

대한수혈학회지 : 제22권 제1호, 2011

국내 4개 대학병원에서의 ABO 항체역가 검사의 현황조사

이은영^{1,2} · 김신영¹ · 김현옥¹ · 권석운³ · 김대원⁴ · 한규섭⁵

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 국민건강보험공단 일산병원 진단검사의학과²,
울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학교실³, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학교실⁴,
서울대학교 의과대학 진단검사의학교실⁵

= Abstract =

Survey Analysis of ABO Antibody Titration at Four University Hospitals in Korea

Eun Young Lee^{1,2}, Sinyoung Kim¹, Hyun Ok Kim¹, Seog-Woon Kwon³,
Dae-Won Kim⁴, Kyou-Sup Han⁵

*Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine¹,
National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital², Ulsan University College of Medicine,
Asan Medical Center³, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine⁴,
Seoul National University College of Medicine⁵, Seoul, Korea*

Background: The ABO antibody titration is important, especially in case of ABO-incompatible hemolytic disease of newborn, ABO-incompatible bone marrow or solid organ transplantation. However, no standard method for ABO antibody titration has yet been established. We surveyed four university hospitals about the methods of ABO antibody titration and performed inter-laboratory proficiency tests.

Methods: Detailed methods of ABO antibody titration were surveyed at four university hospitals. ABO antibody titer was measured by their customary methods using serum samples from six healthy volunteers with blood groups A (n=2), B (n=2) and O (n=2).

Results: Procedures of ABO antibody titration, reportable ranges, sample diluent, source of reagent RBCs and interpretation of end-point were different among four university hospitals. Inter-institutional maximum differences of IgM and IgG ABO antibody titer were 16-fold and 32-fold, respectively.

Conclusion: Standardization of ABO antibody titration method is needed to reduce inter-laboratory variability, and a periodical external quality control survey is necessary to improve the accuracy of the titration. (**Korean J Blood Transfus 2011;22:24-30**)

Key words: ABO antibody titration, Inter-laboratory proficiency test, Survey analysis

접수일 : 2011년 4월 4일, 수정일 : 2011년 4월 15일, 승인일 : 2011년 4월 15일

책임저자 : 김 신 영 135-720 서울시 강남구 언주로 712 강남세브란스병원 진단검사의학과
TEL: 02) 2019-3533, FAX: 02) 2019-4822, E-mail: sykim@yuhs.ac

서론

ABO 항체역가(ABO antibody titration) 검사는 주로 ABO 부적합 신생아 용혈성 질환의 진단 및 경과 관찰, ABO 부적합 골수 이식의 예후 평가 및 경과 관찰의 목적으로 사용되고 있으며, 최근 ABO 부적합 신장이식의 실시에 따라 검사 빈도가 증가하고 있다. 이는 혈장교환술과 면역억제 치료를 병행하여 ABO 항체에 의한 초급성 또는 급성거부반응을 예방함으로써 ABO 부적합 신장이식이 가능하기 때문이다.¹⁻⁴⁾ 특히, ABO 항체역가 검사는 혈장교환술에 의한 항체 제거의 효율성을 평가하며, 추가적인 혈장교환술 실시 여부를 결정함에 있어 중요한 검사이다.⁵⁾

하지만, ABO 항체역가 검사는 전세계적으로 검사 표준법이 확립되어 있지 않아 각 검사기관마다 서로 다른 방법을 사용하고 있으며, 동일한 검사방법을 사용하여도 검사기관 및 검사자 간 검사결과의 편차가 존재한다.⁶⁾ Kobayashi 등은 29개 기관을 대상으로 혈액형 별(A형, B형 및 O형) 각 2개 검체의 ABO 항체역가 결과를 비교하여, IgM ABO 항체의 경우 8~32배, IgG ABO 항체의 경우 16~256배의 차이가 있음을 보고하였다.⁷⁾ 또한 ABO 항체역가 검사의 표준화를 위하여 미세원주응집법⁸⁾ 또는 유세포분석법⁹⁾을 활용한 검사법이 소개되고 있으나 아직 널리 사용되지 않는다.

