

시험관법을 이용한 검사법에 따른 ABO 동종 응집소 역가 비교

강민구 · 이승재¹ · 오진숙² · 임영애

아주대학교 의과대학 진단검사의학교실, 의학과¹, 아주대학교병원 진단검사의학과²

= *Abstract* =

Comparison of ABO Isoagglutinin Titers by Different Tube Hemagglutination Techniques

Min Gu Kang, Seung Jae Lee¹, Jin Sook Oh², Young Ae Lim

Department of Laboratory Medicine, Division of Medical Science¹, Ajou University School of Medicine, Department of Laboratory Medicine, Ajou University Medical Center², Suwon, Korea

Background: The ABO isoagglutinin titer is useful for the evaluation and observation of ABO incompatible bone marrow transplantation or organ transplantation, yet the results can be different depending on the test methods. Measurement of isoagglutinin titer using the gel test has recently been reported, but this test is expensive. In this study, we investigated isoagglutinin titer distribution of normal individuals using the different tube hemagglutination technique to help select the best test method and to interpret the agglutinin titer.

Methods: Normal healthy individuals were selected from those patients who underwent a physical examination at Ajou University Hospital, during July 2009. Sixty healthy individuals, (10 men and 10 women per each ABO blood group) were recruited for the study. The immediate spin method (IS), the anti-human globulin method with dithiothreitol treatment (DTT-AHG) and the anti-human globulin method without DTT treatment (AHG) were performed simultaneously. The reciprocal of the highest serum dilution that showed macroscopic agglutination 1+ or more was regarded as the isoagglutinin titer.

Results: The isoagglutinin titer measured by the AHG was the highest in the all blood groups. In case of blood groups A and B, the isoagglutinin titer by the IS was higher than that by the DTT-AHG, but this was quite the reverse in the case of the blood group O.

Conclusion: If it is not necessary to distinguish IgM antibody and IgG antibody, then it seems that the AHG is the best practical method of those three methods. It was more sensitive than the IS and more rapid and easier than the DTT-AHG. (*Korean J Blood Transfus* 2009;20:227-234)

Key words: ABO isoagglutinin titer, Tube hemagglutination technique, IgG

접수일 : 2009년 12월 7일, 승인일 : 2009년 12월 16일

책임저자 : 임 영 애 442-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지 아주대학교 의과대학 진단검사의학교실
TEL: 031) 219-5786, FAX: 031) 219-5778, E-mail: limyoung@ajou.ac.kr

서론

ABO 자연항체는 대부분 IgM 항체이지만, ABO 특이성을 보이는 IgA 항체와 IgG 항체 또한 존재한다. ABO 혈액형 동종응집소는 용혈수혈 부작용과 신생아용혈성질환의 원인이 될 수 있고, 고형장기 이식에서 급성 거부반응을 일으킬 수 있으며 ABO 부적합 골수 이식에서는 용혈을 일으켜 적혈구와 거핵구 생착을 지연시킬 수 있다.¹⁾

따라서 ABO 혈액형의 동종응집소 역가는 ABO 부적합 골수 이식 또는 장기 이식에서의 경과 관찰 및 예후 평가, ABO 혈액형의 아형에 대한 검사, ABO 혈액형 부적합 수혈 시 반응에 대한 관찰 등에 도움을 줄 수 있다.²⁻⁵⁾ 특히 이식후 거부반응의 예측에 중요한 정보를 제공하여 혈장 교환술, 비장절제, 항-CD20 단클론성항체, 면역글로블린 정주요법 등과 같은 치료방법의 선택에 도움을 줄 수 있는데,⁶⁾ 인종이나 연령간 유의한 차이를 보일 수 있을 뿐 아니라, 검사법에 따라서 많은 영향을 받을 수 있다.

