자가항체와 주로 연관이 되어 있습니다. 75%의 ANA 양성 검체에서 Speckled pattern이, 25%의 비율로 드물게 Homogeneous pattern이 관찰됩니다. Homogeneous pattern이 관찰되는 개는 발열, 피부 병변, 임파선염, 출혈과 같은 다양한 장기가 관여된 전신에 걸친 증상이 나타나는 경향이 있습니다. 그 중 빈혈, 혈소판 감소증은 가장 유의적으로 빈번하게 확인되는 증상입니다. 이와 대조적으로 Speckled pattern이 관찰되는 개는 주로 근골격계 장애를 보이는 경향이 있습니다.



<그림 2> 형광현미경으로 관찰한 Hep-2 cell IIF pattern (A) Homogeneous pattern (B) Speckled pattern

그린벳에서는 자가면역 질환 관련 검사인 ANA test와 Autoimmune profile를 제공하고 있습니다 (표 2). ANA test의 Gold standard인 IIF 방법을 이용하여 검사를 진행하고 있으며, 자가항체 보유 여부 확인을 통해 SLE 진단에 필요한 결과를 받으실 수 있습니다 (그림 3). 거의 대부분의 모든 SLE 개는 ANA test에서 양성 반응을 보이지만, ANA test 결과는 SLE에 특이적이지 않으므로 ANA 양성 검사 결과만으로 SLE를 단독으로 진단할 수 없습니다. 따라서 임상 증상과 혈액학, 혈액화학 검사와 같은 추가적인 검사 결과를 고려하여 종합적으로 판단하여야 합니다.

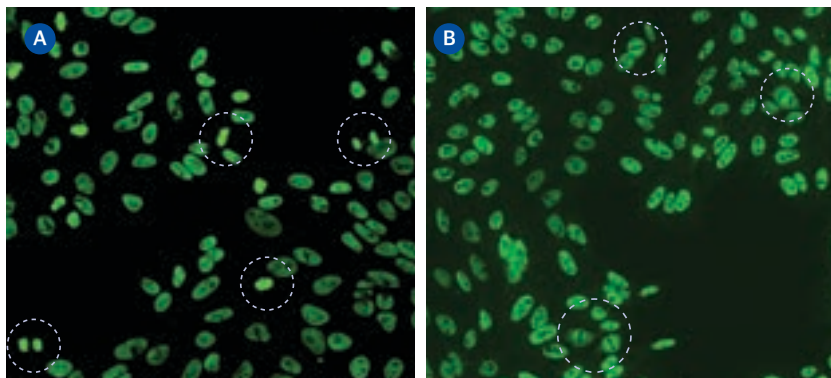
검사코드	검사명	검체	TAT
GIW002	ANA (Antinuclear antibodies)-Canine	Serum or Plasma 1.0mL	4
GIW007	Autoimmune Profile (CBC, ANA, Coombs diet)-Canine	Serum 1.0mL, EDTA WB 2.0mL	4

<표 2> 그린벳 제공 ANA test

[면역검사] ANA (Antinuclear antibodies) - Canine	
TEST	RESULT
ANA (Antinuclear antibodies)	Positive / more than 1:320 / Speckled pattern

코멘트

ANA (Antinuclear antibodies)



A) Homogeneous pattern: 25%의 ANA 양성 검체에서 관찰되는 패턴이며, SLE 환자에서 특징적으로 관찰된다.
 B) Speckled pattern: 75%의 ANA 양성 검체에서 관찰되는 패턴이다.

ANA (Antinuclear antibodies)		
구분	결과	해석
Negative	< 1 : 100	
Weak positive	1 : 100	Homogeneous pattern
		Speckled pattern
Positive	≥ 1 : 320	Homogeneous pattern
		Speckled pattern

Negative: Active SLE를 배제 가능하나, 다른 면역 매개 질환을 배제할 수 없다.
 Weak positive: SLE에 특이적이지 않으나 Homogeneous pattern은 SLE와 루푸스 관련 질환일 가능성이 높다.
 Positive: 97-100%의 SLE 환축에서 높은 농도의 ANA가 검출된다. ANA test 는 SLE에 특이적이지 않으며 감염성 질병 (Ehrlichiosis, Bartonellosis)에서도 높은 농도의 ANA가 검출될 수 있다. 다른 검사결과와 임상 증상과 함께 종합적으로 판단하여야 한다.