국내에서도 ABO 항체역가 검사법의 표준화를 위한 노력이 미비한 상황이다. 본 연구에서는 ABO 항체역가 검사법의 표준화에 앞서 국내 검사 현황을 알아보기 위해 국내 4개 의료기관을 대상으로 ABO 항체역가 검사법에 대한 설문조사를 시행함과 동시에 검사실간 비교검사를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 설문조사

ABO 항체역가 검사법에 관한 다음의 항목들이 포함된 설문지를 작성하여 연간 검사시행건수가 높은 국내 4개 의료기관(삼성서울병원, 서울대학교병원, 서울아산병원 및 세브란스병원)을 대상으로 2010년 12월 설문조사를 시행하였다.

설문항목:

1. ABO 항체역가 검사법(시험관법, 미세원주응집법 또는 유세포분석법)
2. 검사결과의 보고범위
3. 검체 희석액의 종류
4. 검사에 사용되는 시약용 적혈구의 종류
5. ABO 항체의 IgM과 IgG 구분 여부
6. IgM과 IgG의 구분을 위한 sulfhydryl agent의 종류
7. IgM ABO 항체역가 검사의 방법
8. IgG ABO 항체역가 검사의 방법
9. 최대희석배수를 결정하기 위한 응집강도의 정의

2. 검사실간 비교검사

2010년 12월 ABO 혈액형 별(A형, B형 및 O형) 각 2명씩 선정한 건강한 자원자로부터 혈액을 채취한 뒤, 혈청을 분리하여 1 mL로 분주하여 냉동하였다. 냉동보관 중인 혈청을 설문조사 대상인 4개 의료기관으로 동시에 우편발송하여 동일한 조건으로 ABO 항체역가 검사가 실시되도록 하였다. 회신된 결과를 anti-A, anti-B를 기준으로 재분류하여 분석하였다.

Table 1. Methods of ABO antibody titration of four university hospitals in Korea

Procedure	A	B	C	D
Assay technique	TT	TT & CAT	TT	TT
Reportable range	Maximum end-point	≤1,024	Maximum end-point	≤1,024
Sample diluent	0.9% NaCl	0.9% NaCl	0.9% NaCl*	0.9% NaCl
Source of reagent RBCs	Pooled random donor (n=40)	TT: Pooled random donor (n=3) CAT: Commercial reagent RBCs	Commercial reagent RBCs	Pooled random donor (n=3)
Concentration of reagent RBCs (%)	4~5	TT: 2, CAT: 3	3	3~5
Distinguish IgM from IgG Ab	All ABO group	Do not distinguish	Only in O group	All ABO group
Interpretation of end-point	1+ agglutination	1+ agglutination	w+ agglutination	w+ agglutination

Abbreviations: TT, test tube; CAT, column agglutination technique.

*Dithiothreitol-treated samples were diluted with phosphate-buffered saline.

결 과

1. 설문조사 대상기관의 ABO 항체역가 검사법

4개 의료기관으로부터 회신된 ABO 항체역가 검사법은 Table 1과 같다. 4개 의료기관에서 모두 시험관법을 사용하고 있었으며, 1개 의료기관(B)에서는 ABO 부적합 신장이식 환자를 대상으로 기존의 시험관법과 함께 미세원주응집법(DiaMed AG, Cressier, Morat, Switzerland)을 동시에 사용하였다. 또한 B 의료기관에서는 IgM과 IgG를 구분하지 않고 ABO 항체역가 검사를 시행하였으며, C 의료기관에서는 O형 검체에 한하여 IgM과 IgG를 구분하여 시행하였다. 이외에 검사결과의 보고가능범위, 검체 희석액, 적혈구부유액의 종류 및 농도, 최대희석배수의 판독방법 등에서 의료기관 별로 서로 다른 차이를 보였다(Table 1).

