



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](#)

직접항글로불린검사와
항체용출검사의 임상적 의의

연세대학교 대학원

의 학 과

나 현 진

직접항글로불린검사와
항체용출검사의 임상적 의의

지도교수 김 현 옥

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2016 년 6 월

연세대학교 대학원

의 학 과

나 현 진

나현진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 송재우 인

심사위원 _____ 김현옥 인

심사위원 _____ 정준원 인

연세대학교 대학원

2016 년 6 월

감사의 글

본 연구를 무사히 마칠 수 있도록 도움을 주신 모든 분들께 감사의 말씀을 드립니다.

먼저, 학위논문의 완성에 있어서 처음부터 끝까지 야김없는 지원과 격려를 해 주신 김현옥 지도교수님께 진심으로 감사의 인사를 올립니다. 논문을 꼼꼼하게 검토해 주시고 부족한 부분을 채워주신 정준원 교수님, 송재우 교수님께도 무한한 영광을 돌리고 싶습니다. 선생님들의 훌륭한 가르침 덕분에 학위논문을 마지막까지 완성시킬 수 있었습니다.

자료를 분석하고 논문을 작성하는 과정 하나하나가 저에게 수혈의학 전반에 걸친 학문적 지식을 넓히고, 연구를 계획하며 자료를 분석하는 기술을 익힐 수 있는 좋은 기회가 되었습니다. 이번 석사 연구 경험을 바탕으로 수혈의학에 더 많은 열정을 가지고 한 차원 높은 수준의 학문을 배워나가는 디딤돌로 삼겠습니다.

감사합니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 대상 환자	7
2. 질환 별 임상적 의의 분석방법	7
가. 태아/신생아 용혈성질환	7
나. ABO 부적합 조혈모세포 이식	9
다. ABO 부적합 고형장기 이식	10
라. 용혈성빈혈 사례	11
3. 통계 분석	12
III. 결과	13
1. 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 의뢰된 환자의 특성	13
2. 태아/신생아 용혈성질환에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의	15
3. ABO 부적합 조혈모세포 이식에서 직접항글로불린 검사와 항체용출검사의 임상적 의의	22
4. ABO 부적합 고형장기 이식에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의	27
5. 용혈성빈혈 사례에서 직접항글로불린검사와 항체용출 검사의 임상적 의의	29
IV. 고찰	33
V. 결론	42
참고문헌	43
ABSTRACT	46

LIST OF FIGURES

Figure 1. Hemoglobin, reticulocyte (%), and total bilirubin values of the patients who were divided into three groups according to the direct antiglobulin test and elution results in diagnosis of hemolytic disease of the fetus/newborn21

Figure 2. Hemoglobin and lactate dehydrogenase values of the patients who were divided into four groups according to the direct antiglobulin test and elution results regarding major, minor, and bidirectional ABO incompatible hematopoietic stem cell transplantations26

LIST OF TABLES

Table 1. Characteristics of 536 patients enrolled in this study	13
Table 2. Disease group for which the direct antiglobulin tests and the antibody elution tests were simultaneously ordered	14
Table 3. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 326 patients and clinical correlation with the diagnosis of hemolytic disease of the fetus/newborn	18
Table 4. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 89 patients under serologic monitoring of ABO incompatible hematopoietic stem cell transplantations	24
Table 5. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 3 patients under serologic monitoring of ABO incompatible solid organ transplantations	28
Table 6. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 69 patients under investigation for hemolytic anemia episodes and clinical correlation with the diagnosis of immune hemolytic anemia	32

국문요약

직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의

직접항글로불린검사는 환자에게 나타나는 면역성과 비면역성 용혈 반응을 구별하기 위해 시행하는 검사이며, 이와 병행하여 항체용출 검사를 시행할 경우 부착된 항체의 특이성을 확인할 수 있다. 본 연구에서는 2005년 1월 1일부터 2015년 12월 31일까지 최근 10년간 세브란스병원에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 의뢰되었던 환자의 검사결과를 기반으로 검사 의뢰 사유에 따라 질병을 분류하고, 결과에 대해 분석하여 두 검사의 임상적 의미를 평가 하였다.

분석기간 중 536명의 환자에서 1,186건의 검사가 의뢰되었으며, 환자의 검사소견 및 임상적 진단은 의무기록을 후향적으로 조사하여 평가하였다. 동시에 검사가 의뢰되었던 사유는 태아/신생아 용혈성질환의 진단, ABO 부적합 조혈 모세포 이식 및 고형장기 이식, 용혈성빈혈 사례로 분류하였다. 환자의 임상적 용혈 여부는 환자의 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈, 젖산탈수소효소, 합토클로빈의 검사 소견과 의무기록을 중심으로 판정하였으며, 용혈성빈혈 사례의 경우 비예기항체 선별 및 동정검사 결과를 포함하여 분석하였다. 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과를 음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 그리고 양성과 양성으로 나누고, 임상적 진단과 용혈의 검사 소견을 연관하여 두 검사 결과가 갖는 임상적 의의를 분석하였다.

검사가 의뢰된 환자는 생후 28일 이하의 신생아가 가장 많았으며, 의뢰 사유 또한 태아/신생아 용혈성질환을 확인하기 위한 경우가 가장 많았다. 태아/신생아 용혈성질환이 의심되는 환아에서는 항체용출검사의 결과 및 환아의 적혈구가 감작된 정도, 즉 직접항글로불린검사 양성 유무에 따라 태아/신생아

용혈성 질환이 진단된 환자의 수를 알 수 있었으며, 여기서 항체용출검사의 민감도가 직접항글로불린검사보다 더 높았다. 그러나 환자의 적혈구가 감작된 정도에 따른 용혈의 차이는 없었다. ABO 부적합 조혈모세포 이식에서 이식 후 직접항글로불린검사 및 항체용출검사는 모두 음성인 경우가 가장 많았으며, 일부 양성을 보이더라도 용혈성 빈혈의 임상적 또는 검사실 소견과 연관되지는 않았다. 반면 ABO 부적합 고형장기 이식에서는 두 검사가 모두 양성인 경우에 두 명 가운데 한 환자에서 용혈성 빈혈의 임상적 또는 검사실 소견과 연관이 있음을 알 수 있었으나 검사 건수가 3명으로 그 의의를 단정할 수는 없었다. 용혈성빈혈 사례 조사를 위해 검사가 의뢰된 환자들은 직접항글로불린검사, 비예기항체 선별 및 동정검사와 자가대조, 항체용출검사 결과에 따라 면역성 용혈성빈혈로 진단된 환자의 수를 구할 수 있었다. 또한 이를 통하여 직접항글로불린검사의 민감도가 항체용출검사보다 더 높음을 알 수 있었다.