<그림 3> 그린벳 ANA (Antinuclear antibodies) 검사 결과 예시

Reference

- Bremer, H. D., Lattwein, E., Renneker, S., Lilliehöök, I., Rönnelid, J., & Hansson-Hamlin, H. (2015). Identification of specific antinuclear antibodies in dogs using a line immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 168(3-4), 233-241.
- Smith, B. E., Tompkins, M. B., & Breitschwerdt, E. B. (2004). Antinuclear antibodies can be detected in dog sera reactive to Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii, Ehrlichia canis, or Leishmania infantum antigens. *Journal of veterinary internal medicine*, 18(1), 47-51.
- ANA (Anti-nuclear antibody [website]. (2024.Mar.07). <https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/testing/protocols/immunology/anti-nuclear-antibody>
- Rheumatoid Factor (RF) and Anti-nuclear Antibody (ANA) in the Diagnosis of Autoimmune Disorders in Veterinary Patients [website]. (2024.Mar.07) https://ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights/march2019/rf-factor-ana-autoimmune.html
- Fournel, C., Chabanne, L., Caux, C., Faure, J. R., Rigal, D., Magnol, J. P., & Monier, J. C. (1992). Canine systemic lupus erythematosus. I: A study of 75 cases. *Lupus*, 1(3), 133-139.
- Hall, E. J., German, A. J., Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010). *Textbook of veterinary internal medicine*.
- Kim, D. H., Han, H. J., & Kim, J. H. (2021). Successful management of systemic lupus erythematosus with levamisole in a Dachshund dog. *Korean Journal of Veterinary Research*, 61(1), 1-1.
- Hansson-Hamlin, H., Lilliehöök, I., & Trowald-Wigh, G. (2006). Subgroups of canine antinuclear antibodies in relation to laboratory and clinical findings in immune-mediated disease. *Veterinary clinical pathology*, 35(4), 397-404.

일반 검사

혈액 채취 및 검체 관리 오류 TOP5

동물병원이나 실험실에서 일어나는 혈액 검사의 오류는 다음의 3가지로 분류할 수 있습니다.

Preanalytic: 검사 전 오류의 대부분은 샘플 수집과 처리방법에서 발생합니다.

Analytic: 검사 오류는 장비나 검사법의 precision, accuracy, sensitivity, specificity 등의 차이에서 나타납니다.

Postanalytic: 검사 후 오류는 잘못된 해석이나 데이터 분석 오류 등이 있습니다.

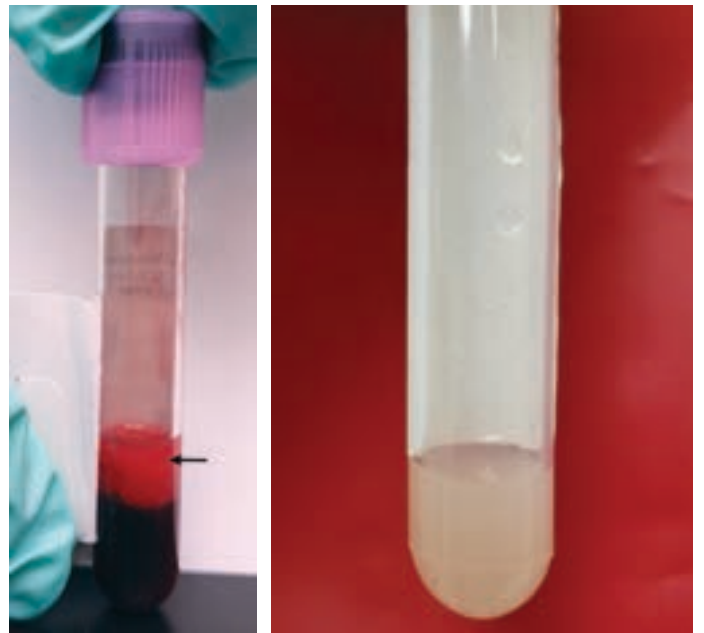
다음은 잘못된 혈액 채취 및 검체 관리로 인하여 일어날 수 있는 검사 전 오류 중 가장 빈번한 5가지입니다.