대부분의 수혈관련 면역 반응이나 장기 이식에서의 면역 반응은 IgM 동종응집소에 의한 것이지만, IgG 동종응집소 또한 중요한 역할을 하고 있다. 그러므로 IgG ABO 동종응집소가 IgM보다 더 높은 역가로 존재할 경우에는 IgG까지 측정할 수 있는 방법이 필요하다.

그러나 ABO 동종응집소 IgG 측정방법은 표준화 되어 있지 않으므로 그 역가는 검사실에 따라 또는 측정방법에 따라 매우 다양하게 측정된다. 따라서 국내의 대부분의 검사실에서는 IgM과 IgG를 구분하지 않고 실온식염수법만으로 측정하고 있으므로, ABO 동종응집소 IgG에 대한 정보를 얻기 어려운 실정이다.

최근 미세원주응집법을 이용한 ABO 동종응집

소 역가 측정의 유용성이 보고되었기는 하나,^{7,8)} 검사비용이 고가라는 단점이 있으므로, 저자들은 시험관을 이용한 동종응집소 검사법에 따른 정상인들의 역가 분포를 살펴보고 결과를 해석하고, 동종응집소 검사법 선택에 도움을 주고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2009년 7월 한 달간 아주대병원 건강증진센터에서 검진을 받은 20세 이상, 60세 미만의 건강한 성인 중 혈액형별로 남녀 각각 10명씩 선정하여 (A형 20명, B형 20명, O형 20명) 총 60명을 대상으로 하였다.

2. 동종응집소 역가 측정 방법

1) 실온식염수법(Immediate spin method)²⁾

9개의 시험관에 생리식염수 100 uL를 분주한 후 첫 번째 시험관에 피검 혈청 100 uL를 충분히 혼합한 다음 100 uL를 다음 시험관에 분주하여 계단 희석하였다. 해당하는 시험관에 2% A형 혈구 부유액, 또는 2% B형 혈구 부유액 100 uL를 넣은 후 실온에서 혼합하고 3,400 rpm에서 15초간 원심분리한 후 응집여부를 판독하여 최대희석배수에서 응집강도가 1+ 이상인 경우를 역가로 판정하였다.

2) DTT처리하지 않은 항글로블린법(37°C incubation + polyspecific anti-human globulin)

위 1)의 실온식염수법에 의한 동종응집소 역가 측정에서 원심 분리 후 판독을 거친 시험관을 37°C의 항온 수조에서 30분간 항온한 다음 생리식염수로 3회 세척하였다. Polyspecific anti-human

globulin을 각각의 시험관에 한 방울씩 넣고 혼합 및 원심분리한 후 응집여부를 판독하여 최대희석 배수에서 응집강도가 1+ 이상인 경우를 역가로 판정하였다.

3) 0.01 M DTT처리 후 항글로블린법(37°C incubation + polyspecific anti-human globulin)⁹⁾

8개의 시험관에 생리식염수 50 uL를 분주한 후 첫 번째 시험관에 피검 혈청 50 uL를 충분히 혼합

한 다음 50 uL를 다음 시험관에 분주하여 계단 희석하였다. 따로 준비한 9개의 시험관에 0.01 M의 DTT 50 uL를 분주한 후, 첫 번째 시험관에는 피검 혈청 50 uL를 충분히 혼합하였고 두 번째 시험관부터는 미리 계단 희석해둔 8개의 피검 혈청 50 uL를 순서대로 분주하여 충분히 혼합하였다. 그 후 37°C의 항온 수조에서 30분간 항온하였고 해당하는 시험관에 2% A형 혈구 부유액, 또는 2% B형 혈구 부유액 50 uL를 혼합하여 37°C의