결론적으로 직접항글로불린검사와 항체용출검사는 태아/신생아 용혈성질환에서 동시에 의뢰될 경우 더 민감하고 특이적으로 진단이 가능하였다. ABO 부적합 조혈모세포 이식에서 두 검사를 실시하는 경우 두 검사 결과에 따라 용혈의 정도에 차이가 없어 이식 후 용혈성 빈혈이 의심될 때 선별적으로 의뢰하는 경우 진단에 기여할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 용혈성빈혈 사례에서는 두 검사를 동시에 시행하여 용혈의 원인이 무엇인지를 추정할 수 있었으며, 면역성용혈성 빈혈을 확인하는 검사로서는 직접항글로불린검사만으로 충분한 민감도를 보여주었다. 다만 두 검사에서 모두 음성인 경우도 낮은 비율로 존재하기 때문에 면역성용혈성빈혈을 확진 하기 위한 추가검사의 필요성을 제기할 수 있었다.

핵심되는 말: 직접항글로불린검사, 항체용출검사, 면역성 용혈성빈혈

직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의

<지도교수 김현옥>

연세대학교 대학원 의학과

나현진

I. 서론

직접항글로불린검사(Direct antiglobulin test, DAT)는 환자에게 나타나는 면역성과 비면역성 용혈반응을 구별하기 위해 시행하는 검사로서 생체 내에서 적혈구 표면에 면역글로불린 G (immunoglobulin G, IgG)나 보체 C3b 또는 C3d (complement C3b or C3d)가 부착되어 있는지를 알려준다. 우선 다특이성(polyspecific) 항글로불린 시약을 사용하여 양성을 보이면 anti-IgG 및 anti-C3 단특이성(monospecific) 항글로불린 시약을 이용하여 적혈구 표면 부착 단백질의 종류를 결정하게 된다¹. 직접항글로불린검사가 양성으로 나올 수 있는 원인 질환은 자가면역성 용혈성빈혈(autoimmune hemolytic anemia), 부적합 수혈에 의한 용혈성 수혈반응(hemolytic transfusion reaction), 태아/신생아 용혈성질환(hemolytic disease of the fetus/newborn, HDFN), 조혈모세포 또는 고형장기 이식 후 발생한 용혈성 수혈반응 또는 passenger lymphocyte syndrome, 약제에 의한 용혈성빈혈(drug-induced hemolytic anemia), 그리고 IVIG (intravenous immunoglobulin)나 Rh D immunoglobulin의 투여

등이 있다².

직접항글로불린검사와 병행하여 항체용출검사(antibody elution test)를 시행할 경우 좀 더 유용한 정보를 얻을 수 있다. 항체용출검사는 적혈구에 부착된 IgG 항체를 분리시켜 기능적인 상태로 얻는 술식으로, 항체의 특이성(specificity)를 동정할 수 있다³. 그러나 혈청 면역글로불린(immunoglobulin)의 증가에 의한 비특이적인 반응으로 직접항글로불린검사 양성도 나타날 수 있기 때문에 항체용출검사는 직접항글로불린검사가 양성이라고 해서 반드시 시행할 필요는 없다는 보고가 있다⁴. 실제로 입원환자의 직접항글로불린검사는 1-5% 가량 양성도 나온다고 알려져 있으며, 이러한 경우 항체용출검사는 음성으로 나올 것으로 예측된다⁵. 또한 직접항글로불린검사가 양성이라도 대부분의 혈청에서 적혈구 부착 항체의 특이성을 동정할 수 있기 때문에 항체용출검사에서 새로운 정보(informative eluate)를 줄 수 없으므로 먼저 비예기항체 선별 및 동정검사(unexpected antibody screening and identification)를 시행할 것을 권유하고 있다^{3,6-8}. 따라서 항체용출검사는 직접항글로불린검사가 양성이라고 반드시 시행해야 하는 것이 아니라, 임상적으로 환자가 면역성 용혈이 의심되는 증상이나 증후를 보이거나, 태아/신생아 용혈성질환이 의심되며 모체의 혈청에서 동중항체가 없는 경우, 그리고 최근 수혈을 받았지만 비예기항체 선별 및 동정검사에서도 음성으로 나온 경우 등 임상적 소견과 연관 후에 시행하는 것이 권장된다^{3,5}.

통상적으로 환자가 면역성 용혈반응을 보이는 경우 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 결과와 같이 해석하여 그 원인을 나누어 볼 수 있다. 직접항글로불린검사의 단특이성 anit-C3만 양성인 경우 한랭자가항체(cold autoantibodies)에 의한 면역복합체(immune complex)나 보체 활성화를 의미한다. 이때 항체용출검사는 음성을 보인다. 단특이성 anti-IgG 양성인 경우

항체용출검사의 결과에 따라 나누어 생각해 볼 수 있다. 용출액이 음성(nonreactive elute)이면 약제의존성 약제에 의한 용혈성 빈혈(drug-dependent drug-induced hemolytic anemia)이나 적혈구 세척 후에도 남아 있는 흡착 IgG를 의미한다. 반면, 용출액에서 특정 적혈구 항원에 대한 특이성을 보이는 경우 동종면역항체를 의심하고, 용출액이 모든 적혈구에 대해 반응을 보이는 경우(panreactive or panagglutination) 자가면역 항체(주로 온난자가항체, warm autoantibodies)나 약제에 의한 용혈성빈혈, 고빈도 항원에 대한 동종항체의 존재를 의미한다¹. 직접항글로불린검사에서 anti-C3와 anti-IgG에 모두 양성을 보이면서 항체용출검사에서 모든 적혈구에 대해 반응을 보이거나 특정 적혈구 항원에 대한 특이성을 보이는 경우 온난 또는 혼합형자가항체(mixed-type autoantibodies)를 의미하기도 한다^{9,10}.

직접항글로불린검사는 비교적 표준화되어 있는 반면 항체용출검사의 방법은 다양하며, 온도 변화를 이용한 방법, 산도(pH) 변화를 이용한 방법, 화학 물질(chemical)을 사용하는 방법, 유기 용매(organic solvent)를 이용하는 방법 등이 있다¹¹⁻¹³. 이 가운데 가열 용출법(heat elution method)과 glycine acid EDTA법, chloroquine법, diphosphate법이 널리 이용되고 있다. 각 항체용출법에 따라 항체의 수율(recovery)에는 차이가 있으며, 이중 glycine acid EDTA 법이 비교적 가장 민감한 방법으로 소개되고 있다^{12,14,15}.

그러나 직접항글로불린검사가 양성인 적혈구에서 비교적 민감한 항체용출법을 사용하여도 그 수율(recovery)이 항상 높은 것은 아니다. 직접항글로불린검사 anti-IgG 양성 적혈구에서 37.7%³에서 68.0%⁶까지의 다양한 비율로 항체용출검사가 음성으로 보고되었다. 이는 앞서 말한 약제의존성 항체나 혈청 면역글로불린 증가 따른 흡착 IgG에 기인하거나, 항체용출검사 효율성 자체의 한계 때문일

것이다³. 또한 현미경적 양성 또는 약양성(microscopically or weakly positive) 직접항글로불린검사 결과를 보이는 적혈구는 육안적 양성(macroscopically positive) 직접항글로불린검사 결과를 보이는 적혈구에 비하여 항체용출검사서 양성(reactive elute)이 나오는 비율이 유의미하게 낮다고 알려져 있다³.