Nonfasted Patient

Triglycerides의 증가는 지질혈증을 일으키기 때문에 잠재된 병리기관의 결과 일 수 있습니다. 그러나 대부분의 지질혈증 상황은 음식물 섭취 후에 나타납니다. 지질혈증은 혈청/혈장의 탁도를 증가시키기 때문에 빛의 산란을 측정하는 혈액학, 혈액화학검사 결과에 영향을 끼칠 수 있습니다. (예: Total protein by Refractometry, Hemoglobin 및 관련 인자, bilirubin) (그림 4)

과도한 지방은 사용된 분석방법에 따라 전해질 측정치를 잘못 감소시킬 수 있습니다. 많은 분석기기들은 간접 potentiometry를 사용하여 혈장이나 혈청 내 이온의 electrical potential을 결정합니다.

간접 potentiometry로 측정된 샘플은 분석전에 기기에서 희석을 합니다. 지질혈증이 있는 경우 이 희석액의 추가가 전해질 농도의 감소로 잘못 측정될 수 있습니다. 왜냐하면 증가된 TG는 volume displacement 현상으로 혈장/혈청에서 지방이 공간을 차지해 상대적으로 적은 수분량에서 전해질(sodium, potassium, chlorine)을 측정하기 때문입니다. 직접 potentiometry 방법인 POCT 혈액가스분석기들은 희석방법으로 전해질분석을 하지 않아 전해질 수치를 잘못 감소시키지는 않습니다. 그러나 지질혈증에 의한 오류를 줄이는 가장 간단한 방법은 보호자에게 검사와 혈액 채취 전 8~12시간은 굶기도록 안내하는 것입니다.



<그림 4> 지질혈증 혈장 & 혈청

In vitro Hemolysis

용혈(적혈구의 파괴로 붉은 색을 띤 혈청이나 혈장: 그림 5)은 병리적(in vivo) 또는 시험관내 원인(in vitro)으로 분류할 수 있습니다. 시험관내 용혈은 샘플수집시의 물리적 충격, 부적절한 샘플 핸들링, 저온 또는 고온 환경, 검사과정 지연 등의 원인이 있습니다. 시험관내 용혈은 적혈구 농도를 감소시키나 병리적 용혈에 의한 것이 아니므로 헤모글로빈 농도는 자체는 정확합니다. 그 이유는 많은 분석기에서 헤모글로빈 측정시 적혈구를 용해한 후 빛 투과도를 평가하기 때문입니다. 적혈구 농도의 인공적인 감소는 적혈구 농도를 계산식에 포함하는 각종 지수들의 변화를 야기할 수 있습니다. (Hematocrit, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration 등)

흡광도 분광광도법은 다양한 생화학 항목(예: bilirubin, urea nitrogen, creatine kinase, phosphorus, cholesterol)의 농도를 측정하고 해당 항목의 분석물질(효소반응 물질 등)이 포함된 용액을 통과하는 빛의 양을 측정하는 방법으로 사용되며 측정된 파장을 해당 물질에 대해 알려진 흡수 스펙트럼과 비교합니다. 용혈 되어 나온 헤모글로빈은 빛을 흡수하기 때문에 이 테스트를 방해하여 부정확한 결과가 나올 수 있습니다. 게다가 현저한 시험관내 용혈이 일어나면 세포내액에서 고농도로 있는 이온과 분자의 방출을 일으켜 잘못된 증가 결과를 받게 될 수 있습니다. (ALT, AST, phosphorus, potassium 등)

시험관내 용혈은 적절한 환자 보정 및 핸들링과 함께 적절한 샘플 채취(굵은 주사바늘 사용), 적절한 샘플 핸들링(항응고제와 부드럽게 혼합 및 신속한 분석)으로 방지할 수 있습니다. 샘플의 분석이 지연된다면 냉장보관이 필요하고 샘플을 아이스에 직접 닿게 보관해서는 안됩니다.