4개 의료기관에서 사용하는 피검 혈청과 적혈

Table 2. Differences in procedures of ABO antibody titration

	A	B	C	D
IgM Ab titration				
Volume of plasma (μL)	100	100	100	100
Volume of reagent RBC (μL)	50	100	100	50
Incubation temperature (°C)	RT	RT	RT	RT
Incubation time (min)	60	10	IS	IS
IgG Ab titration				
DTT treatment time (min)	60	-	30~60	30
Volume of plasma (μL)	100	-	100	100
Volume of reagent RBC (μL)	50	-	100	50
Volume of anti-globulin (μL)	100	-	-	100
Incubation temperature (°C)	37	-	RT	37
Incubation time (min)	60	-	IS	15

Abbreviations: RT, room temperature; IS, immediate spin DTT, dithiothreitol.

구부유액의 용량, 반응 온도와 시간은 각기 상이하여 Table 2와 같다. IgM과 IgG를 구분하여 ABO 항체역가 검사를 시행하는 3개 의료기관은 모두 sulfhydryl agent로 dithiothreitol (DTT)을 사용하였

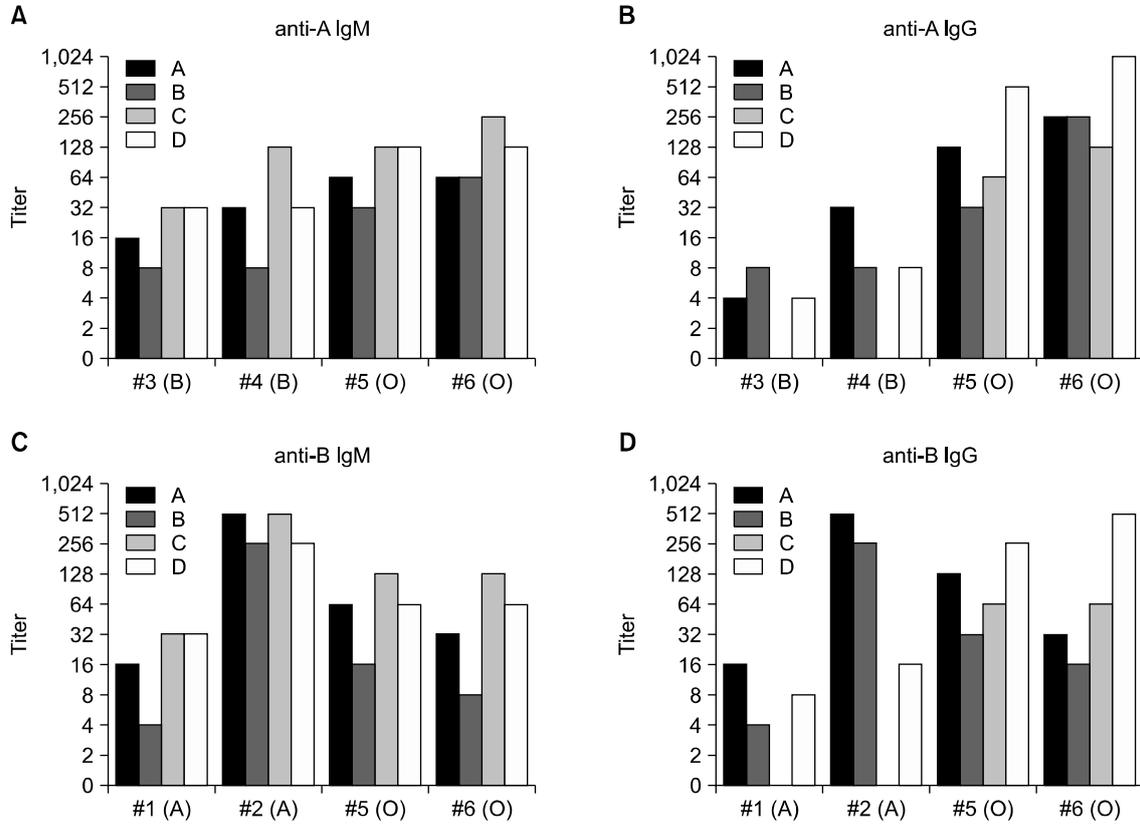


Fig. 1. ABO antibody titers of participating institutions; anti-A IgM (A), anti-A IgG (B), anti-B IgM (C) and anti-B IgG (D). ABO antibody titer was represented on vertical axis. The No. of sample for inter-laboratory comparison was represented on horizontal axis (#1, #2 from blood group A; #3, #4 from blood group B; #5, #6 from blood group O).