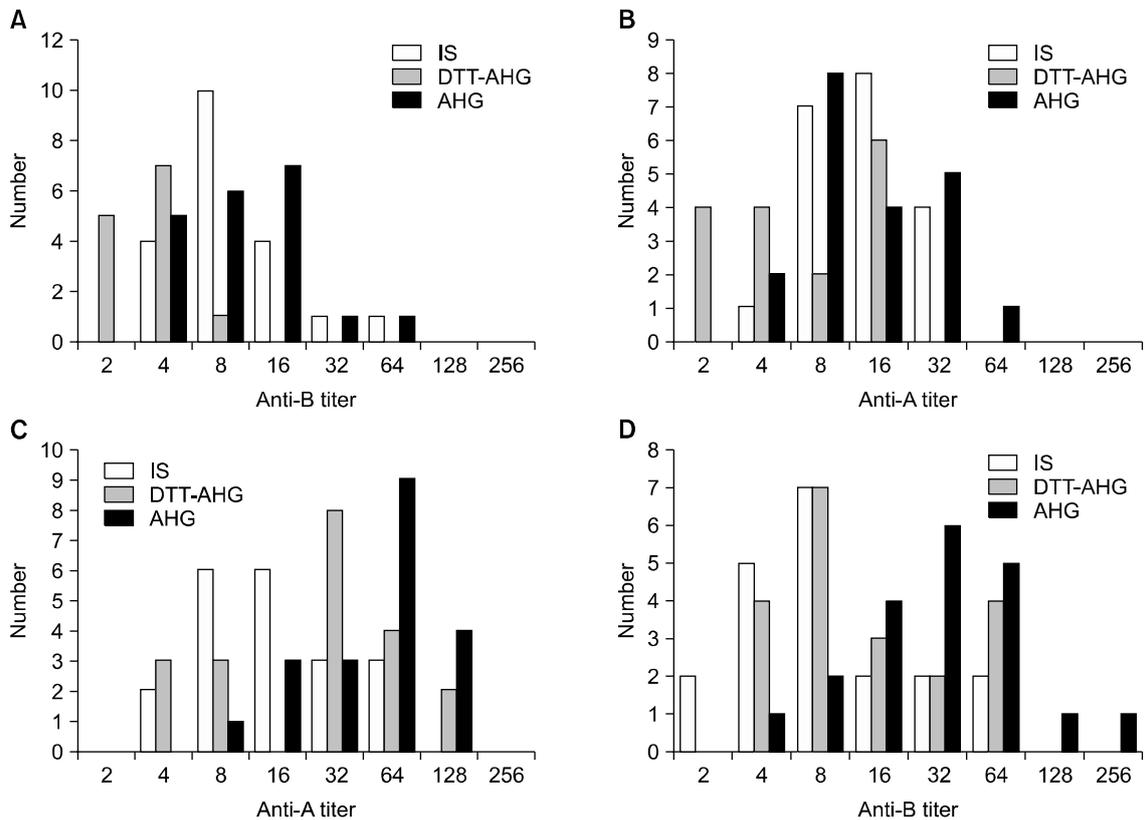


Fig. 1. Histogram of ABO isoagglutinin titers according to blood group. (A) Anti-B titer in blood group A. (B) Anti-A titer in blood group B. (C) Anti-A titer in blood group O. (D) Anti-B titer in blood group O. Abbreviations: IS, immediate spin method; DTT-AHG, 37°C incubation + polyspecific AHG (with DTT treatment) method; AHG, 37°C incubation + polyspecific AHG (without DTT treatment) method.

항은 수조에서 다시 30분간 항온하였다. 항온이 끝난 각 시험관을 생리 식염수로 3회 세척한 다음 polyspecific anti-human globulin을 각각의 시험관에 한 방울씩 넣고 혼합 및 원심분리한 후 응집 여부를 판독하여 최대희석배수에서 응집강도가 1+ 이상인 경우를 역가로 판정하였다.