<그림 5> 용혈 혈청

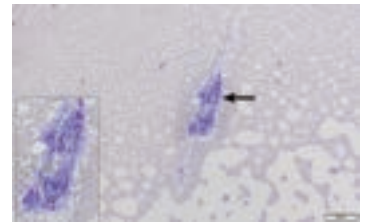
Clotted Sample

지연된 혈액 수집, 외상성 정맥천자, 전혈과 항응고제의 부적절한 혼합 등으로 인해 샘플이 응고될 수 있습니다. 큰 혈전이 있는 검체는 값비싼 장비의 튜브, 주입기, 필터를 막을 위험이 있으며 분석에 적합하지 않습니다. 이 값비싼 오류를 방지하기 위해 실험실 또는 병원에서는 분석 전에 큰 혈전이 있는지 살펴 봐야 합니다. (그림 6)



<그림 6> 혈전

혈소판끼리 뭉치는 현상인 혈소판 응집(그림 7) 또는 미세 혈전은 특히 고양이에서 거짓 혈소판 감소증을 유발할 수 있습니다. 게다가 임피던스 분석기는 적혈구와 혈소판을 크기로 구분하기 때문에 작은 혈소판 응집 덩어리(또는 크기가 큰 혈소판)를 적혈구로 잘못 분류할 수도 있습니다. 이러한 현상을 예방하거나 혈소판 응집을 방해하는 여러 기법이 연구되었으나(vortex mixing, prostaglandins 추가 등) 신중한 채취와 취급이 가장 좋은 방법입니다. 그리고 모든 혈소판 감소증은 혈액도말평가를 통해 확인되어야 합니다.



<그림 7> 혈소판 응집

Insufficient Sample Volume (Short Sample)

적은 샘플을 수집하거나 부적절하게 큰 검체용기를 사용하면 과도한 항응고제로 인한 희석 또는 실험을 하기에 부족한 샘플량으로 바람직하지 않은 결과가 발생할 수 있습니다. 채혈용기는 지정된 용량까지 채워야 하며 일반적으로 용기에 표기가 되어있습니다. (그림 8)

EDTA 항응고제는 혈액보다 고장성이나 EDTA 용기에 적절한 양이 채워졌다면 CBC 결과에 중요한 영향을 끼치지 않습니다. EDTA 용기에 적절하게 샘플이 채워지지 않았을 때는 전혈에 비해 과량의 EDTA 항응고제가 삼투효과로 세포내 수분 이동을 유발해 적혈구의 수축(crenation)과 PCV 거짓감소를 나타낼 수 있습니다. EDTA용기의 혈액이 CBC검사를 위해 혈액 분석기를 통과할 때 분석기는 적혈구를 정상 혈장과 등장성인 희석제에 현탁시킵니다. 과도한 EDTA가 있는 샘플은 수축된 RBC에 비해 희석액이 상대적으로 저장성이므로 용액들이 세포내로 급격히 들어가 부피는 다시 회복하게 됩니다. 그러므로 적은 샘플에서 계산된 Hematocrit은 정확한 값일 수 있습니다.



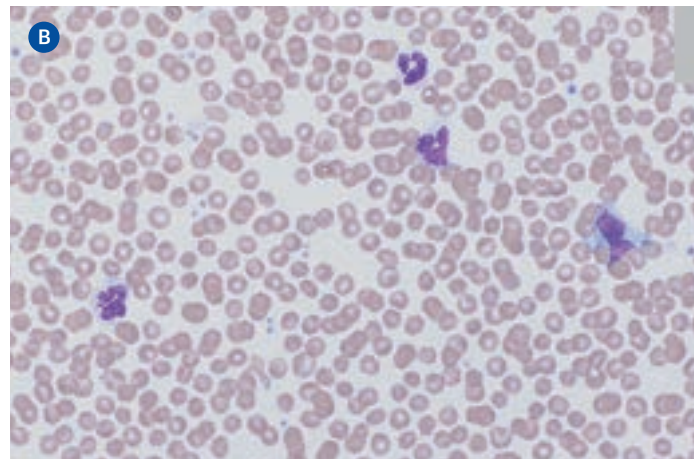
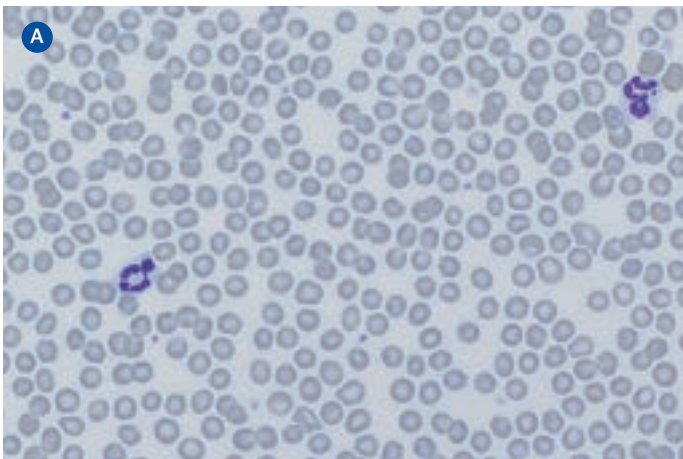
<그림 8> 채혈용기

