



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

ABO 동종응집소 역가 측정 방법의
비교평가

아주대학교 대학원

의학과/의학전공

강 선 주

ABO 동종응집소 역가 측정 방법의 비교평가

지도교수 임 영 애

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2013년 8월

아주대학교 대학원

의학과/의학전공

강 선 주

강선주의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 위 교 인

심사위원 임 영 애 인

심사위원 조 성 란 인

아주대학교 대학원

2013년 6월 28일

ABO 동종응집소 역가 측정 방법의 비교평가

ABO 혈액형의 동종응집소 역가는 주로 ABO 부적합 장기 이식 시 측정되며 환자의 경과나 예후 평가뿐만 아니라 환자 처치를 결정하는 중요한 지표로 사용되고 있다. 그러나 검사법이 다양하고 표준화 되어있지 않아 검사실 간의 결과 값 차이가 심하다. 본 연구에서는 적혈구 부유액 제조 조건에 대해 평가하고 여러 측정 방법 중 시험관법과 미세원주응집법 및 유세포 분석법을 비교하고자 하였다.

검사에 사용되는 혈청은 아주대학교 병원에서 건강검진을 받은 성인의 각 혈액형의 검체와 검사용 현혈혈액을 사용하여 서로 다른 조건에서 혈액형 별 ABO 동종응집소 역가를 측정하였다. 적혈구 부유액 조건은 제조일자, 농도 및 혈청과의 비율, 적혈구 종류, 0.8% 제조법을 평가하였고 판독기준은 약양성과 '1+' 응집으로 관찰하였다. 또한 측정 방법 간의 비교를 위하여 시험관법과 미세원주응집법(겔 카드법)에 대해 각각 실온법과 간접항글로불린법을 병행하고 유세포분석법은 IgM 항체와 IgG 항체를 측정하여 결과값을 서로 비교하였다. 역가는 유세포분석법의 경우 평균 형광 강도 비(Mean fluorescence intensity ratio, MFIR)를 적용하였으며 이를 위한 기준치(cut-off)를 구하여 적용하였다.

적혈구 부유액은 경우에 따라 제조 후 6~7 일째에 역가에 유의한 차이를 보일 수 있는 것으로 확인하였고 적혈구 부유액 농도와 혈청의 비율은 각각 2% 검체 동량, 3% 검체 반량, 3% 검체 동량 군을 비교하였을 때 3% 검체 동량의

적혈구 부유액이 나머지 두 경우보다 유의하게 낮은 값을 보였다. EDTA 환자 검체 적혈구, Citrate phosphate dextrose adenine(CPDA-1) 현혈자 적혈구, 상품 적혈구를 사용했을 때와 서로 다른 0.8% 적혈구 부유액 제조법은 결과에 영향을 주지 않았다. 시험관법과 겔 카드법을 비교하면 두 측정 방법의 간접항글로불린법으로 시행했을 때의 O 혈청의 항-B의 역가를 제외한 나머지 경우에서 모두 유의한 차이가 있었다. 시험관 실온법, 겔 카드 실온법, 유세포 IgM 법을 비교하였을 때는 유세포 분석법이 가장 민감하였고, 시험관 간접항글로불린법, 겔 카드 간접항글로불린법, 유세포 IgG 법을 비교하였을 때는 O 형 혈청의 항-A는 겔 카드법이 가장 민감하였으나 나머지 모든 경우 시험관법이 더 민감하였다.

따라서 검사실에서 자체 제조 적혈구를 사용하는 경우 제조 후 5 일 이내 사용하고 시험관법에서 검체 반량의 3% 적혈구 부유액을 사용하는 것이 검사실 간 차이를 최소화하기 좋은 방법으로 여겨졌다. 또한 동일 검사실에서도 측정 방법에 따라 역가가 상이하였으므로 역가 판독시 유의하여야 할 것으로 생각되었다.

핵심어 : ABO 동종응집소, 역가 측정, 표준화, 적혈구 부유액

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림차례	v
표차례	vi
I. 서론	1
II. 연구대상 및 방법	3
A. 연구대상	3
B. ABO 동중응집소 역가 측정법	3
1. 시험관법	4
2. 미세원주응집법	4
3. 유세포 분석법	5
C. 분석 방법	6
1. 적혈구 부유액 제조 조건에 따른 결과값 변화	6
2. 시험관법, 미세원주응집법(겔 카드법), 유세포 분석법의 비교	8
D. 통계 분석	9
III. 결과	10
A. 대상군 검체의 특징	10
B. 적혈구 부유액 제조 조건에 따른 결과값 변화	10
C. 시험관법과 미세원주응집법(겔 카드법)의 비교	13
D. 시험관법과 미세원주응집법(겔 카드법), 유세포 분석법의 상대적 민감도	