3. 통계처리

Excel과 SPSS를 이용하여 각 검체의 동종응집소 역가를 나타낸 최대희석배수의 역수의 중앙값과 interquartile range (25 percentile~75 percentile)로 표시하되, 계산된 값이 2배수 희석배수의 역수와 일치하지 않을 경우에는 가장 근접한 희석배수의 역수로 표기하거나, 각 희석배수의 중앙으로 가장 근접한 희석배수의 역수로 표시할 수 없는 경우에는 범위로 나타내었다. 각 혈액형별로 세 가지 방법의 비교는 Friedman test를 사용하였고, P값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

실온식염수법(IS로 약함), 0.01 M DTT처리 후 항글로불린법(DTT-AHG로 약함), DTT처리하지 않은 항글로불린법(AHG로 약함)으로 측정된 동종응집소 역가의 분포는 그림으로 제시하였다(Fig. 1).

또한 세 가지 방법으로 측정된 동종응집소 역가의 중앙값(interquartile range)은 각각 A형의 anti-B는 8 (8~16), 2 (0~4), 8 (4~16), B형의 anti-A는 16 (8~16), 4 (2~16), 8~16 (8~32)로서 anti-A ($\chi^2=21.46$, $df=2$, $P<0.001$)와 anti-B ($\chi^2=29.49$, $df=2$, $P<0.001$) 모두 AHG법이 가장 높은 역가를 보였으며 그 다음으로 IS법, DTT-AHG법의 순으로 나타났다. O형의 경우도 anti-A의 IS법,

Table 1. Median values (Interquartile ranges; 25~75 percentile) of ABO isoagglutinin titer by tube hemagglutination technique

Blood group	Antibody	IS	DTT-AHG	AHG
A	anti-B	8 (8~16)	2 (0~4)	8 (4~16)
B	anti-A	16 (8~16)	4 (2~16)	12* (8~32)
O	anti-A	16 (8~32)	32 (8~64)	64 (32~64)
O	anti-B	8 (4~16)	8 (8~32)	32 (16~64)

Abbreviations: IS, immediate spin method; DTT-AHG, 37°C incubation+polyspecific AHG (with DTT treatment) method; AHG, 37°C incubation+polyspecific AHG (without DTT treatment) method.

*8~16.

DTT-AHG법 및 AHG법의 역가는 16 (8~32), 32 (8~64), 64 (32~64), anti-B는 8 (4~16), 8 (8~32), 32 (16~64)로서 anti-A ($\chi^2=18.74$, $df=2$, $P<0.001$)와 anti-B ($\chi^2=24.97$, $df=2$, $P<0.001$) 모두 AHG법이 가장 높은 역가를 보이고 그 다음으로는 DTT-AHG법, IS법 순으로 나타나 A형과 B형과는 차이를 보였다(Table 1).

고 찰

미국 혈액은행협회에서 발간하는 Technical manual에 따르면, 항체의 역가는 연속적으로 두 배 희석한 혈청과 혈구를 반응시킨 후 육안상 응집을 보인 최대 혈청희석배수의 역수로 표현된다. 이와 같은 역가 측정은 혈청에 존재하는 항체의 상대적인 양이나 적혈구 항원표현의 상대적인 강도에 대한 정보를 제공할 수 있다.¹⁰⁾

한국 성인에서 A형과 B형의 동종응집소 역가의 중앙값이 동일하다고 보고한 김 등의 연구와는¹¹⁾ 달리 본 연구의 동종응집소 역가의 중앙값은 A형의 항-B항체보다 B형의 항-A항체가 IS법,

DTT-AHG법, AHG법 모두에서 약간 더 높은 결과를 보였다. 또한 김 등의 연구에서는¹¹⁾ A형과 B형의 IgM 동종응집소 역가의 중앙값이 64를 보였는데, 8~16의 분포를 보인 본 연구와는 차이를 보였다. 이러한 결과는 항체 역가 측정방법이 각 검사실마다 차이가 있을 수 있음을 의미하는데, Redman 등¹²⁾은 환경의 차이가 동종응집소 역가에 큰 영향을 미칠 것이라고 하였다. 이는 또한 검사에 사용된 적혈구 항원의 종류, 반응시간, 반응온도, 판독자의 기술 및 경험에 따른 차이 등도 결과에 영향을 미칠 수 있기 때문으로 여겨진다.¹³⁾