적절한 혈액량은 특히 응고계 검사에서 중요합니다. 대부분의 응고계 검사들은 분석과정에서 칼슘을 첨가하여 항응고효과를 역전시킬 수 있도록 항응고제와 전혈의 비율이 1:9 인 Citrated Plasma를 필요로 합니다. 샘플량이 부족하게 담긴다면 Citrate와 전혈의 비율이 올라가서 응고가 감소되는 결과가 나타나 잘못된 응고 시간 지연 결과를 낼 수 있습니다. 만약 적은 샘플이 예상되는 상황이라면 최소 샘플량과 권장되는 샘플 처리법을 미리 실험실에 문의하는 것이 좋습니다.

Delayed Processing

이상적으로 혈액학 및 혈액 화학 검사는 채혈 후 바로 검사 및 분석되어야 합니다. 그러나 불가피한 상황에 따른 지연된 과정으로 인해 잘못된 결과가 도출될 수도 있습니다. 혈액학 결과에서는 적혈구의 부풀어 오름으로 인해 Mean Corpuscular Volume (MCV)가 증가할 수 있고 그에 따라 MCV와 관련된 지수들이 변경될 수 있습니다. (계산된 Hemotocrit의 상승, MCHC의 감소 등) 이러한 변화는 일반적으로 샘플채취 후 12 시간 후에 처음 관찰되며 시간이 지날수록 계속 증가됩니다.

가성 독성 변화와 일치하는 형태학적인 변화는 혈액도말검사에서도 관찰될 수 있는데 도말 후 4시간 실온 보관, 8시간 아이스팩 보관, 24시간 4°C 냉장보관에서 모두 관찰됩니다. 장기간 보관과 관련된 호중구의 형태학적인 변화의 예는 세포질의 호염기성 증가, 세포질 공포 증가, Dohle bodies의 출현 등입니다. 이런 변화들은 장기간 보관에 따른 세포 투과성 증가로 이전에는 볼 수 없던 구조가 염색되어 나타나는 것으로 보입니다. 이 변화들은 세포질 독성 변화로 잘못 해석되어 임상적 의미를 줄 수도 있으므로 백혈구 분포 해석 시 이러한 변화를 고려하는 것이 중요합니다. (그림 9)



<그림 9> A: 채혈후 1시간 이내 만들어진 도말표본, B: 24시간 냉장보관후 만들어진 도말 표본

백혈구에서 나타나는 형태학적 변화 외에도 적혈구에서도 저장과 관련된 형태학적 변화가 나타납니다. 특히 중요한 것은 장기간 저장 시 적혈구 표면에서 세포외 주혈기생충(feline Mycoplasma spp등)이 제거되는 것입니다. 이로 인해 혈구 기생충 감염을 간과할 수 있습니다. 또한 검사 과정이 지연되면 적혈구 표면이 울퉁불퉁해지는(crenation) 변화가 관찰됩니다. 지연된 검사과정으로 인한 인공적인 변화를 최소화하려면 채혈 즉시 혈액 도말 표본을 만들거나 바로 실험실에 보내는 것을 권장합니다.