본 기관에서는 2008년부터 기존의 가열 용출법을 대체하여 glycine acid EDTA법을 도입하였고, 현재까지 사용하고 있다. 그래서 환자에서 면역성 용혈이 의심될 경우 직접항글로불린검사 및 항체용출검사와 함께 비예기항체 선별 및 동정검사를 시행하여 그 원인 감별에 이용하고 있다. 국내에서는 수혈을 하는 기관은 약 2500여 기관에 이르고 있지만 대한정도관리협회의 혈액은행 외부정도관리에 참여하는 542개 기관 중 직접항글로불린검사를 실시하고, 외부정도관리에 참여하는 기관은 362개(2015년 상반기, 다특이성 직접항글로불린검사 기준)로 조사되고 있다. 외부정도관리 항목에는 포함되어 있지 않아서 국내의 자료는 없지만, 항체용출검사를 실시하는 기관은 더 한정되어 있을 것으로 생각된다. 이렇게 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 많이 시행되지 않고 있는 이유는 일차적으로 면역성 용혈성빈혈이 비교적 드문 질환으로 직접적으로 의심하지 않으면 진단되지 않고 지나치기 쉬우며, 다양한 질환 군을 포함하고 있어 그 분류가 복잡하고 감별진단이 어렵기 때문이다¹⁶.

이에 본 연구에서는 최근 10년간 본원에서 시행된 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과를 환자의 의심되는 질환 및 임상적 상황에 따른 검사 의뢰 사유에 따라 분석하고, 그 임상적 의의를 평가하고자 한다. 또한 국내 보고 자료를 생산하고, 외국의 자료와 비교 분석을 통하여 국내에서도 혈액은행에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 활용할 수 있는 기본적 자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 환자

세브란스병원 혈액은행에서 2005년 1월 1일부터 2015년 12월 31일까지 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 의뢰된 1,186건 536명의 환자를 대상으로 의무기록을 후향적으로 조사하였다. 각 환자의 직접항글로불린검사 및 항체용출검사 결과와 의뢰 일시, 나이, 성별을 조사하였다. 그리고 직접항글로불린검사 및 항체용출검사 의뢰일 전후 3일에 시행된 비예기항체 선별 및 동정검사, 혈색소(hemoglobin), 망상적혈구(%) (reticulocyte (%)), 총빌리루빈(total bilirubin), 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH), 합토클로빈(haptoglobin)을 조사하였다. 또한 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 의뢰 사유를 크게 태아/신생아 용혈성질환의 진단, ABO 부적합 조혈모세포 이식의 혈청학적 관찰, ABO 부적합 고형장기 이식의 혈청학적 관찰, 용혈성빈혈 사례의 조사 네 가지로 나누어 해당하는 환자를 분류하였다.

본 연구는 연세의료원 세브란스병원 임상연구보호센터의 승인을 통과하였다(IRB 승인번호: 4-2016-0046).

2. 질환 별 임상적의의 분석방법

가. 태아/신생아 용혈성질환

태아/신생아 용혈성질환이 의심되었고, 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈을 모두 검사한 환아를 대상으로 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 결과에 따라 각각 양성과 양성, 양성과 음성, 음성과 양성, 음성과 음적으로 분류하였다. 각각에 해당하는 환아 수를 조사하고, 항체용출검사가 양성일 경우 용출액에서 동정된 항체에 따라 anti-A 또는 anti-B 항체, anti-D 항체, non-A/B 동종항체에 해당하는 환아 수를 조사하였다.

위 환아 중 임상적에 의하여 태아/신생아 용혈성 질환으로 실제 진단 되었는지 의무기록 상 입/퇴원 기록 및 진단명을 검토하여 확인하였다. 그리고 모체와 환아의 ABO 또는 RhD 형 부적합 여부와 이로 인하여 모체의 항체가 태아/신생아에게 전달되어 질환을 일으킬 가능성이 있는지 여부도 조사 하였다(e.g. O형 산모와 A 또는 B형 태아/신생아). 이 두 가지 모두 해당될 경우 “태아/신생아 용혈성 질환이 임상적으로 진단됨”으로 정의하고 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과에 따라 해당하는 환아 수를 구하였다. 환아의 검사 결과 상 혈색소가 14.0 g/dL 미만, 망상적혈구(%)가 2.31%를 초과, 총빌리루빈이 1.2 mg/dL를 초과하는 수치를 모두 만족하는 경우 “검사결과가 용혈을 시사함”으로 정의 하고, 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과에 따라 해당하는 환아의 수를 구하였다. 만약 환아가 “태아/신생아 용혈성질환이 임상적으로 진단됨”과 “검사결과가 용혈을 시사함”을 모두 만족하며, 다른 면역성/비면역성 용혈의 증거를 찾을 수 없는 경우 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”으로 정의하고 해당하는 환아의 수를 구하였다.

앞서 구한 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”된 환아를 질병이 있는 집단으로, 이에 속하지 않는 환아를 질병이 없는 집단으로 보고, 질병이 있는 집단 가운데 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사 양성 환아의 수를 각각 구하여 검사의 민감도(sensitivity)를 계산하였다. 또한 질병이 없는 집단 가운데 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사 음성 환아의 수를 각각 구하여 검사의 특이도(specificity)를 계산하였다.

적혈구 감작의 정도에 따른 용혈의 정도를 보기 위하여 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단” 가능했던 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성 군(낮은 수준의 모체 유래 항체에 의한 태아의 적혈구 감작을 보인 환자군)과 직접항글로불린

검사 양성, 항체용출검사 양성 군(높은 수준의 모체 유래 항체에 의한 태아의 적혈구 감작을 보인 환자군), 그리고 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 음성이면서 “태아/신생아 용혈성질환이 임상적으로 진단”되지 않고, “검사결과가 용혈을 시사”하지 않았던 군(정상 대조군) 사이에 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈이 어떤 차이가 있는지를 Kruskal-Wallis 검정을 통하여 분석하였다. 만약 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈의 수치의 유의미한 차이가 있는 군이 세 군 가운데 있다면, Mann-Whitney 검정을 통하여 사후검정을 실시하였다.

나. ABO 부적합 조혈모세포 이식

ABO 부적합 조혈모세포 이식의 혈청학적 관찰을 위하여 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 의뢰된 환자에 대하여 환자와 공여자의 혈액형을 조사하여 주부적합(major incompatible), 부부적합(minor incompatible), 양방향성부적합 또는 주/부부적합(bidirectional incompatible or major/minor incompatible) 이식으로 분류하였다. 그리고 이식한 날짜를 기준으로 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과를 이식 전과 후로 나누어 조사하였다. 이식 후 직접항글로불린검사 및 항체용출검사 결과에 따라 음성과 음성, 음성과 양성, 양성 과 음성, 양성 과 양성 의 네 군으로 나누고, 각각에 해당하는 환자 수를 조사 하였다. 여기서 이식 전부터 이미 직접항글로불린검사나 항체용출검사가 양성 이었던 환자나, 이식 후 혈색소와 젓산탈수소효소를 검사하지 않은 환자는 제외하였다. 이식 후에 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사가 양성으로 나왔다면 그 결과에 영향을 미칠 수 있는 IVIG를 검사 전 사용한 환자 수도 조사하였다. 항체용출검사가 양성일 경우 그 동정 결과도 기록 하였다.