대부분의 수혈관련 면역 반응이나 장기 이식에서의 면역 반응은 IgM 동종응집소에 의한 것이지만, IgG 동종응집소 또한 중요한 역할을 하고 있기에 IgM 동종응집소만을 측정할 수 있는 검사법만을 사용할 경우에는 IgG 동종응집소에 의한 반응을 간과할 수 있다. 특히 O형은 A형과 B형에 비하여 동종응집소 IgG가 높은 비율을 차지하는데,¹⁴⁾ IgM만을 측정할 수 있는 방법을 사용할 경우 IgG를 측정할 수 없게 된다. 실제로 본 연구에서도 O형의 경우에 IgM을 주로 측정하는 IS법에 의한 동종응집소 역가에 비해 DTT-AHG법으로 측정된 동종응집소 IgG의 역가가 더 높았기 때문에 IS법만을 사용하였다면, 정확한 ABO 동종응집소 역가를 측정하지 못하였을 것이다.

2-mercaptoethanol (2-ME)나 DTT와 같은 sulfhydryl 화합물은 IgM 항체의 이황화 결합을 깨뜨려 혈청중에 존재하는 임상적으로 중요한 IgG 항체의 존재를 조사하는 데 유용하게 사용될 수 있으며,¹⁾ 임상적으로 혈액형항원과 항체반응에서 중요한 역할을 하는 항체인 IgG 동종응집소의 역가 측정에 있어서 DTT의 유용성은 외국의 보고에서도 논의된 바 있다.⁹⁾

본 연구에서 사용된 DTT-AHG법은 동종응집

소 IgG의 역가를 측정하는데 이용될 수 있으나, DTT 처리와 두 번의 항온 단계를 거치므로 검사법이 번거롭고 시간이 많이 소요되었다. 반면 본 연구에서 AHG법으로 측정된 동종응집소 역가가 가장 높은 결과를 보인 것은 동종응집소 IgM과 IgG를 모두 반영하기 때문으로 여겨졌다. 따라서 IgM과 IgG를 특별히 구별하여야 하는 경우가 아니라면 IS법에 비하여 더 민감하고, DTT-AHG법에 비하여 빠르고 간편한, AHG법이 실용적인 방법으로 판단되었다.

최근 일본에서의 연구에 따르면 성공적인 ABO 부적합 신장이식을 위해서는 ABO 동종응집소 역가의 정확한 측정이 필요하지만, 표준화된 측정법이 아직 수립되지 않은 실정이며 대부분의 기관에서 시험관법을 사용하여 혈청의 연속적인 두 배 희석에 의하여 ABO 동종응집소 역가를 측정하고 있지만 기관간의 변이가 크다고 하였다.¹⁵⁾ 일본 ABO 부적합 이식위원회의 보고에 따르면, 설문지를 통한 조사로 기관간 다양한 동종응집소 역가 측정 방법을 통일한 후 역가를 측정하게 한 결과 기관간 변이가 8배 미만으로까지 현저히 감소하였다고 하여 ABO 동종응집소 역가 측정방법의 표준화 교육 및 정도 관리를 위한 정기적인 조사가 중요함을 시사한 바 있다.⁵⁾

본 연구에서는 동종응집소 역가 측정에 관한 세 가지 방법을 제시하였고 각 방법에 따라 혈액형별로 역가의 차이를 보일 뿐만 아니라, 동일 혈액형에서도 세 가지 방법에 따른 역가의 차이를 보여 각 방법에 따른 역가의 차이가 매우 큼을 알 수 있었다. 최근 유럽의 세 기관에서 미세원주응집법과 시험관법의 ABO항체 역가 측정을 비교한 보고에서는 미세원주응집법이 시험관법에 비하여 기관간의 항체역가의 변이를 유의하게 감소시킬 수 있는 것으로 보고하였고,⁷⁾ 국내에서도 미세원주응집법을 이용한 연구가 보고된 바 있