평가	16
IV. 고찰	18
V. 결론	23
참고문헌	24
ABSTRACT	26



그림 차례

Fig. 1. Comparison of the effects by nonfixation and fixation of RBC 5

Fig. 2. Histogram of ABO isoagglutinin titers according to blood group(N=20) 14

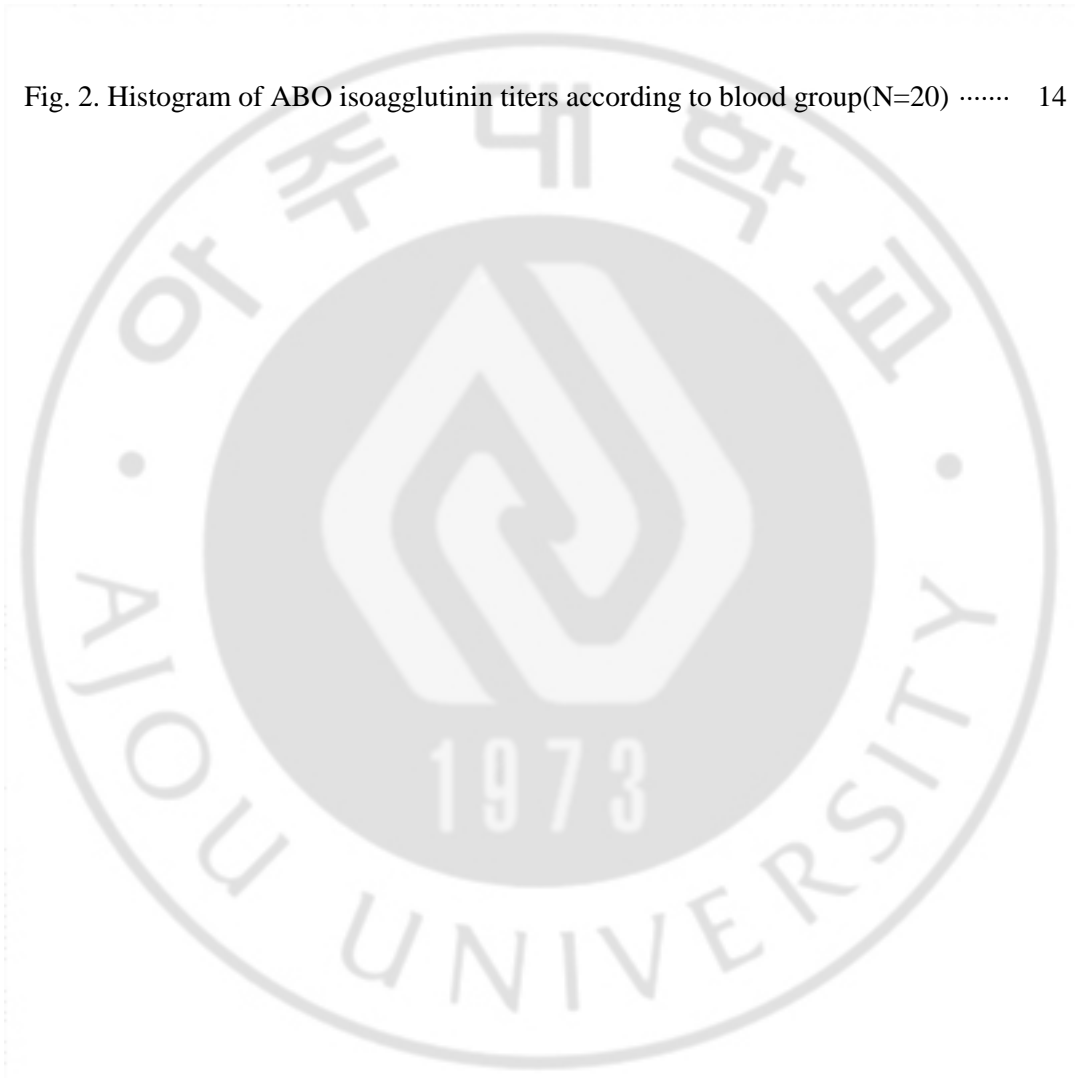


표 차례

Table 1. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to the storage day of RBC suspension in tube test	11
Table 2. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to the storage day of RBC suspension in gel test	11
Table 3. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to serum/RBC ratio in tube test	12
Table 4. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to different sort of RBC source in tube test	12
Table 5. Number(%) and score of specimens with the highest, same or the lowest titers according to the methods	15
Table 6. Probability for paired t-test of ABO isoagglutinin titers between tube test and gel test	16
Table 7. Mean MFIR and SD of 30 negative samples	16

I. 서 론

ABO 혈액형 항체, 즉 동중응집소는 상응하는 항원을 가진 적혈구와 반응하여 시험관 내에서는 주로 응집을 일으키고 체내에서는 보체를 활성화시켜 적혈구를 용혈시킨다. 따라서 용혈성 수혈 부작용의 원인이 될 수 있고, 적혈구 이외의 간, 비장, 신장 등의 실질기관에도 표현되는 조직적합성 항원이므로 골수 이식에서의 생착 지연 및 고형장기 이식에서 울혈, 혈전 및 출혈 등 거부반응을 유발할 수 있다. 그러므로 ABO 동중응집소의 역가는 ABO 부적합 골수 이식의 예후 평가에 필요할 뿐만 아니라 최근 증가하고 있는 ABO 부적합 장기 이식에서도 환자 처치를 결정하는 중요한 지표로 사용되고 있어 검사 빈도가 증가하고 있다. 그러나 이러한 검사의 중요도에 비해 검사실 간의 결과 값 차이가 심한데, 이는 측정 방법이 다양하고 표준화 되어있지 않아 각 검사기관마다 다른 방법을 사용하고 있기 때문이다. 역가 측정이란 혈청 내에 있는 항체의 농도를 알아내거나 서로 다른 적혈구의 항원 표현 강도를 비교하기 위한 반 정량적인 방법으로서, ABO 동중응집소 역가를 측정하는 원리는 피검 혈청을 생리식염수로 연속 배수 희석하여 이를 A 혈구 또는 B 혈구와 반응시켜 응집이 일어나는 최고 희석배수를 응집소 역가로 결정하는 것이다. 검사실에서 가장 흔하게 사용되는 측정 방법은 시험관을 이용하여 육안으로 적혈구응집을 관찰하는 시험관법으로, 자동화가 어렵고 검사자의 주관이 개입될 수 있으나 국내의 보험급여체계에서 통상적인 동중응집소 역가 검사에 널리 이용되고 있다. 전통적 방법인 시험관법 외에는 미세원주응집법의 한 가지인 겔 카드법이 주로 사용되는데 이는 미세시험관 내에서 응집이 일어난 적혈구를 겔 상부에서

관찰하는 방법으로, 시험관법에 비해 비교적 결과 판독이 객관적이고 소요되는 시간이 짧으며 수기 과정이 보다 간편한 등의 장점이 있다. A 형과 B 형에서 발견되는 항-A 와 항-B 는 대부분의 동형이 IgM 인 반면 O 형에서는 IgG 가 주된 구성이며, 두 가지 모두 실온 혹은 실온 이하에서도 반응하고 37℃에서 보체를 효과적으로 활성화시킬 수 있는 것으로 되어 있다(Roback 등, 2011). 시험관법과 미세원주응집법에서는 실온에서 항원-항체 반응을 시킴으로써 IgM 이 주로 측정되는 단계를 일반적으로 많이 사용하고, 또는 추가로 IgG 의 검출을 돕기 위하여 간접항글로불린법을 적용할 수 있다. 근래에는 유세포 분석법(flow cytometry, FCM)이 소개되어(Stussi G 등, 2005; Tanabe, 2007) 재현성이 좋고 동형에 특이적인 항체를 사용함으로써 IgM 형과 IgG 형을 측정하는데 가장 타당성 있는 방법으로 알려졌으나 국내에는 이에 대한 시도가 매우 미흡한 실정이다(Won DI 등, 2012).

따라서 본 연구에서는 첫째, 결과값에 영향을 미치는 검사 요인 중 아직까지 표준화된 참고자료가 미비한 적혈구 부유액 제조 조건에 대해 평가하여 측정 방법의 표준화에 기여하고 둘째, 유세포 분석법을 비롯한 다양한 동중응집소 측정법들을 비교하여 평가함으로써 각 측정 방법에 따른 결과값의 차이를 이해하고 평가하는데 도움이 되고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

A. 연구대상

2012 년 9 월부터 12 월까지 아주대학교 병원에서 건강검진을 받은 성인의 검사 시행 후 폐기 예정인 잔여 혈청과 적혈구를 이용하였다. A 형, B 형, O 형의 동중응집소 역가를 여러 조건에서 측정하여 비교하기 위해서 혈청은 동일 혈액형의 3 명 이상의 검체를 혼주한 다음 소량씩 나누어 -70℃에서 보관하였다. 혈청과 반응할 혈구는 혈액은행에서 ABO 동중응집소 검사에 이용되는 CPDA-1 농축 적혈구 현혈혈액백의 관 분절액을 사용하되, 3 개의 관 분절을 혼주하여 개인 간 변이를 감소시켰다. 적혈구 종류를 비교한 실험에서는 추가로 EDTA 전혈 잔여 검체와 상품 적혈구 DiaCell ABO(DiaMed GmbH, Cressier, Switzerland)를 이용하였으며, EDTA 전혈은 관 분절액과 마찬가지로 3 개의 검체를 혼주하였다. 사용된 CPDA-1 혈액백 관 분절액은 제조일로부터 2 주 이내, EDTA 환자 검체 적혈구는 채혈일로부터 2 일 이내의 검체를 이용하였다. 본 연구는 아주대학교 병원 기관연구윤리심의위원회(Institutional review board)의 승인을 받았다.