이식 후에 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 결과에 따라

음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 양성과 양성으로 나눈 네 군에 대하여 용혈성빈혈의 정도에 어떠한 차이가 있는지 평가하기 위하여 각 군의 혈색소와 젖산탈수소효소를 Kruskal-Wallis 검정을 통하여 분석하였다. 여기서 직접항글로불린검사와 항체용출검사 모두 음성인 군은 이식 후 젖산탈수소효소가 가장 높을 때와 이와 같은 날에 측정된 혈색소 수치 이용하였다. 그리고 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사가 양성인 세 군은 이식 후 검사가 처음으로 양성으로 변한 시점의 혈색소와 젖산탈수소효소 결과를 이용하였다. 만약 혈색소, 젖산탈수소효소 수치의 유의미한 차이가 있는 군이 네 군 가운데 있다면, Mann-Whitney 검정을 통하여 사후검정을 실시하였다.

다. ABO 부적합 고행장기 이식

ABO 부적합 고행장기 이식의 혈청학적 관찰을 위하여 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 의뢰된 환자에 대하여 환자와 공여자의 혈액형을 조사하여 주부적합, 부부적합, 양방향성 부적합 이식으로 분류하고 이식한 장기의 종류도 기록하였다. 그리고 이식한 날짜를 기준으로 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과를 이식 전과 후로 나누어 조사하였다. 이식 후 직접항글로불린 검사 및 항체용출검사 결과에 따라 음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 양성과 양성으로 네 군으로 나누고, 각각에 해당하는 환자 수를 조사하였다. 여기서 이식 전부터 이미 직접항글로불린검사나 항체용출검사가 양성 이었던 환자는 제외하였다. 이식 후에 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사가 양성으로 나왔다면 그 결과에 영향을 미칠 수 있는 IVIG를 검사 전 사용하였는지 여부도 기록하였으며, 항체용출검사가 양성일 경우 그 동정 결과도 기록 하였다.

이식 후에 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 결과에 따라 음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 양성과 양성으로 나눈 네

군에 대하여 의무기록 상 입/퇴원 기록 및 진단명과 두 검사 의뢰 전 후 3일내에 시행한 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈을 참고하여 환자가 임상적으로 면역성 용혈성빈혈로 진단되었는지 여부와 검사실 소견이 용혈을 시사하는지 여부를 판단 하였다. 그리고 이에 해당하는 환자 수를 각각 조사 하였다. 용혈을 시사하는 검사실 소견은 환자의 혈색소가 14.0 g/dL 미만(남녀 나이 14세 미만) 또는 11.7 g/dL 미만(여자 14세 이상) 또는 13.0 g/dL 미만(남성 14세 이상), 망상적혈구(%)가 2.31% 초과, 그리고 총빌리루빈 1.2 mg/dL 초과하는지를 기준으로 평가 하였다.

라. 용혈성빈혈 사례

직접항글로불린검사와 항체용출검사가 의뢰된 환자에서 비예기항체 선별 및 동정검사의 결과가 존재하는 환자만을 분석에 포함하였다. 또한 이 환자 중 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈, 젖산탈수소효소, 합토클로빈의 검사 수치가 없는 환자는 분석에서 제외하였다.

직접항글로불린검사, 비예기항체 선별 및 동정검사와 자가대조, 그리고 항체용출검사 결과에 따라 용혈의 원인을 판독하여 환자를 분류하고 그 숫자를 구하였다. 또한 항체용출검사 또는 비예기항체 선별 및 동정검사가 양성일 경우 그 동정 결과와 이에 해당하는 환자 수를 각각 구하였다. 이 환자들 가운데 임상의에 의하여 면역성 용혈성빈혈로 진단 되었는지 의무 기록을 검토하여 확인하였으며, 이에 해당될 경우 “면역성 용혈성빈혈이 임상적으로 진단됨”으로 정의하고 직접항글로불린검사, 비예기항체 선별 및 동정검사와 자가대조, 그리고 항체용출검사 결과에 따라 그 숫자를 구하였다. 환자가 혈색소가 14.0 g/dL 미만(남녀 나이 14세 미만) 또는 11.7 g/dL 미만(여자 14세 이상) 또는 13.0 g/dL 미만(남성 14세 이상), 망상적혈구(%)가 2.31% 초과, 그리고 총빌리루빈 1.2 mg/dL 초과, 젖산탈수소효소 247 IU/L 초과, 합토클로빈 30.0 mg/dL 미만을 모두

만족하는 경우 “검사결과가 용혈을 시사함”으로 정의 하고, 직접항글로불린검사, 비예기항체 선별 및 동정검사와 자가대조, 그리고 항체용출검사 결과에 따라 그 숫자를 구하였다. 만약 환자가 “면역성 용혈성빈혈이 임상적으로 진단됨”과 “검사결과가 용혈을 시사함”을 모두 만족하고, 다른 비면역성 용혈의 증거를 찾을 수 없는 경우 “엄격한 기준에 의한 면역성 용혈성빈혈의 진단”으로 정의하고 해당하는 환자의 수를 구하였다.

앞서 구한 “엄격한 기준에 의한 면역성 용혈성빈혈의 진단”된 환자를 질병이 있는 집단으로, 이에 속하지 않는 환자를 질병이 없는 집단으로 보고, 질병이 있는 집단 가운데 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사 양성 환자의 수를 각각 구하여 검사의 민감도 (sensitivity)를 계산하였다. 또한 질병이 없는 집단 가운데 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사 음성 환자의 수를 각각 구하여 검사의 특이도(specificity)를 계산하였다.

3. 통계 분석

통계 분석은 Microsoft Excel 14.0.4760.1000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA)과 SPSS (PASW Statistics 18, SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하였다. 모든 통계적 유의 수준은 p value 0.05를 기준으로 하였다. 단, Mann-Whitney 사후검정에서는 Bonferroni's method에 의하여 p value 0.05를 총 집단 수로 나눈 값 (e.g. 세 군간의 비교의 경우 $0.05/3 = 0.017$)을 기준으로 하였다.

Ⅲ. 결과

1. 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 의뢰된 환자의 특성
 두 검사가 동시에 의뢰된 환자는 536명이었으며, 남자가 298명(55.6%), 여자가 254명(44.4%)이었다. 연령 분포는 출생 후 0일부터 96세까지 다양 했으며, 신생아(출생 후 28일까지)가 332명(61.9%)으로 가장 많았다(Table 1).

Table 1. Characteristics of 536 patients enrolled in this study

Age	Male	Female	Total
≤28 days	186	146	332 (61.9%)
29 days - <1 year	16	12	28 (5.2%)
1 - <10 years	45	40	85 (15.9%)
10 - <20 years	37	26	63 (11.8%)
20 - <40 years	8	6	14 (2.6%)
40 - <60 years	4	4	8 (1.5%)
≥60 years	2	4	6 (1.1%)
Total	298 (55.6%)	238 (44.4%)	536 (100%)

환자의 의뢰사유는 태아/신생아 용혈성질환이 의심되는 경우가 332명(61.9%)이었으며 그 다음으로 용혈성빈혈 사례의 조사를 위하여 의뢰된 경우가 103명(19.2%) 이었다. ABO 부적합 조혈모세포 이식 받은 환자가 98명(18.3%)이었으며, ABO 부적합 고형장기 이식 후 검사가 의뢰되었던 경우도 3명(0.6%)이 있었다(Table 2).