혈액 화학 검사를 위해서 혈액은 응고되어야 하고(15~30분) 혈청에서 세포들을 분리하기 위해 원심 분리되어야 합니다. 한번 세포가 분리되면 혈청은 즉시 검사하거나 24~48시간 냉장보관 할 수 있습니다. 지연된 혈청 분리는 불가피하게 화학 성분의 대사, 특히 포도당의 감소가 발생합니다. 혈청 효소들은 특히 효소 활성과 동력학(kinetics) 때문에 처리가 지연되면(24시간이상) 잘못된 결과가 나올 위험이 있습니다. 만약 지연이 예상된다면 검사 스케줄을 조정하거나 실험실에 문의해 분석할 항목이 냉동 혈청에서는 안정성이 유지되는지 알아보는 것이 도움이 될 수 있습니다.





Conclusion

채혈 및 샘플링시의 오류에 대해 인지하는 것은 잘못된 결과를 예방하는 것에 도움이 되며 불가피한 상황이었다면 그 결과를 해석하는데 도움이 될 수 있습니다. 샘플을 실험실에 제출할 때 임상가들은 발생한 오류를 사전에 알려야 임상병리전문가로부터 정확한 해석을 얻을 수 있습니다. 비록 본문에 포함하지는 않았지만 장착된 정맥카테타를 통한 샘플수집시 권장사항대로 하지 않는다면 임상적으로 중요한 다양한 오류들이 생길 있다는 보고가 있습니다. 예를 들면 체액 희석으로 인한 Hematocrit 및 기타 항목들의 잘못된 감소, 투여 주사제에 의한 오염으로 인해 잘못된 상승한 값(glucose, potassium 등), 과도한 흡입에 의한 용혈 등의 상황입니다.

올바른 채혈 및 검체 관리를 위해 그린벳에서는 다음과 같이 권장합니다.

올바른 채혈 및 검체 관리법

1. 용혈 및 응고를 방지하기 위해 가능한 굵은 주사침을 사용하여 적절한 속도로 채혈 후 의뢰한 항목에 해당하는 검사용기에 혈액을 담습니다.
2. 검사용기별 검체 취급 방법은 아래의 그림과 같습니다.

첨가제	응고 촉진제, gel	 SST	첨가제	항응고제(EDTA K3)	 EDTA
검체취급	5-10회 전도 혼합, 15~30분 방치하여 응고시킨 후 바로 원심 분리(3000RPM/10분)		검체취급	용기에 채혈 후 응고되지 않도록 10회 이상 충분히 전도혼합	
검사항목	<ul style="list-style-type: none"> • Serum Chemistry • SDMA • NT-proBNP • cPL/fPL • 항체가 검사 • 알레르기 검사 		검사항목	<ul style="list-style-type: none"> • CBC • 혈액도말표본평가 • PCR(빈혈, 진드기, 바베시아) • Cyclosporine • Coombs Direct • Lymphoma(PARR) 	
첨가제	응고 촉진제	 Plain Tube	첨가제	항응고제(Sodium Citrate)	 Sodium Citrate
검체취급	5-10회 전도 혼합, 15~30분 방치하여 응고시킨 후 바로 원심 분리 (3000RPM/10분) 상층의 혈청을 분리하여 다른 멸균 용기에 담는다.		검체취급	항응고제(S.C)와 혈액량을 1:9의 비율로 맞추고 10회 이상 충분히 전도혼합, 원심분리(3000RPM, 15분) 후 상층의 혈장만 분리하여 냉동 보관	
검사항목	<ul style="list-style-type: none"> • Serum Chemistry • 중요한 내분비 검사 • 약물검사(Cyclosporine 제외) 		검사항목	<ul style="list-style-type: none"> • PT • APTT • Fibrinogen • D-Dimer(Canine) 	

3. 여러 종류의 검사용기에 혈액을 담는 순서



Reference

1. Linn Clarizio, DVM, Kansas State University
Lisa M. Pohlman, DVM, MS, DACVP, Kansas State University
<https://www.cliniciansbrief.com/article/top-5-blood-collection-sampling-errors>
2. Green Vet 검사항목 리스트
3. www.gclabs.co.kr :권장 채취 순서

글, 사진 진단검사Unit 양화순 수의사