B. ABO 동중응집소 역가 측정법

검체는 시험관을 10 개 준비하여 모든 시험관에 생리식염수를 0.2mL 씩 분주하고 첫째 시험관에 피검혈청 0.2mL 를 넣어 파이프트로 잘 혼합한 후 0.2mL 씩 다음 시험관으로 옮기는 방법으로 연속 배수 희석하여 준비하였다. 혈청과 반응할 혈구는 충분한 양의 생리식염수에 3 회 세척 후 3% 농도에 맞춘

적혈구 부유액을 기본으로 하여 시험관법에는 이를 그대로 사용하였고 겔 카드법은 생리식염수로 추가 희석하여 0.8%로, 유세포 분석법의 경우 별도의 고정과정을 거치고 나서 1%로 제조하여 사용했다.

1. 시험관법

실온법은 연속 배수 희석된 검체들을 시험관 10 개에 각각 100 μ L 씩 넣은 후 A 형 혹은 B 형 3% 적혈구 부유액을 50 μ L 씩 혼합하여 실온에서 30 분 반응시키고 3400rpm 에서 15 초 원심 침전하여 응집을 관찰하였다. 간접항글로불린법은 실온법 판독 후 잘 흔들어 섞은 시험관을 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 반응시키고 생리 식염수로 4 회 세척 후 항글로불린 시약 50 μ L 를 떨어뜨려 잘 혼합한 후에 마찬가지로 원심 침전하여 응집을 관찰하였다. 판독은 약양성 또는 '1+' 응집을 보이는 최고희석배수를 역가로 각각 구분하였다.

2. 미세원주응집법(겔 카드법)

미세원주응집법은 겔 카드의 각 미세시험관에 A 형 혹은 B 형 0.8% 적혈구 부유액을 50 μ L, 연속 배수 희석된 검체를 25 μ L 씩 넣고 15 분간 반응 후 전용 원심분리기에서 10 분 원심 침전하여 응집을 관찰했다. 실온법의 경우 ID-Card NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins(Dia-Med AG, Cressier, Switzerland)를 이용, 실온에서 반응시키고 항글로불린법의 경우 ID-Card LISS/Coombs(Dia-Med AG)를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 판독은 약양성 또는 '1+' 응집을 보이는 최고희석배수를 역가로 각각 구분하였다.

3. 유세포 분석법

적혈구 응집을 막기 위한 적혈구 표면 고정법은 glutaraldehyde 를 이용한 방법(Berneman ZN 등, 1991)을 참고하여 농도별로 반응시킨 적혈구 부유액의 유세포 분석 결과를 비교하였다. 적혈구 응집이 없으면서 항원 손실이 가장 적고 비특이적 항체 반응을 최소로 하는 적정 고정액 농도를 0.05%로 설정하였고, 항원-항체 반응 및 형광시약 반응 후에 적혈구 응집이 일어나지 않음을 유세포 분석기 화면과 현미경 하에서 확인하였다(Fig. 1).

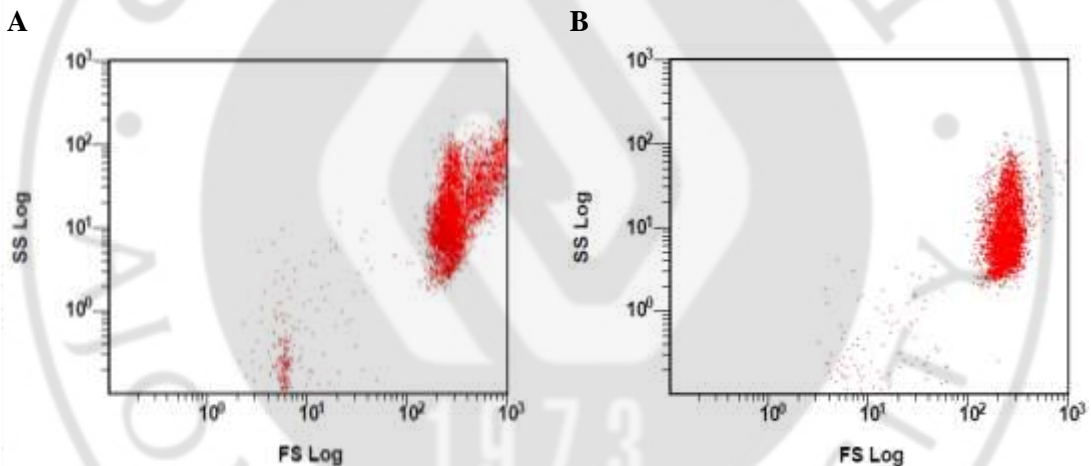


Fig. 1. Comparison of the effects by nonfixation and fixation of RBC. Each sample was examined in unfixed state(A) and after fixation with 0.05% glutaraldehyde(B). The same red blood cell(RBC) was used in both dot plots, which is group B RBC incubated with group A serum and then FITC-labeled goat anti-human IgM.

혈청-혈구 반응 및 분석은 적혈구 표면에 부착된 면역글로불린의 검출을 위해 시도된 바 있는 프로토콜(원동일, 2003; Stussi G 등, 2005)을 일부 변형하여 사용하였다. 먼저 적혈구 표면 고정을 위해 3% 적혈구 부유액 500 μ L 를 동량의

0.05% glutaraldehyde 와 실온에서 5 분간 반응 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 3 회 세척하여 약 1%($0.1 \times 10^6/\mu\text{L}$)가 되도록 맞추었다. 각 시험관에 적혈구 부유액 40 μL , 검체 50 μL 를 넣고 실온에서 30 분간 반응 후 3 회 세척한 다음, fluorescein isothiocyanate(FITC) 형광이 표지된 항-Ig 항체를 넣고 실온 암소에서 30 분 두었다가 PBS 로 2 회 세척하고 유세포 분석기로 측정하였다. ABO 동종응집소를 표지하기 위한 항체로는 goat anti-human IgM(Beckman Coulter, CA, USA)과 goat anti-human IgG(Beckman Coulter)를 사용하였으며 사용량은 제조사의 권고를 따랐다. 유세포 분석기는 Cytomics FC 500(Beckman Coulter)를 사용하였고, CXP Software(Beckman Coulter) 프로그램을 이용하여 forward light scatter(FSC)와 side light scatter(SSC)를 log amplification 하였다(Fig. 1). 적혈구 위치에 해당하는 부위를 gating 하여 최소 10,000 개 이상이 되도록 acquisition 후 적혈구의 형광 항체 히스토그램을 얻었다. 각 검체의 형광 강도는 검체/대조 평균 형광 강도 비율(mean fluorescence intensity ratio, MFIR)을 구하였고 음성 대조군으로는 AB 형 혈청에 O 형 혈구를 반응시켜 사용하였다. 기준치(cut-off 값)는 조합이 혈청-혈구 반응 음성인 검체의 MFIR 을 14 일간 30 개 측정하여 평균에 3 \times 표준편차(3 standard deviation, 3SD)를 더한 값으로 설정하였다(Won DI 등, 2012). 기준치 설정을 위하여 측정한 검체의 혈청-혈구의 혈액형(검체 수) 조합은 다음과 같다; AB-A(6), AB-B(6), AB-AB(1), A-A(6), B-B(5), A-O(3), B-O(3).