Table 2. Disease group for which the direct antiglobulin tests and the antibody elution tests were simultaneously ordered

Disease group	No. of patients (%)
Hemolytic disease of the fetus/newborn	332 (61.9)
ABO incompatible HPSCT	98 (18.3)
ABO incompatible solid organ transplantation	3 (0.6)
Hemolytic anemia episodes	103 (19.2)
Total	536 (100)

No.: Number, HPSCT: Hematopoietic stem cell transplantation.

2. 태아/신생아 용혈성질환에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의

태아/신생아를 대상으로 두 검사가 동시에 의뢰된 환아는 332명이었으며 이중 용혈의 소견을 확인하기 위한 검사로 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈을 모두 검사한 환아는 325명이었다 (Table 3).

직접항글로불린검사와 항체용출검사 모두 음성인 환아가 208명으로 가장 많았다. 이중 “태아/신생아 용혈성질환이 임상적으로 진단”된 환아가 7명이었고, “검사결과가 용혈을 시사”하는 경우는 37명이었다. 그리고 이 두 가지 모두 만족하는 환아는 5명이었다. 이 환자들은 모체에서 유래한 항체가 환아의 적혈구를 감작시킨 증거가 없었지만, 다른 면역성/비면역성 용혈의 원인도 찾을 수 없어 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”에 포함하였다.

직접항글로불린검사가 음성이나 항체용출검사에서 양성인 환아는 80명으로, anti-A/B가 용출된 경우가 39명, anti-D 가 용출된 경우가 39명, anti-B 와 anti-D 가 동시에 용출된 경우가 1명, 동정 불가한 항체가 용출된 경우가 1명이었다. “태아/신생아 용혈성질환이 임상적으로 진단”된 환아가 32명이었고, “검사결과가 용혈을 시사”하는 경우는 22명이었다. 그리고 이 두 가지 모두 만족하여 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단” 가능한 환아가 13명이었다. 이 중 anti-A/B가 용출된 7명의 환아는 모두 O형 산모에서 태어났다. Anti-D가 용출된 6명의 환아는 모두 Rh D 음성 산모에서 태어났으며, 1명을 제외하고 모두 산모의 Rh D immunoglobulin 투여 이력을 확인할 수 있었다. Anti-B 와 anti-D 가 동시에 용출된 1명의 환아와 동정 불가한 항체가 용출된 1명의 환아 모두 임상적으로 태아/신생아 용혈성질환이 진단되지 않았고, 검사실 소견도 용혈을 시사하지 않았다.

직접항글로불린검사가 양성이나 항체용출검사가 음성인 경우도 10명에서 관찰되었다. “태아/신생아 용혈성질환이 임상적으로 진단”된 환아가 3명이었고, “검사결과가 용혈을 시사”하는 경우는 3명이었다. 그리고 이 두 가지 모두 만족하는 환아는 1명이었다. 이 환아는 모체에서 유래한 것으로 의심되는 항체가 환아의 적혈구에서 용출되지는 않았지만, O형의 산모에서 출생한 B형 환아이고, IVIG 또한 사용한 이력이 없으며, 다른 면역성/비면역성 용혈의 원인도 찾을 수 없었다. 또한 단특이성 anti-IgG가 양성임에도 항체용출검사가 음성이어서 항체의 용출이 잘 이루어지지 않았을 것으로 추정하였으며, “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”에는 포함하였다.

직접항글로불린검사 및 항체용출검사 모두 양성인 경우는 총 27명으로, anti-A/B가 용출된 경우가 11명, anti-D가 용출된 경우가 13명이었다. 그리고 각각 anti-A + anti-D, anti-E + anti-c, 그리고 anti-E가 1명씩 용출되었다. “태아/신생아 용혈성질환이 임상적으로 진단”된 환아가 20명이었고, “검사결과가 용혈을 시사”하는 경우는 8명이었다. 그리고 이 두 가지 모두 만족하여 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단” 가능한 환아가 7명이었다. 이중 anti-A/B가 용출된 2명의 환아는 모두 O형 산모에서 태어났다. Anti-D가 용출된 4명의 환아는 모두 Rh D 음성 산모에서 태어났으며, 모두 산모의 Rh D immunoglobulin 투여 이력을 의무기록 상 확인할 수 없었다. 그리고 4명의 산모 중 2명의 혈청에서 anti-D가 확인된 기록이 있었다(나머지 2명은 알 수 없음). Anti-E가 용출된 1명은 산모의 혈청에서 역시 anti-E가 확인되었다.

따라서 “태아/신생아 용혈성질환이 임상적으로 진단”되었고, “검사결과가 용혈을 시사함”하며, 다른 면역성/비면역성 용혈의 증거를 찾을 수 없는 경우, 즉, “엄격한 기준에 의한 태아/신생아

용혈성질환의 진단” 하였을 때 직접항글로불린검사와 항체용출 검사의 민감도와 특이도를 구하였다. 이 때 직접항글로불린검사는 민감도 8/26(30.8%), 특이도 270/299(90.3%)를 보였다. 그리고 항체용출검사는 민감도 20/26(76.9%), 특이도 212/299(70.9%)를 보였다.

Table 3. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 326 patients and clinical correlation with the diagnosis of hemolytic disease of the fetus/newborn

DAT	Elution	Total No. of patients	Red cell sensitization of the patients		Clinically diagnosed as HDFN ¹	Laboratory findings suggestive of hemolytic episodes ²	Diagnosis of HDFN by strict criteria ³
			Antibody specificity in elutes	No. of patients			
N	N	208	-	-	7	37	5
N	P	80	Anti-A or B	39	20	11	7
			Anti-D	39	12	10	6
			Anti-B + Anti-D	1	0	1	0
			Unidentified antibody	1	0	0	0
P	N	10	-	-	3	3	1
P	P	27	Anti-A or B	11	9	2	2
			Anti-D	13	8	5	4
			Anti-A + Anti-D	1	1	0	0
			Anti-E	1	1	1	1
			Anti-E + Anti-c	1	1	0	0
Total		325		107	62	70	26

DAT: Direct antiglobulin test, No.: Number, HDFN: Hemolytic disease of fetus/newborn, P: Positive, N: Negative.

¹The criteria of “clinically diagnosed as HDFN” was determined by reviewing the patients' medical records and final diagnosis described by physicians' and confirming the incompatibility of ABO or Rh D types between mother and child.

²The criteria of “laboratory findings suggestive of hemolytic episodes” were defined as laboratory test results satisfied all of the following: Hb < 14.0 g/dL, reticulocyte (%) > 2.31%, and total bilirubin > 1.2 mg/dL.

³“Diagnosis of HDFN by strict criteria” was defined as the patient both “clinically diagnosed as HDFN” and showed “laboratory findings suggestive of hemolytic episodes” and evidence of other immune or non-immune causes of hemolytic anemia could not be found.