다.⁸⁾

그러나 국내의 보험급여체계에서는 미세원주 응집법을 통상적인 동종응집소 역가 검사에 이용하기에는 현실적인 어려움이 많다. 또한 ELISA assay, flow cytometry, surface plasmon response, KODE technology 등도 시험관법에 비하여 ABO 항체역가의 측정에 있어 재현성이 더 좋은 방법으로 소개되고 있으나, 이러한 검사법들을 실제로 일선 검사실에서 도입하기에는 어려운 실정이라 하였다.⁷⁾ 이는 이러한 새로운 검사법들을 도입하기 위해서는 고가의 검사비용 및 검사의 용이성, 검사인력의 양성, 고가의 장비도입 등과 같은 제반 사항 등이 고려되어야 하기 때문이라고 설명될 수 있다.

이에 반해 시험관법은 자동화가 어렵고 시간이 많이 소요되며, 검사자의 주관이 개입될 수 있다는 단점이 있지만, 가장 널리 알려지고 행해지고 있는 방법이며 혈구응집의 원리에 의하여 역가 판정을 할 수 있다. Shirey 등의 보고에 의하면 전통적인 시험관법에 의한 동종응집소 역가 측정법을 간소화한 방법 및 미세원주 응집법을 전통적인 시험관법과 비교 평가한 결과, 이 두 가지 방법이 모두 기존의 전통적 시험관법과의 높은 일치율을 보여 간소화한 방법을 사용할 경우 시간이 많이 소요되는 시험관법의 단점을 보완할 수 있음을 시사하였다.¹⁶⁾

그러나 검사실간에 역가측정이 이루어지는 환경의 다양성 및 재현성 있고 정밀한 역가 측정의 어려움은 아직까지도 해결해야 할 문제점으로 인식되어 왔다. AuBuchon 등은 항체역가 측정의 검사실간 변이를 감소시키기 위하여 35개의 검사실에 항체역가 측정에 대한 자세하고 통일된 방법(시험관법)을 제시하였는데, 최대희석배수는 약 양성을 보이는 경우로 정의하였다. 그리고 제시 전, 후의 역가를 비교한 결과 제시 전에는 큰 변

이를 보였던 검사실들이 제시한 방법에 따라 항체 역가를 측정된 이후에는 검사실간에 변이를 유의하게 줄일 수 있었다고 하였다.¹⁷⁾ 즉, 항체역가 측정방법의 표준화 이외에도 최대희석배수를 결정하기 위한 응집강도에 대한 정의의 표준화도 검사실간 변이를 감소시키는데 큰 기여를 한 것으로 사료되었다.

본 연구에서는 약양성까지 간주하기를 권장한 AuBuchon 등과는 달리 AABB의 지침에 따라 1+ 이상의 응집을 보인 경우를 최대희석배수로 정하여 차이를 보였다. 따라서 최대희석배수를 결정하기 위한 응집강도의 정의에 따라 검사실의 역가가 달라질 수 있으므로 역가 측정에 대한 표준화를 위해서 국내에서도 역가 측정 방법뿐만 아니라 최대희석배수에 대한 정의의 제시도 필요할 것으로 여겨진다.

요 약

배경: ABO 혈액형의 동종응집소 역가는 ABO 부적합 골수 이식 또는 장기 이식에서의 경과 관찰 및 평가 등에 도움을 주나, 검사법에 따라 영향을 받을 수 있다. 최근 미세원주응집법을 이용한 역가 측정이 보고되었기는 하나, 고가라는 단점이 있으므로, 저자들은 시험관을 이용한 동종응집소 검사법에 따른 정상인들의 역가 분포를 살펴보고 검사법 선택과 역가 판정에 도움을 주고자 하였다.