C. 분석 방법

1. 적혈구 부유액 제조 조건에 따른 결과값 변화

가. 적혈구 부유액 날짜 변화

적혈구 부유액을 제조 후 시간에 따라 결과값의 차이가 생기는지 알아보기 위해 동일한 검체에 대하여 적혈구 부유액을 제조한 날부터 7 일간 연속 측정하였다. 각 혈액형 별로 시험관법은 총 20 개, 겔 카드법은 총 10 개의 검체에 대하여 실시하였다.

나. 적혈구 농도 및 비율

시험관법에서 검체와 적혈구 부유액의 반응 비율에 따른 영향을 보기 위해 동일한 검체에 대하여 적혈구 부유액을 각각 2% 검체 동량(100 μ L), 3% 검체 반량(50 μ L), 3% 검체 동량(100 μ L)으로 나누어 측정값을 비교하여 각 40 회씩 측정하였다.

다. 적혈구 종류

시험관법에서 적혈구의 종류를 EDTA 환자 검체 적혈구, CPDA-1 농축 적혈구 및 상품 적혈구로 하였을 때 결과값의 차이가 있는지 살펴보기 위해서 동일한 검체를 다른 적혈구 부유액으로 5 회씩 측정하여(상품 혈구의 경우 반복 측정) 각 군당 60 회씩 측정하였다.

라. 0.8% 적혈구 부유액 제조법

겔 카드법에 사용하는 0.8% 적혈구 부유액 제조법에 따른 영향을 알아보기 위해 0.9% 생리식염수로 제조한 것, 저이온염용액(low ionic strength saline, LISS)

성분의 전용 희석액을 사용한 것, 생리식염수를 사용한 3% 적혈구 부유액을 전용희석액으로 추가 희석한 것 세 가지 군으로 나누어 측정하였고 각 8 회씩 측정하였다.

2. 시험관법, 미세원주응집법(겔 카드법), 유세포 분석법의 비교

동일 검체에 대하여 무작위의 적혈구 부유액으로 시험관 법 2 가지, 겔 카드법 2 가지, 유세포 분석법 2 가지를 각각 시행하였고 혈액형 별로 각 20 회씩 역가를 측정하였다. 반응 단계에 따라 시험관 실온법, 겔 카드 실온법, 유세포 IgM 법을 서로 비교하고 시험관 간접항글로불린법, 겔 카드 간접항글로불린법, 유세포 IgG 법을 서로 비교하였다. 시험관법과 겔 카드법의 판독 기준은 ‘1+’ 응집을 보이는 최고희석배수를 역가로 하였다.

이때 가장 민감한 검사를 평가하기 위하여 시험관법과 겔 카드법을 먼저 측정한 다음, 두 방법 가운데 얻은 더 높은 결과값을 기준으로 그 역가(시험관법이나 겔 카드법에서 측정된 가장 높은 역가)보다 한 개 배수 높은 희석배수의 검체(시험관법이나 겔 카드법 음성 검체)를 유세포 분석법으로 측정하였다. 만약 양성이 확인되면 해당 검체를 세 측정 방법 중 유세포 분석법에서 가장 높은 역가를 보인 검체로 분류하고, 음성일 경우 시험관법이나 겔 카드법에서 측정된 가장 높은 역가(시험관법이나 겔 카드법 양성 검체)에서 양성을 보이는지 확인했다. 이 때 양성이면 같은 역가를 보인 것으로, 음성이면 그 보다 낮은 역가로 간주하였다. 이를 점수로 매겨 가장 높은 역가를 보인 검체를 2 점, 세 방법 중 높은 값이 두 개 이상일 때를 1 점을 매겨서 합산한 값을 각 검사법의 상대적인 민감도로 정의하였다.

D. 통계분석

적혈구 부유액의 제조 조건 평가를 위해 Friedman test 및 Wilcoxon signed rank test, Kruskal-Wallis test 를 사용하였으며, 시험관법과 겔 카드법의 비교는 paired t-test 로 분석하였다. ABO 동종응집소 역가를 로그 변환 후 통계처리 하였으며 프로그램은 Excel(Microsoft Corporation, WA, USA)과 SPSS version 12.0.1 for Window(SPSS, Chicago, USA)를 이용하였다.



III. 결 과

A. 대상군 검체의 특징

대상군의 연령은 평균 47.1 세로 26 세부터 74 세까지 분포하였으며, 혈액형 별로 각각 A 형 79 명(남자 49 명, 여자 30 명), B 형 75 명(남자 41 명, 여자 34 명), O 형 85 명(남자 48 명, 여자 37 명)의 검체가 사용되었다. 유세포 분석에 사용된 음성 대조군은 AB 형 42 명(남자 24 명, 여자 18 명)이었다.

B. 적혈구 부유액 제조 조건에 따른 결과값 변화

적혈구 부유액 제조 후 동일 적혈구 부유액으로 연속 7 일간 측정된 ABO 동종응집소 역가의 중앙값은 Table 1 및 Table 2 와 같다. Friedman test 결과 시험관법에서는 실온법은 판독기준에 상관없이 5 일째까지 결과값에 유의한 차이가 없었으나 6 일째부터 유의한 차이를 보였다($P=0.005$). 간접항글로불린법은 '1+' 응집을 최종역가로 했을 때는 7 일까지 결과값에 유의한 차이가 없었으나 약양성 기준 판독 시 6 일까지 유의한 차이가 없다가 7 일째부터 역가에 유의한 차이를 보였다($P=0.033$). 겔 카드법은 실온법과 간접항글로불린법 모두 '1+' 응집을 기준으로 판독할 때는 7 일째까지 결과의 유의한 차이가 없었으나 약양성으로 판독할 경우 5 일째부터 실온법($P=0.006$)과 간접항글로불린법 ($P=0.009$)에서 역가에 유의한 차이를 보였다.

적혈구 농도 및 비율을 세가지로 구분하여 측정한 시험관법의 결과값은 Table 3 과 같다. 40 개 검체에 대하여 Friedman test 후 Wilcoxon signed rank test (Bonferroni correction 사용)로 분석한 결과 실온법 및 간접항글로불린법 모두

Table 1. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to the storage day of RBC suspension in tube test.