적혈구 감각의 강도와 용혈의 상관성을 보기 위하여 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단” 가능했던 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성 군(낮은 수준의 모체 유래 항체에 의한 태아의 적혈구 감각을 보인 환자군, $n = 13$)과 직접항글로불린검사 양성, 항체용출검사 양성 군(높은 수준의 모체 유래 항체에 의한 태아의 적혈구 감각을 보인 환자군, $n = 7$), 그리고 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 음성이면서 “임상적으로도 태아/신생아 용혈성질환으로 진단”되지 않고, “검사결과가 용혈을 시사”하지 않았던 군(정상 대조군, $n = 169$)의 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈이 어떤 차이가 있는지 비교한 결과를 Figure 1에 나타내었다.

직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성 태아/신생아 용혈성질환 환자의 혈색소(중양값 12.0 g/dL)는 대조군(중양값 16.2 g/dL)에 비하여 유의미하게 낮았으며($p < 0.0001$), 직접항글로불린검사 양성, 항체용출검사 양성 태아/신생아 용혈성질환 환자의 혈색소(중양값 10.8 g/dL)도 대조군에 비하여 유의미하게 낮았다($p < 0.0001$). 그러나 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성인 태아/신생아 용혈성질환 환자와 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 양성인 태아/신생아 용혈성질환 환자 사이에 혈색소의 유의미한 차이는 없었다($p = 0.275$). 또한 직접 항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성 태아/신생아 용혈성질환 환자의 망상적혈구(%)(중양값 6.1%)는 대조군(중양값 3.5%)에 비하여 유의미하게 높았으며($p < 0.0001$), 직접항글로불린검사 양성, 항체용출검사 양성 태아/신생아 용혈성질환 환자의 망상적혈구(%) (중양값 6.9%)도 대조군에 비하여 유의미하게 높았다($p = 0.001$). 그러나 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성인 태아/신생아 용혈성질환 환자와 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 양성인 태아/신생아 용혈성질환 환자 사이에 망상적혈구(%)의 유의미한

차이는 없었다($p = 0.757$).

그러나 총빌리루빈의 경우 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성 태아/신생아 용혈성질환 환자(중양값 5.7 mg/dL)와 직접항글로불린검사 양성, 항체용출검사 양성 태아/신생아 용혈성질환 환자(중양값 8.8 mg/dL), 그리고 대조군(7.5 mg/dL) 사이에 유의미한 차이는 없었다($p = 0.856$).

따라서 직접항글로불린검사 및 항체용출검사가 음성이고 태아/신생아 용혈성질환이나 다른 용혈성 소견을 보이지 않은 정상 대조군에 비하여 모체에서 유래한 항체에 의해 적혈구 감작이 보이는 태아/신생아 용혈성질환 환자에서 뚜렷한 혈색소 감소와 망상적혈구(%) 증가 소견을 보이지만, 적혈구 감작의 정도에 따른 용혈성빈혈의 차이는 없었다.

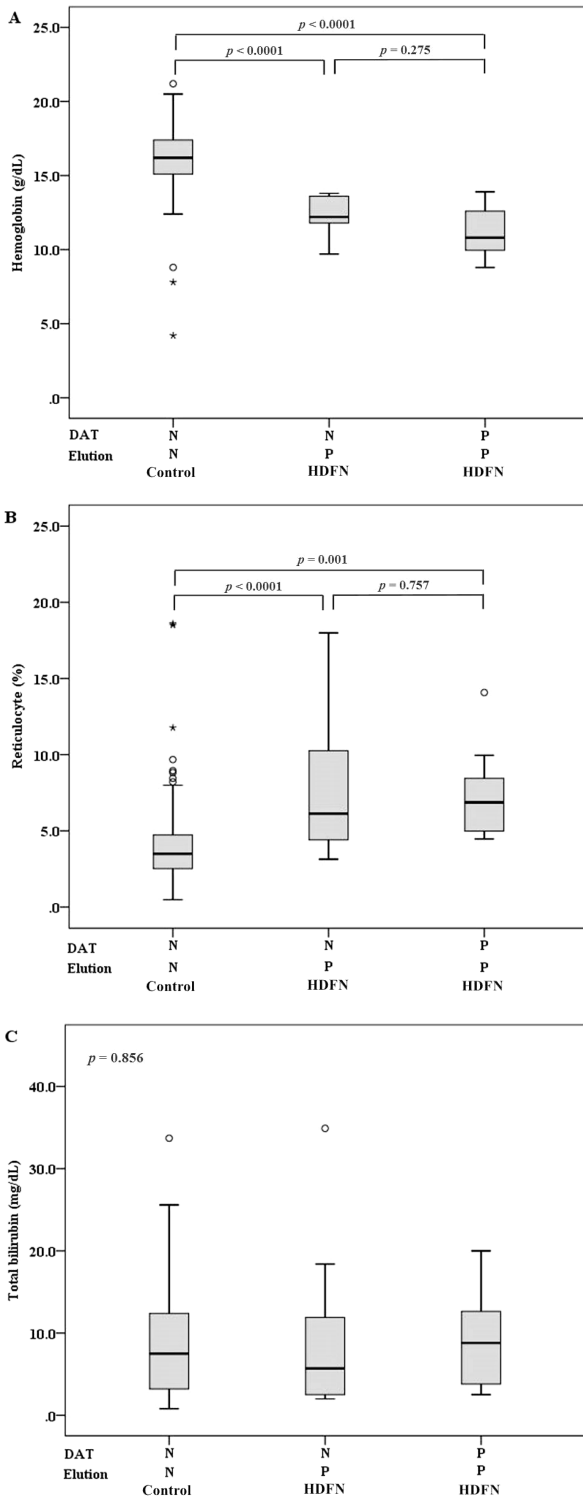


Figure 1. Hemoglobin, reticulocyte (%), and total bilirubin values of the patients who were divided into three groups according to the DAT and elution results in diagnosis of HDFN. The patients from first group with both DAT and elution negative neither was diagnosed as hemolytic disease of the fetus/newborn nor showed hemolytic episodes (control group, n = 169). The patients from second and third group with DAT negative or positive and elution positive were diagnosed as hemolytic disease of the fetus/newborn according to strict criteria (red cell sensitized group, n = 13 and 7). A. B. There were no significant differences in hemoglobin and reticulocyte (%) values between second and third group, indicating that there was no significant difference in hemolysis according to the degree of red cell sensitization. However, hemoglobin and reticulocyte (%) values were significantly lower in both second and third group compared to first group. C. The total bilirubin values did not show any significant difference among three groups. Inner lines, upper and lower ends of boxes indicate median values, and upper and lower quartiles, respectively. Whiskers denote maximum and minimum values, and circles, stars represent outliers. DAT: Direct antiglobulin test, P: Positive, N: Negative, HDFN: hemolytic disease of the fetus/newborn

3. ABO 부적합 조혈모세포 이식에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의

ABO 부적합 조혈모세포 이식의 혈청학적 관찰을 위하여 총 98명에 대하여 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행하였다. 환자는 이식 전후에 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 연속적으로 수 차례 시행하였고, 평균 7.5회의 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행하였다. 이 가운데 공여자와 수여자의 혈액형의 확인이 가능하고, 혈색소 및 젖산탈수소효소를 측정하였으며, 이식 전부터 이미 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사가 양성 이었던 환자를 제외한 89명에 대하여 이식 후 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과에 따른 분류를 Table 4에 요약하였다. 이 89명은 모두 소아혈액종양환자였다.