으나, DTT 처리 시간은 30~60분으로 각 기관 별로 차이를 보였다(Table 2).

2. 검사실 간 비교검사 결과

6개의 검체(A형, B형 및 O형 각 2개씩)로 시행된 ABO 항체역가 검사의 결과를 Fig. 1에 표시하였다. Anti-A IgM 역가 및 anti-A IgG 역가는 최대 16배수의 차이를 보였으며, anti-B IgM 역가 및 anti-B IgG 역가는 최대 32배수의 차이를 보였다

(Fig. 1).

고 찰

이식된 장기의 내피세포(endothelial cell) 표면에 표현되는 ABO 혈액형 항원과 장기 수여자의 혈액 내에 존재하는 ABO 항체의 반응에 의하여 보체 및 내피세포가 활성화되며, 이는 울혈, 혈전 및 출혈 등을 유발하여 이식 거부반응을 나타낸

다.^{10,11)} 이러한 이식거부의 과정에서 ABO 항체역가만이 유일하게 측정할 수 있는 지표로서, 특히 ABO 부적합 장기이식 시 급성거부반응의 예방 및 추적관찰에 중요한 지표가 된다.

ABO 항체역가 검사는 적혈구의 응집여부를 육안으로 관찰하는 시험관법이 주로 사용되어 검사결과 해석에 있어서 검사자 간의 차이가 있다. 뿐만 아니라 시험관법의 검사 방법에 있어서도 검사 기관 별 차이가 많아 Kobayashi 등에 의하면 29개 기관을 대상으로 실시한 비교 평가에서 IgM 역가는 최대 32배수, IgG 역가는 최대 256배수의 차이가 있었다.⁷⁾ 이에 일본 ABO 부적합 이식위원회에서는 다음과 같이 시험관법에 의한 ABO 항체역가 검사 방법의 기준안을 제안하였다. 상품화된 적혈구부유액 또는 혼주된 적혈구부유액의 농도는 3%, 적혈구와 혈청의 반응 용량 비율을 1 : 2, 원심분리시간은 15초로 한다. 또한 IgM 항체역가 검사의 경우 생리식염수로 혈청을 희석하고, 적혈구부유액과 15분간 반응을 시킨다. IgG 항체역가 검사를 위한 DTT 처리의 방법은 0.01 M의 DTT와 혈청의 용량 비율은 1 : 1, 반응온도는 37°C, 반응시간은 30분으로 하며, DTT 처리된 혈청과 적혈구부유액의 응집 반응 시에는 항글로불린을 반드시 사용하며, 37°C에서 30분간 반응시킨다. 최종 결과의 해석은 약양성(w+ 또는 +/-)이 아닌 양성(1+)을 기준으로 하도록 한다. 이러한 표준 검사법의 제안 이후에 38개 기관을 대상으로 재시행한 비교평가에서는 항체역가의 차이가 8배수까지 감소하였다고 하였다.⁷⁾ College of American Pathologists (CAP)에서 시행하는 기관별 비교 검사에서도 같은 검사방법을 사용하는 기관을 대상으로 분석하여도 anti-D 및 anti-A 항체역가는 32배수 이상 차이가 나는 것으로 보고되고 있다.⁶⁾

본 연구에서는 국내 4개 의료기관을 대상으로

ABO 항체역가 검사방법에 대한 설문조사를 실시하였다. 4개 기관 모두 시험관법을 사용하였으나, 적혈구부유액의 종류 및 농도, DTT 처리 여부, DTT 처리 시간, 적혈구부유액과 혈청의 반응 용량 비율, 응집반응 온도와 시간, 최대희석배수의 기준치 등의 거의 모든 항목에서 기관별 차이가 나타났다. 또한 6개 검체를 대상으로 시행한 비교평가에서도 anti-A 역가는 최대 16배수, anti-B 역가는 최대 32배수의 차이를 보여 국내 ABO 항체역가 검사방법 및 결과 해석방법의 표준화를 위한 노력이 필요할 것으로 판단되었다.