Blood group	Antibody No.	Day	Room temperature incubation														Indirect antiglobulin test													
			1+ reading							Trace reading							1+ reading							Trace reading						
			1*	2*	3*	4*	5*	6	7	1*	2*	3*	4*	5*	6	7	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7
A	Anti-B	5	3	3	3	4	4	3	3	4	5	4	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	4
B	Anti-A	5	4	4	4	4	4	3	3	4	5	5	5	5	4	4	4	4	4	3	3	3	3	5	4	5	4	4	4	4
O	Anti-A	5	5	5	5	5	5	4	3	5	6	6	6	5	5	4	6	6	6	6	5	6	6	7	6	7	6	7	7	6
O	Anti-B	5	4	4	4	5	4	4	3	5	5	5	5	5	5	4	6	6	6	6	6	6	6	7	7	6	7	6	7	7
	total	20	4	4	4	4	4	4	3	5	5	5	5	5	5	4	6	6	6	6	5	6	6	7	6	6	6	6	7	6

* $P > 0.05$ by Friedman test

Table 2. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to the storage day of RBC suspension in gel test.

Blood group	Antibody No.	Day	Room temperature incubation														Indirect antiglobulin test													
			1+ reading							Trace reading							1+ reading							Trace reading						
			1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	1*	2*	3*	4*	5	6	7	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	1*	2*	3*	4*	5	6	7
A	Anti-B	1	2	2	2	2	1	1	1	3	2	2	2	1	2	1	2	3	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
B	Anti-A	3	2	2	2	2	2	1	2	2	3	2	2	2	2	3	4	3	4	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3	
O	Anti-A	3	3	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	7	8	7	8	7	8	7	7	7	7	7	8	7	7
O	Anti-B	3	4	3	3	3	3	3	3	4	3	4	4	3	4	3	6	7	6	7	6	7	6	7	7	7	7	7	7	7
	total	10	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4	4	3	4	3	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7

* $P > 0.05$ by Friedman test

Table 3. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to RBC/serum ratio in tube test.

Blood group	Antibody	No.	Room temperature incubation						Indirect antiglobulin test						
			RBC ratio	1+ reading			trace reading			1+ reading			trace reading		
				2%	3%	3%*	2%	3%	3%*	2%	3%	3%*	2%	3%	3%*
A	Anti-B	10	4	4	3	5	5	4	4	4	4	5	5	5	
B	Anti-A	10	4	5	4	5	6	5	4	4	4	5	5	5	
O	Anti-A	10	5	5	4	5	6	5	6	6	5	7	7	6	
O	Anti-B	10	5	4	4	6	5	5	6	6	5	7	7	6	
	total	40	4	4	4	5	5	5	5	5	5	6	6	6	

* $P < 0.001$ vs 2% with 1:1 and 3% with 2:1; Abbreviations: ratio, volume of serum : volume of RBC suspension

Table 4. Median values of ABO isoagglutinin titers as log base 2 according to different sort of RBC source in tube test.

Blood group	Antibody	No.	Room temperature						Indirect antiglobulin test						
			RBC	1+ reading			trace reading			1+ reading			trace reading		
				EDTA	CPDA-1	CP	EDTA	CPDA-1	CP	EDTA	CPDA-1	CP	EDTA	CPDA-1	CP
A	Anti-B	15	4	4	4	5	5	4	4	4	4	5	5	5	
B	Anti-A	15	4	4	4	5	5	5	4	4	4	5	5	4	
O	Anti-A	15	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	6	7	
O	Anti-B	15	4	4	5	5	5	5	6	6	6	7	7	6	
	total	60	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6	6	6	

There was no significant difference in titers between RBC sources. Abbreviations: CP, commercialized product

판독기준에 상관없이 3% 동량(100 μ L)으로 측정된 경우가 나머지 두 가지에 비해 유의하게 낮은 역가를 보였다($P < 0.001$).

시험관법에서 EDTA 환자 검체 적혈구, CPDA-1 농축 적혈구 및 상품 적혈구 부유액의 차이를 비교한 결과는 Table 4 와 같다. 실온법 및 간접항글로불린법의 역가를 각각 Kruskal-Wallis test 로 분석한 결과 두 방법 모두 판독기준과 상관없이 세 종류의 적혈구 사이에는 결과값에 유의한 차이가 없었다.

겔 카드법에서 0.8% 적혈구 부유액 제조법에 따른 영향을 보기 위하여 0.9% 생리식염수로 제조한 것, 전용 희석액을 사용한 것, 생리식염수로 제조한 3% 적혈구 부유액을 전용 희석액으로 최종 희석한 것을 비교했을 때, Friedman test 에서 실온법 및 간접항글로불린법 모두 판독기준에 상관없이 세 적혈구 사이에는 역가에 유의한 차이가 없었다.

C. 시험관법과 미세원주응집법(겔 카드법) 비교

실온법과 간접항글로불린법 두 가지 단계(phase)로 시행한 시험관법과 겔 카드법의 혈액형별 역가 분포는 Fig. 2 와 같다. 실온법의 경우 시험관법이 겔 카드법에 비해 A 혈청의 항-B 는 평균 3 개 배수, B 혈청의 항-A 는 평균 2 개 배수, O 혈청의 항-A 및 항-B 는 평균 1 개 배수만큼 항체 역가가 더 높았다. 두 측정 방법의 간접항글로불린법을 비교했을 때는 시험관법이 겔 카드법에 비해 A 혈청의 항-B 는 평균 3 개 배수, B 혈청의 항-A 는 평균 2 개 배수 더 높았다. 반면 O 혈청의 경우 항-A 는 겔 카드법이 평균 1 개 배수 더 높았고 항-B 는 두 측정 방법이 비슷한 값을 보였다. 특히 A 형 및 B 형 혈청은 실온법과 간접항글로불린법 모두 거의 항상 시험관법의 역가가 겔 카드법의 역가보다 더

높았다(Table 5). 두 측정 방법의 간접항글로불린법으로 시행한 O 혈청의 항-B 의 역가를 제외한 나머지 경우에서 모두 유의한 차이가 있음을 paired t-test 로 확인하였다(Table 6).