이식 후에 직접항글로불린검사 및 항체용출검사가 모두 음성으로 유지되었던 환자가 주부적합, 부부적합, 양방향성부적합의 경우 각각 14명(51.9%), 22명(66.7%), 19명(65.5%)로 공통적으로 가장 많았다. 직접항글로불린검사는 양성이나 항체용출검사는 음성인 경우가 각각 7명(25.9%), 6명(18.2%), 5명(17.2%)로 그 다음으로 많았으며, 이 환자들 모두 IVIG를 검사 전 사용하여 혈청면역글로불린 증가에 의한 비특이적인 반응으로 판단되었다. 항체용출검사가 양성이고 공여자 또는 수여자 적혈구에 대한 ABO 항체가 용출된 경우도 IVIG를 사용한 환자가 대부분이었다. 이 경우는 용출된 ABO 항체의 특이성이 공여자 또는 수여자의 적혈구에 대한 것인지는 확인할 수 있지만, 실제로 이 항체가 공여자 또는 수여자에서 유래한 것인지, IVIG에서 유래된 것인지는 판단할 수 없었다.

이식 후에 공여자 또는 수여자의 적혈구가 감작된 증거가 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사서 발견된 환자는 주부적합이식의 경우 27명 중 13명(48.2%)로 절반가까이 되었고,

부부적합과 양방향성부적합의 경우 비슷하여 각각 33명 중 11명 (33.3%), 29명 중 10명(34.5%)이었다.

Table 4. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 89 patients under serologic monitoring of ABO incompatible hematopoietic stem cell transplantations

Incompatibility	Total No. of patients	Results after transplantation		Antibody specificity in elutes	No. of patients	No. of patients with IVIG administration ¹
		DAT	Elution			
Major	27	N	N	-	14	-
		N	P	Unidentified antibodies	1	1
		P	N	-	7	7
		P	P	Recipient ABO antibodies	5	4
Minor	33	N	N	-	22	-
		N	P	Donor ABO antibodies	1	1
		P	N	-	6	6
		P	P	Donor ABO antibodies	4	2
Bidirectional	29	N	N	-	19	-
		N	P	Donor ABO antibodies	1	1
				Recipient ABO antibodies	1	1
				Recipient and donor ABO antibodies	1	1
		P	N	-	5	5
		P	P	Recipient and donor ABO antibodies	1	1
		Recipient ABO antibodies	1	1		
Total	89				89	27

No.: Number, DAT: Direct antiglobulin test, IVIG: Intravenous immunoglobulin, P: Positive, N: Negative

¹Number of patients who IVIG was administrated prior to first positive DAT or antibody elution test was counted.

이 환자들의 용혈성빈혈의 정도에 어떠한 차이가 있는지 평가하기 위하여 각 군의 혈색소, 젖산탈수소효소를 비교한 결과를 Figure 2에 나타내었다.

주부적합 이식에서 이식 후에 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 양성과 양성을 보인 군의 혈색소의 중앙값은 각각 8.8, 6.5, 8.9, 7.3 g/dL로 유의미한 차이는 없었으며($p = 0.325$), 젖산탈수소효소의 중앙값은 각각 420, 230, 370, 373 IU/L로 역시 유의미한 차이는 없었다($p = 0.432$). 그리고 부부적합 이식에서 이식 후에 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 양성과 양성을 보인 군의 혈색소의 중앙값은 각각 8.4, 10.1, 8.1, 7.9 g/dL로 유의미한 차이는 없었으며($p = 0.369$), 젖산탈수소효소의 중앙값은 각각 373, 217, 402, 239 IU/L로 역시 유의미한 차이는 없었다($p = 0.117$). 또한 양방향성부적합 이식에서도 이식 후에 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 양성과 양성을 보인 군의 혈색소의 중앙값은 각각 8.4, 8.3, 7.8, 9.3 g/dL로 유의미한 차이는 없었으며($p = 0.720$), 젖산탈수소효소의 중앙값은 350, 319, 291, 385 IU/L로 역시 유의미한 차이는 없었다($p = 0.421$).

따라서 ABO 부적합 조혈모세포 이식에서 이식 후에 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 연속적인 결과는 환자의 빈혈이나 젖산탈수소효소의 증가 소견과 잘 연관되지 않았다. 즉, 이식 후 공여자 및 수여자의 항체에 의한 적혈구 감작을 의미하는 직접항글로불린검사나 항체용출검사의 양성 소견이 환자의 용혈성빈혈의 정도를 나타내지는 않았다.