ABO 항체역가 검사법은 일반적으로 시험관법이 사용되어 왔으나, Kumlien 등에 의하면 시험관법에 비하여 미세응집원주법을 사용할 경우 기관 간 역가의 차이를 유의하게 감소시킨다고 하였다.⁸⁾ 이외에도 ELISA법,^{12,13)} 유세포분석법^{9,14,15)} 등도 시험관법에 비하여 재현성이 더 우수한 것으로 보고되고 있으나, 검사의 편의성, 비용 및 장비를 고려할 때 국내 검사실에서 적용하기는 어렵다. 단, 본 연구 참여기관 중 1개 기관은 시험관법과 함께 미세응집원주법을 시행하고 있어, AuBuchon 등이 제안한 바와 같이 시험관법과는 별도로 미세응집원주법의 표준화 작업도 진행되어야 하겠다.⁶⁾ ABO 항체역가 검사에 있어서 가장 큰 차이의 원인은 응집반응의 육안 판독에 있으며, 이는 기관 간 역가의 차이 뿐만 아니라 기관 내 검사자 간 역가의 차이를 유발한다.¹⁶⁾ AABB에서는 1+ 이상의 응집을 보인 경우를 최대희석배수로 권장하고 있지만,¹⁷⁾ 1+ 응집을 기준으로 한 것보다 약양성 (w+) 응집을 기준으로 하는 것이 기관 별 및 검사자 간 차이를 감소시킨다고 하였다.^{6,18)} 본 연구 참여기관 중 2개 기관은 1+ 응집을 기준으로, 다른 2개 기관은 약양성을 기준으로 정하여 이에 대한 표준화가 필요하다.

혈청 내에 존재하는 IgM 항체의 이황화 결합

을 파괴하는 DTT를 처리함으로써 IgG 항체역가를 측정할 수 있으나, DTT 처리와 함께 두 번의 항온 단계를 필요로 하여 검사법이 번거롭고 시간이 많이 소요된다. 본 연구 참여기관 중 2개 기관은 모든 혈액형에 대하여, 1개 기관은 O형 혈액형에 대해서만 DTT를 처리하였다. 다른 1개 기관은 강 등이 사용한 방법¹⁹⁾과 같이 DTT를 처리하지 않고 항글로불린만을 사용하여 IgM과 IgG를 동시에 측정하는 실용적인 방법을 사용하였다.

본 연구에서는 국내 4개 의료기관을 대상으로 ABO 항체역가 검사법에 대한 설문조사 및 검사실 간 비교검사를 시행한 결과 검사 방법의 차이가 많았으며, 비교검사의 결과도 최대 32배수까지 차이가 나타났다. 따라서, 향후 국내 ABO 항체역가 검사법의 표준화를 위하여 대한수혈학회 차원의 표준 검사법을 제정한 후 각 의료기관에서의 적용이 필요하다. 또한 검사실 간 비교를 위한 외부정도관리 사업의 필요성이 있다고 판단된다.

요 약

배경: ABO 항체역가 검사는 주로 ABO 부적합 신생아 용혈성 질환의 진단 및 경과 관찰, ABO 부적합 골수 이식의 예후 평가 및 경과 관찰의 목적으로 사용되고 있으며, 최근 ABO 부적합 신장 이식의 실시에 따라 검사 빈도가 증가하고 있다. 하지만, ABO 항체역가 검사는 각 검사기관마다 서로 다른 방법을 사용하고 있으며, 동일한 검사 방법을 사용하여도 검사기관 및 검사자 간 검사 결과의 편차가 존재한다. 본 연구에서는 국내 4개 의료기관을 대상으로 ABO 항체역가 검사법에 대한 설문조사를 시행함과 동시에 검사실 간 비교검사를 시행하였다.

방법: 국내 4개 의료기관을 대상으로 ABO 항체역가 검사법 및 상세 방법에 대한 설문조사를 시행하였다. ABO 혈액형 별(A형, B형 및 O형) 각 2명씩 건강한 자원자로부터 확보한 검체를 대상으로 각 기관의 검사방법에 따라 ABO 항체역가를 측정한 뒤, 회신된 결과를 anti-A, anti-B를 기준으로 재분류하여 분석하였다.