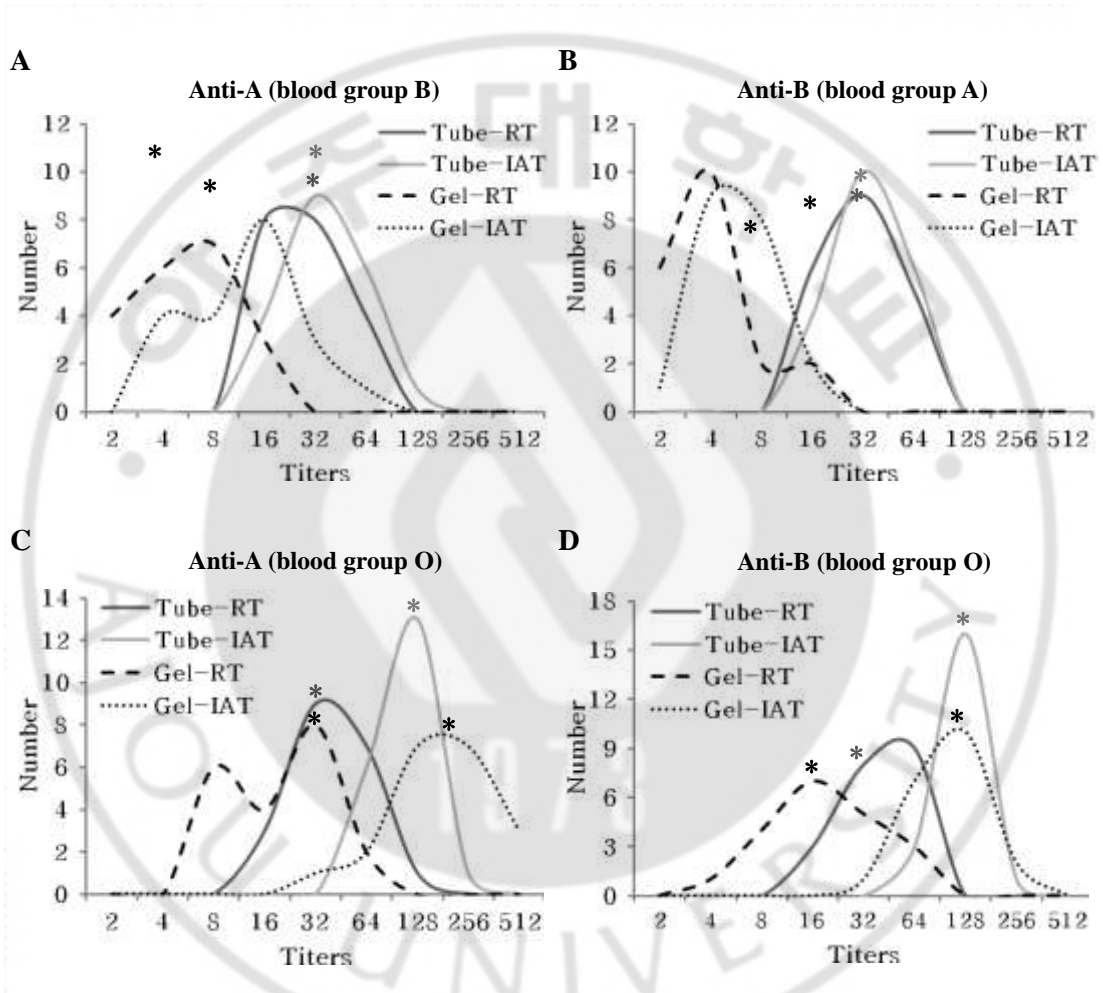


Fig. 2. Histogram of ABO isoagglutinin titers according to blood group (N=20).

Abbreviations: RT, room temperature incubation method; IAT, indirect antiglobulin test

Statistical significance: See Table 6; *, median value

Table 5. Number(%) and score of specimens with the highest, same or the lowest titers according to the methods.

Antibody (Blood group)		RT or FCM-IgM			IAT or FCM-IgG		
		Tube test	Gel test	FCM	Tube test	Gel test	FCM
Anti-B (A)	Highest	4(20)	0(0)	13(65)	20(100)	0(0)	0(0)
	Same	3(15)	0(0)	3(15)	0(0)	0(0)	0(0)
	Lowest	13(65)	20(100)	4(20)	0(0)	20(100)	20(100)
	Score	11	0	29	40	0	0
Anti-A (B)	Highest	0(0)	0(0)	17(85)	20(100)	0(0)	0(0)
	Same	3(15)	0(0)	3(15)	0(0)	0(0)	0(0)
	Lowest	17(85)	20(100)	0(0)	0(0)	20(100)	20(100)
	Score	3	0	37	40	0	0
Anti-A (O)	Highest	1(5)	0(0)	16(80)	1(5)	9(45)	3(15)
	Same	3(15)	0(0)	3(15)	4(20)	6(30)	6(30)
	Lowest	16(80)	20(100)	1(5)	15(75)	5(25)	11(55)
	Score	5	0	35	6	24	12
Anti-B (O)	Highest	1(5)	0(0)	13(65)	3(15)	1(5)	3(15)
	Same	6(30)	1(5)	6(30)	12(60)	12(60)	11(55)
	Lowest	13(65)	19(95)	1(5)	5(25)	7(35)	6(30)
	Score	8	1	32	18	14	17

Highest, The specimen with the highest titer among three methods; Same, The specimens with upper 2 or more titer among three methods; Total score calculated by 2x'Highest' + 'Same' was considered as relative sensitivity of the method.

Abbreviations: see Fig. 2

Table 6. Probability for paired t-test of ABO isoagglutinin titers between tube test and gel test.

Blood group	Antibody	No.	P value	
			Tube-RT and Gel-RT	Tube-IAT and Gel-IAT
A	Anti-B	20	< 0.001	< 0.001
B	Anti-A	20	< 0.001	< 0.001
O	Anti-A	20	< 0.001	0.007
O	Anti-B	20	< 0.001	0.096

Abbreviations: see Fig. 2

D. 시험관법, 미세원주응집법(겔 카드법), 유세포 분석법의 상대적 민감도 평가

유세포 분석법의 기준치 설정을 위해 측정된 음성 검체의 평균 MFIR 및 표준편차는 Table 7 과 같으며, 따라서 IgM 법과 IgG 법은 MFIR 이 각각 1.48 과 1.83 이 넘을 때 양성으로 판독하였다.

Table 7. Mean MFIR and SD of 30 negative samples

	Mean MFIR	SD	Cut-off value (MFIR+3SD)
IgM	1.01	0.16	1.48
IgG	1.05	0.26	1.83

시험관법과 겔 카드법을 먼저 측정하여 얻은 더 높은 역가의 검체를 유세포 분석법으로 평가하여 결과적으로 동일 검체를 세 가지 측정 방법으로 측정했을 때 결과의 대소 관계를 정리하였다(Table 5). 이를 점수를 매겨서 상대적 민감도를 가늠한 결과 시험관 실온법, 겔 카드 실온법, 유세포 IgM 법을 비교하면 유세포 분석법이 가장 높은 역가를 나타내는 민감한 검사로 볼 수 있었다. 시험관 간접항글로불린법, 겔 카드 간접항글로불린법, 유세포 IgG 법을 비교하였을 때에는 A 형 혈청의 항-B 와 B 형 혈청의 항-A 는 시험관법이, O 형 혈청의 항-A 는 겔 카드법이 점수가 더 높았다. 다만 O 형 혈청의 항-B 는 시험관법이 근소한 차이로 점수가 조금 더 높았으나 겔카드 및 유세포 분석법과 거의 비슷한 민감도를 보이는 것을 알 수 있었다.

IV. 고 찰

ABO 혈액형 부적합 이식은 혈장교환술과 면역억제치료의 발전 및 장기이식 수요에 대한 수급 불균형으로 인하여 증가하는 추세이며, 항체 제거의 효율성 평가, 처치 결정, 예후 평가에 중요한 ABO 동종응집소 역가 측정법은 방법 간의 결과 값 차이가 아직까지 해결되지 않은 큰 문제이다.