방법: 2009년 7월 한 달간 아주대병원 건강증진센터에서 검진을 받은 20세 이상의 건강한 성인 중 혈액형별로 남녀 각각 10명씩 선정하여, 총 60명을 대상으로 실온식염수법, 0.01 M DTT처리 후 항글로불린법과 DTT처리하지 않은 항글로불린법의 3가지 방법을 동시에 시행하였다. 1+ 이상의 응집강도를 보인 시험관의 최대 희석배수의

역수를 동종응집소 역가로 판정하였다.

결과: 모든 혈액형에서 DTT처리하지 않은 항글로불린법에 의한 동종응집소 역가가 가장 높았으며 A와 B형의 경우 실온식염수법, O형의 경우에는 DTT처리 후 항글로불린법에 의한 동종응집소 역가가 더 높았다.

결론: IgM과 IgG를 특별히 구별하여야 하는 경우가 아니라면 실온식염수법에 비하여 더 민감하고, DTT처리 후 항글로불린법에 비하여 빠르고 간편한 DTT처리하지 않은 항글로불린법이 실용적인 방법으로 판단되었다.

참고문헌

1. Beadling WV, Cooling L. Immunohematology. In: McPherson RA, Pincus MR ed. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 21st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007:623-60
2. Han KS, Park MH, Cho HI. Transfusion medicine. 3rd ed. Seoul: Korea Medical Publisher, 2006:165, 409
3. Song TJ, Lim CS, Park IS, Lee KN, Jung KH, Choi SY, et al. ABO blood type incompatible liver transplantation in a child. J Korean Surg Soc 1998;55:604-10
4. Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, Takahashi K, Toma H. Role of anti-A/B antibody titers in results of ABO-incompatible kidney transplantation. Transplantation 2000;70:1331-5
5. Lee SH, Kwon SW, Lee JH, Lee KH, Kim WK, Kim SH, et al. Isoagglutinin titer in major ABO incompatible bone marrow transplantation. Korean J Blood Transfus 1997;8:167-76
6. Kobayashi T, Saito K. A series of surveys on assay for anti-A/B antibody by Japanese ABO-incompatible transplantation committee. Xenotransplantation 2006;13:136-40
7. 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 2007;84(S12): S17-9
8. Kim YJ, Cho SA, Kim SY, Kim HH, Chang CL, Lee EY, et al. The usefulness of isoagglutinin titer measurement for ABO-mismatch organ transplantation patients, examined by Coombs method using gel test. Korean J Hematol 2008;43(S2):271
9. Knight RC. Measuring IgG anti-A/B titres using dithiothreitol (DTT). J Clin Pathol 1978; 31:283-7
10. Walker PS. Identification of antibodies to red cell antigens. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD ed. Technical manual. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:483-4
11. Kim JS, Hyun RK, Lee HK, Kim DW. Evaluation of ABO isoagglutinin titers in Korean adults. Korean J Blood Transfus 1997;8:119-24
12. Redman M, Malde R, Contreras M. Comparison of IgM and IgG anti-A and anti-B levels in Asian, caucasian and negro donors in the north west thames region. Vox Sang 1990; 59:89-91
13. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. ABO, Lewis, Ii and P groups. In: Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M ed. Blood transfusion in clinical medicine. 9th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993:148-203
14. Rosner ER, Pirofsky B, Sheth K. The influence of dialysis in 2-mercaptoethanol reduction of erythrocyte antibodies. Transfusion 1974;14: 47-50
15. Tanabe K. Interinstitutional Variation in the measurement of Anti-A/B antibodies: the Japanese ABO-incompatible transplantation

- committee survey. *Transplantation* 2007;84(S12): S13-6
16. Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, Chhibber V, Ness PM, King KE. Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Transfusion* 2009 [in press]
17. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Vox Sang* 2008;95:57-65
-