결과: ABO 항체역가 검사법, 검사결과와 보고 가능범위, 검체 희석액, 적혈구부유액의 종류 및 농도, 최대희석배수의 판독방법 등에서 각 의료기관 별로 서로 다른 차이를 보였다. Anti-A IgM 역가 및 anti-A IgG 역가는 최대 16배수의 차이를 보였으며, anti-B IgM 역가 및 anti-B IgG 역가는 최대 32배수의 차이를 보였다.

결론: 본 연구에서는 국내 4개 의료기관을 대상으로 ABO 항체역가 검사법에 대한 설문조사 및 검사실 간 비교검사를 시행한 결과 검사 방법의 차이가 많았으며, 비교검사의 결과도 최대 32배수까지 차이가 나타났다. 따라서, 향후 국내 ABO 항체역가 검사법의 표준화를 위한 작업과 함께 검사실 간 비교를 위한 외부정도관리 사업의 필요성이 있다고 판단된다.

참고문헌

1. Montgomery RA. ABO incompatible transplantation: to B or not to B. *Am J Transplant* 2004;4:1011-2
2. King KE, Warren DS, Samaniego-Picota M, Campbell-Lee S, Montgomery RA, Baldwin WM 3rd. Antibody, complement and accommodation in ABO-incompatible transplants. *Curr Opin Immunol* 2004;16:545-9
3. Montgomery RA, Locke JE, King KE, Segev DL, Warren DS, Kraus ES, et al. ABO incompatible renal transplantation: a paradigm

- ready for broad implementation. *Transplantation* 2009;87:1246-55
4. Tobian AA, Shirey RS, Montgomery RA, Ness PM, King KE. The critical role of plasmapheresis in ABO-incompatible renal transplantation. *Transfusion* 2008;48:2453-60
 5. Tydén G, Donauer J, Wadström J, Kumlien G, Wilpert J, Nilsson T, et al. Implementation of a Protocol for ABO-incompatible kidney transplantation-a three-center experience with 60 consecutive transplantations. *Transplantation* 2007;83:1153-5
 6. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ; Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative; Transfusion Medicine Resource Committee of the College of American Pathologists. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Vox Sang* 2008; 95:57-65
 7. 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
 8. Kumlien G, Wilpert J, Säfwenbergh J, Tydén G. Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation* 2007;84(Suppl 12):S17-9
 9. Tanabe K. Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies: the Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee survey. *Transplantation* 2007;84(Suppl 12):S13-6
 10. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003;3:708-14
 11. Fidler ME, Gloor JM, Lager DJ, Larson TS, Griffin MD, Textor SC, et al. Histologic findings of antibody-mediated rejection in ABO blood-group-incompatible living-donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4:101-7
 12. Spalter SH, Kaveri SV, Bonnin E, Mani JC, Cartron JP, Kazatchkine MD. Normal human serum contains natural antibodies reactive with autologous ABO blood group antigens. *Blood* 1999;93:4418-24
 13. Galili U, Ishida H, Tanabe K, Toma H. Anti-gal A/B, a novel anti-blood group antibody identified in recipients of abo-incompatible kidney allografts. *Transplantation* 2002;74: 1574-80
 14. 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. *Br J Haematol* 2005;130:954-63
 15. Krishnan NS, Fleetwood P, Higgins RM, Hathaway M, Zehnder D, Mitchell D, et al. Application of flow cytometry to monitor antibody levels in ABO incompatible kidney transplantation. *Transplantation* 2008;86:474-7
 16. Judd WJ, Luban NL, Ness PM, Silberstein LE, Stroup M, Widmann FK. Prenatal and perinatal immunohematology: recommendations for serologic management of the fetus, newborn infant, and obstetric patient. *Transfusion* 1990;30:175-83
 17. Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD. Technical manual. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2008
 18. Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, Chhibber V, Ness PM, King KE. Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Transfusion* 2010;50:631-4
 19. Kang MG, Lee SJ, Oh JS, Lim YA. Comparison of ABO isoagglutinin titers by different tube hemagglutination techniques. *Korean J Blood Transfus* 2009;20:227-34