시험관법은 가장 널리 이용되는 방법임에도 불구하고 표준법 미비로 인한 검사실 간 결과 값 차이가 가장 큰 측정 방법으로, 그 예로 4 개 의료 기관을 조사한 국내 보고에서 IgM 역가 및 IgG 역가가 최대 16 배와 32 배의 차이를 보인 것으로 보고하였다(이은영 등, 2011). 29 개 기관을 대상으로 실시한 일본의 보고에서도 IgM 역가는 최대 32 배, IgG 역가는 최대 256 배 차이가 있었다고 하였다(Kobayashi 등, 2006). 검사를 반복 실행했을 때 기법의 차이와 생물학적 변동성에 따라 양방향으로 한 배수의 차이는 있을 수 있으나 3 개 배수(8 배) 이상은 의미 있는 차이로 볼 수 있으므로(Roback 등, 2011) 시험관법을 신빙성 있는 지표로 사용하기 위해서는 표준화가 시급한 것을 알 수 있다.

미세원주응집법은 시험관법에 비하여 기관간의 역가 차이를 유의하게 감소시킬 수 있는 것으로 보고되었고(Kumlien G 등, 2007) 또한 검사소요시간이 짧으면서 기존의 시험관법과 일치율이 높은 등의(Shirey RS 등, 2010) 유용성이 보고되고 있고 자동화가 가능하지만 검사비용이 고가라는 단점이 현실적으로 가장 큰 한계점이다.

유세포 분석법은 일반적으로 혈액종양의 진단에 주로 적용되어 왔으나, 적혈구 혈청학에서도 같은 원리로서 적용될 수 있는 측정 방법으로, 아직까지

혈액은 혈액 분야에서 널리 사용되고 있지는 않으나 그 민감도와 특이도에 있어서 유용하게 사용될 수 있는 검사법이다. Stussi G 등(Stussi G 등, 2005)은 유세포 분석법이 적혈구 응집이나 용혈 같은 이차적 결과를 원리로 하는 기존의 방법에 비해 적혈구에 표현된 항원에 부착된 항체의 존재를 직접 측정한다는 점과 IgG 아형까지도 구별 가능하다는 장점을 강조하였고, Won DI 등(Won DI 와 Kim BC, 2012)은 유세포 분석법의 프로토콜에 따라 미세원주응집법보다 더 민감한 측정 방법이 될 수 있다고 하였다.

ABO 동종응집소 역가를 측정하는데 있어서 결과값에 영향을 줄 수 있는 요인은 많이 있겠으나 이 중 본 연구에서는 검체와 직접 반응하는 적혈구 부유액의 제조 조건을 고려해보았다. 일반적으로 수혈 의학에서 많이 쓰이는 적혈구 부유액은 검사실에서 손쉽게 만들 수 있으나 안정성이 검증되지 않았을 때는 제조 당일에만 사용하도록 하고 있다(Roback 등, 2011). 실험 결과 시험관 실온법에서 6 일째부터 1 배수 이내에서 유의하게 낮은 결과를 보였으나 이 정도는 역가 검사의 허용범위일 수 있으므로 이를 참고하여 사용하는 것이 좋겠다. 겔 카드법은 일반적으로 '1+' 응집을 기준으로 판독하고 있고 이 경우 7 일째까지 안정한 것으로 보인다.

적혈구 농도 및 용량에 대한 지침으로는 검체와 적혈구 부유액의 비율을 1:1(2%, 2drops+2drops)로 반응 시키거나(Roback 등, 2011), 2:1(3% 상품 적혈구, 100 μ L+50 μ L)로 반응시킨 경우(Kobayashi T 등, 2006), 농도를 명기하지 않고 1:2(1drop+2drops)으로(Tanabe K, 2007) 언급한 보고들이 있다. 상품 혈구들은 일반적으로 농도를 3%에 맞추어 판매되고 있으므로 검사실에서 자체 제조 적혈구 부유액을 사용하는 경우에는 검체 반량의 3% 적혈구 부유액을 사용하는 것이 검사법을 통일하는데 좋은 방법일 것으로 생각한다.

본 연구의 시험관 실온법에서의 항체 역가는 각 혈액형의 항체 종류와 상관없이 모두 중앙값 32 를 나타내어 과거 국내 연구(김재석 등, 1997)에서 한국 성인 ABO 동중응집소 역가가 혈액형과 상관없이 모두 중앙값 64 이었던 것과 유사하였고 분포에 있어서는 더 좁은 범위를 보였는데 이는 3 명 이상의 혈청을 혼주하여 개인간 변이가 다소 줄어들었기 때문으로 여겨진다.

측정 방법 간 역가 차이에 대한 이전의 연구를 살펴보면 간접항글로불린법의 경우 겔 카드법이 시험관법과 한 단위 이상의 차이를 보이지 않는다는 보고들이 있다. 본 연구에서는 각 혈액형별 혈청에서 항체 종류에 따라 역가 차이가 3 개 배수까지 있었던 것에 비하여 50 명의 ABO 부적합 신장 이식 환자를 대상으로 한 ABO 동중응집소 역가 검사에서는(Shirey RS 등, 2010) 대상군의 혈액형을 자세히 서술하지 않았고, 적혈구 이중항체를 가진 48 명을 대상으로 한 연구에서는(Finck R 등, 2013) 측정 대상에 ABO 동중응집소가 포함되지 않아 그 차이를 자세히 살펴보기 어려웠다. 시험관법과 미세원주응집법을 비교하였을 때 간접항글로불린법으로 측정한 O 형 환자의 항-B 에서 유의한 분포 차이가 없었던 점은 본 연구와 일치하였다(조치현 등, 2011).

유세포 분석법을 이용하여 ABO 동중응집소 역가를 측정한 이전의 연구에서는 Karnovsky 고정액(glutaraldehyde, 0.05%; formalin, 0.04%; CaCl₂ 0.00005%; 0.1M Cacodylate buffer, 0.0002%; pH=7.4)에 적혈구를 고정하여 각각 6%과 0.6% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS 에 세척하거나(Stussi G 등, 2005) 0.1M Na₂CO₃, 0.15M NaCl, 0.1mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)으로 만든 3mg/mL dimethyl suberimidate dihydrochloride 용액으로 적혈구 표면을 고정하는(Kobayashi T 등, 2006) 등의 다소 번거로운 방법을 사용한 바 있고 최근 0.1% paraformadehyde 를 이용하여 4°C에서 30 분간 적혈구 부유액과

반응시키는 비교적 단순화된 방법을 제시한 보고가 있었으나(Won DI 와 Kim BC, 2012) 여전히 응집 및 용혈이 일부 존재한다고 하였고 무엇보다 심한 응집 및 용혈로 인하여 IgM 의 측정이 불가능하였다. 그러나 본 연구에서는 glutaraldehyde 단일 시약을 사용하여 실온에서 짧은 시간에 검체를 처리하면서 적혈구 응집 및 용혈을 최소화하고 IgM 의 측정까지 가능한 방법을 제시하였다. 더불어 불완전한 적혈구 표면 고정의 영향을 최소화하기 위해 dithiothreitol(DTT)를 사용하게 되면 추가로 항온 및 세척의 과정이 추가 되는데 이 또한 불필요하다는 점에서 그 의의가 크다고 하겠다.

본 연구에서 세 측정 방법을 비교할 때 시험관 간접항글로불린법과 겔 카드 간접항글로불린법을 유세포 IgG 법과 비교하였는데 그 결과 유세포 IgG 법이 시험관법 및 겔 카드법 보다 민감하지 않은 것으로 나타났다. 이는 유세포 분석법을 다른 측정 방법과 비교한 이전의 연구들에서는 DTT 처리 혈청을 사용하여 간접항글로불린법에서 IgM 의 영향을 최소화하였으나(Stussi G 등, 2005; Won DI 와 Kim BC, 2012), 본 연구에서는 DTT 처리를 거치지 않은 혈청을 사용함으로써 상대적으로 IgM 의 영향을 덜 받는 유세포 분석법에 비하여 시험관법과 겔 카드법에서의 역가가 더 높게 나타난 것으로 여겨진다.

각 검사법의 적절한 해석을 위해서는 반드시 임상적 정보와 함께 검증이 되어야 한다. 신생아 용혈성 질환에서 항체 역가 검사를 할 때 몇 배수 더 높게 나오는 측정 방법을 선택함으로써 인하여 침습적인 검사 등이 부적절하게 시행될 수 있음을 주의해야(Roback 등, 2011) 하는 것이 이러한 맥락에서 이해될 수 있다. ABO 부적합 이식에서의 동종응집소 제거 목표치는 병원마다 또는 세계적으로도 크고 작은 차이를 보이고 있고, 아마도 ABO 동종응집소 역가와 환자의 경과 및 예후와의 임상적 상관관계를 연구하고 설명하는데 있어서 검사법 표준화 부재로

인한 검사실 간의 결과 값 차이가 큰 걸림돌이 될 것으로 여겨진다. 임상 각
과의 적절한 목표 역가 설정 및 치료 방침의 발전을 위해서는 ABO 동종응집소
역가 측정에 이용되는 각 검사법의 표준화뿐만 아니라 측정 방법의 차이의
이해가 필요하다.



V. 결 론

본 연구 결과 검사실에서 자체 제조 적혈구를 사용하는 경우 제조 후 5 일 이내 사용하고 시험관법은 검체 반량의 3% 적혈구 부유액을 사용하는 것이 검사실 간 차이 영향을 최소화하기 좋은 방법으로 여겨졌다. 유세포 분석법을 이용한 ABO 동종응집소 역가 측정은 비록 적혈구 표면 고정 과정의 영향이 있으며 각 검사실마다의 참고치 설정이 필요하나 IgM 형과 IgG 형을 각각 측정하는데 타당한 방법이고 민감도가 높았다. 또한 ABO 동종응집소는 검사원리와 측정 방법에 따라 역가에 차이를 보이므로 결과 해석 시에는 이를 고려해야 할 것으로 여겨졌다.

참고문헌

1. 김재석, 류광현, 이흥기, 김대원: 한국 성인의 ABO 동종 응집소 역가. *대한수혈학회지*. 8:119-124, 1997
2. 원동일: 유세포분석용 항인면역글로불린의 반응성 비교 방법. *대한진단검사의학회지*. 23:214-219, 2003
3. 이은영, 김신영, 김현옥, 권석운, 김대원, 한규섭: 국내 4 개 대학병원에서의 ABO 항체역가 검사의 현황조사. *대한수혈학회지*. 22:24-30, 2011
4. 조치현, 김하늬, 윤승규, 최계령, 최재열, 김장수, 임채승, 김영기, 이갑노: ABO 동종 응집소 역가 측정을 위한 시험관 및 미세원주응집법의 평가. *Lab Med Online*. 1:57-63, 2011
5. Berneman ZN, van Bockstaele DR, Uyttenbroeck WM, Van Zaelen C, Cole-Dergent J, Muylle L, Peetermans ME: Flow-cytometric analysis of erythrocytic blood group A antigen density profile. *Vox Sang*. 61:265-74, 1991
6. Finck R, Lui-Deguzman C, Teng SM, Davis R, Yuan S: Comparison of a gel microcolumn assay with the conventional tube test for red blood cell alloantibody titration. *Transfusion*. 53:811-815, 2013
7. Kobayashi T, Saito K: A series of surveys on assay for anti-A/B antibody by Japanese ABO-incompatible Transplantation Committee. *Xenotransplantation*. 13:136-40, 2006
8. Kumlien G, Wilpert J, SäfwenberG J, Tydén G: Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation*. 84:S17-19, 2007
9. Roback JD. AABB Technical Manual: 17th ed., pp369, 2011

10. Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, Chhibber V, Ness PM, King KE: Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Transfusion*. 50:631-634, 2010
11. Stussi G, Huggel K, Lutz HU, Schanz U, Rieben R, Seebach JD: Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. *British Journal of Haematology*. 130:954-996, 2005
12. Tanabe K: Interinstitutional Variation in the Measurement of Anti-A/B Antibodies: The Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee Survey. *Transplantation*. 84:S13-16, 2007
13. Won DI, Kim BC: Optimized Flow Cytometry to Measure Anti-ABO Immunoglobulin G. *Lab medicine*. 43:281-290, 2012

- ABSTRACT -

Evaluation of techniques for ABO isoagglutinin titer

Seon Joo Kang

Department of Laboratory Medicine

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Young Ae Lim)

Measurement of ABO isoagglutinin titer is used for ABO-incompatible transplantation, therefore it plays an important role in predicting the progress and prognosis as well as making decision. However, an inter-laboratory variation in result accuracy is a major problem due to the absence of standard method. The aims of this study were to establish the preparation conditions of red blood cell(RBC) suspension and to compare techniques for tube test, column agglutination and flow cytometry(FCM).

Serum specimens from apparently healthy adults who underwent a medical examination and donor RBC for laboratory test were used. ABO isoagglutinin titers of each blood group specimen were measured at the different conditions consisted of the storage day, ratio of RBC to serum volume, different sort of RBC source and dilution method for 0.8% RBC suspension. Room temperature incubation method(RT) and indirect antiglobulin test(IAT) were done for the tube test and the microcolumn agglutinin test(gel test) and then

FCM was done by using anti-IgM and anti-IgG. In the case of FCM, mean fluorescence intensity ratio(MFIR) was calculated and cut-off level were obtained.

There was a significant difference in titers at sixth to seventh day during the storage of RBC suspension. The RBC to serum ratios which compared 2% with 1:1, 3% with 1:2 and 3% with 1:1 were resulted that 3% with 1:1 group shows significantly lower titer than the other two groups. There were no significant differences between RBC sources or dilution methods for 0.8% RBC suspension for the titer. FCM-IgM method was the most sensitive when compared to Tube-RT or Gel-RT, while Tube-IAT was the most sensitive when compared to Gel-IAT or FCM-IgG method except anti-A in group O , which was the most sensitive when measured by Gel-IAT.

Therefore it is considered that using RBC suspension within five days from preparation and applying RBC to serum ratio to 3% with 1:2 in the tube method are helpful to reduce the inter-laboratory variations. Also there were differences in titers according to the different methods and techniques even if it was done in the same laboratory, and the cautions should be needed in interpreting the ABO isoagglutinin titer.

Key words : ABO isoagglutinin, titration, standardization, RBC suspension