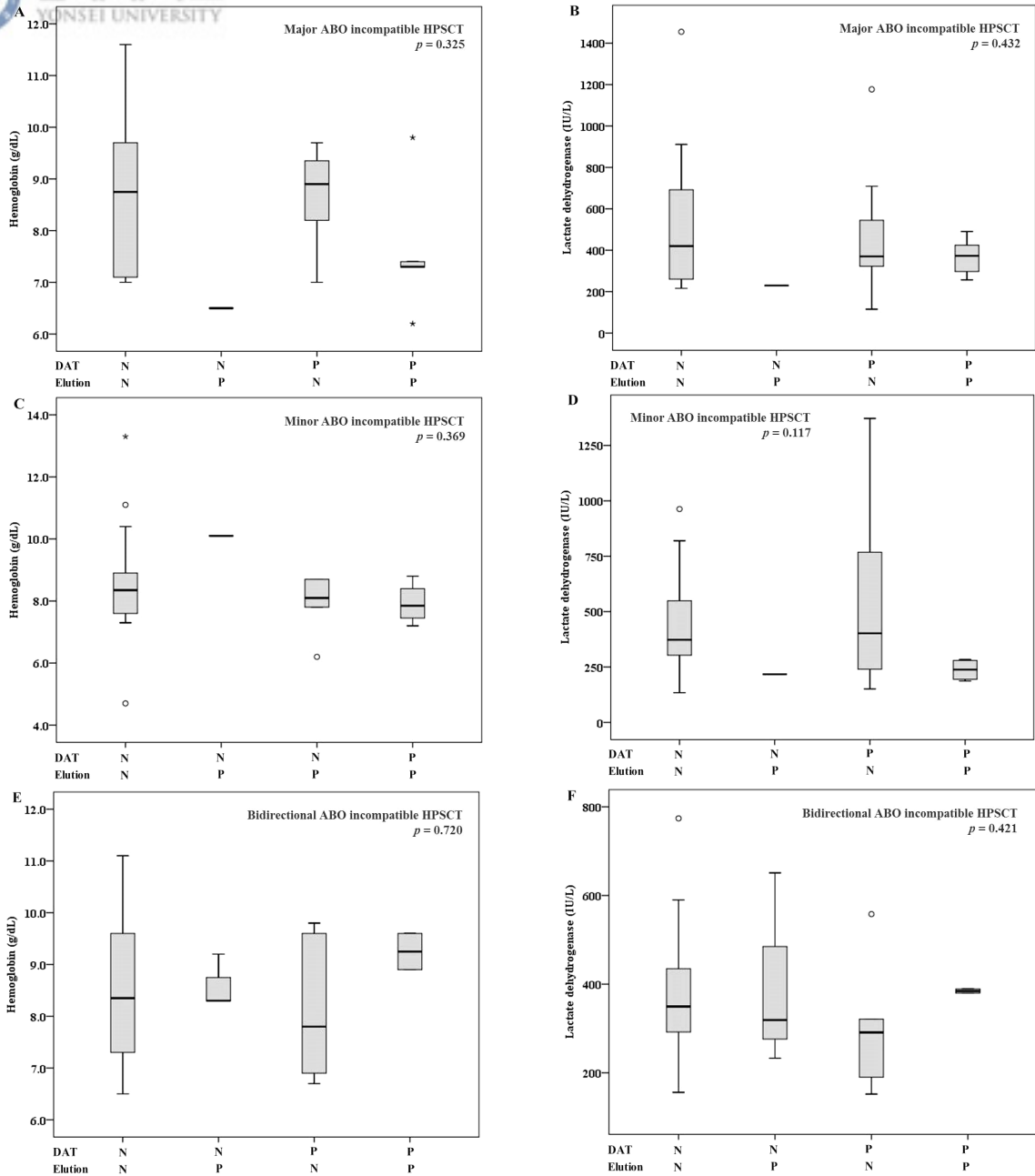


Figure 2. Hemoglobin and lactate dehydrogenase values of the patients who were divided into four groups according to the DAT and elution results regarding major, minor, and bidirectional ABO incompatible HPSTs. The values from first group with both DAT and elution negative were the maximum lactate dehydrogenase value and the same day hemoglobin value after transplantation. The values from second, third, and fourth group with either DAT or elution positive were the same day lactate dehydrogenase and hemoglobin value as either DAT or elution positive became first positive. A to F. The hemoglobin and lactate dehydrogenase did not show any significant difference among four groups in major, minor, bidirectional ABO incompatible HPST. Inner lines, upper and lower ends of boxes indicate median values, and upper and lower quartiles, respectively. Whiskers denote maximum and minimum values, and circles, stars represent outliers.

DAT: Direct antiglobulin test, P: Positive, N: Negative, HPST: Hematopoietic stem cell transplantation.

4. ABO 부적합 고행장기 이식에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과의 임상적 의의

ABO 부적합 고행장기 이식의 혈청학적 관찰을 위하여 총 3명에 대하여 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행하였다. 3명의 환자 모두 이식 후에만 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행하였고, 이식 전 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행한 환자는 없었다. 그리고 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 각각 양성과 음성 또는 음성과 양성을 보이는 환자는 없었다(Table 5).

주부적합 간이식을 받은 1명의 환자는 이식 후에 직접항글로불린검사 및 항체용출검사가 모두 음성이며, 검사실 소견 상 용혈성 빈혈 소견에 합당하지 않고, 만성 철결핍성 빈혈을 보여 이식으로 인한 면역성 용혈의 가능성은 낮을 것으로 판단하였다. 반면 2명의 부부적합 신이식 환자는 이식 후에 직접항글로불린검사 및 항체용출검사가 모두 양성이고, IVIG를 사용한 이력이 없으며, 용출액에서 A형 수여자에 대한 anti-A가 검출되어(공여자는 O형) 2명의 환자 모두 이식 관련 면역성 용혈의 가능성이 있었다. 그러나 2명 중 1명만 혈색소의 감소(7.3 g/dL), 망상적혈구(%)의 증가(3.24%), 총빌리루빈의 증가(3.1 mg/dL)와 같은 검사실 소견이 용혈성 빈혈을 시사하였으며, 임상적으로 passenger lymphocyte syndrome으로 진단 받았다.

Table 5. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 3 patients under serologic monitoring of ABO incompatible solid organ transplantations

Incompatibility	Total No. of patients	Results after transplantation		Antibody specificity in elutes	No. of patients	No. of patients with IVIG administration ¹
		DAT	Elution			
Major (Liver transplantation)	1	N	N	-	1 ²	-
Minor (Kidney transplantation)	2	P	P	Donor ABO antibodies	2 ³	0
Total	3				3	0

No.: Number, DAT: Direct antiglobulin test, IVIG: Intravenous immunoglobulin, P: Positive, N: Negative.

¹Number of patients who IVIG was administrated prior to positive DAT or antibody elution test was counted.

²The B+ patient who received liver from AB+ donor neither was clinically diagnosed as immune hemolytic anemia nor showed laboratory findings suggestive of hemolytic episode.

³One out of two A+ patients who received kidney from O+ donors was diagnosed clinically as passenger lymphocyte syndrome and showed laboratory findings suggestive of hemolytic episode.

5. 용혈성빈혈 사례에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의

용혈성빈혈 사례의 조사를 위해 의뢰된 103명 중 비예기항체 선별 및 동정검사와 자가대조, 혈색소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈, 젖산탈수소효소, 합토클로빈을 모두 검사한 환자 45명에 대하여 직접항글로불린검사, 비예기항체 선별 및 동정검사와 자가대조, 항체용출검사 결과에 따라 분류하였다(Table 6).

직접항글로불린검사가 음성이면서 비예기항체 선별 및 동정검사, 항체용출검사 모두 음성인 경우는 27명으로 가장 많았고, 이 가운데 “면역성 용혈성빈혈이 임상적으로 진단”된 환자가 10명, “검사결과가 용혈을 시사”하는 환자는 9명이였다. 두 가지를 모두 만족하는 환자는 5명이였다. 그러나 이 5명의 환자의 이후 경과 기록 및 검사실 소견상 2명이 thrombotic microangiopathy에 의한 용혈 이였고, 1명은 Wilson’s disease에 동반된 용혈성빈혈 이여서 대부분 비면역성 용혈 이였고, 나머지 2명만 가능한 다른 비면역성 용혈의 증거를 찾을 수 없어서 직접항글로불린 음성인 면역성 용혈성빈혈로 판단하였다.

반면 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 음성이나 비예기항체 선별 및 동정검사에서 양성, 자가 대조가 음성이 나왔던 환자는 2명으로, “면역성 용혈성빈혈이 임상적으로 진단”된 환자가 1명, “검사결과가 용혈을 시사”하는 환자는 2명이였다. 두 가지를 모두 만족하는 환자는 1명이였다. 이 환자의 anti-M은 혈청에서만 동정되고 용출액에서는 검출되지 않았으며, 환자의 첫 수혈 시점 이전부터 존재하여서 용혈성 수혈반응의 가능성은 낮고, 자연항체로서 형성되어 혈청 내 존재하는 상태로 보였다. 그리고 가능한 다른 비면역성 용혈의 원인을 찾을 수 없어서 역시 직접 항글로불린검사 음성인 면역성 용혈성빈혈로 판단하였다.

직접항글로불린검사가 양성인 경우는 비예기항체 선별 및 동정검사, 자가대조, 항체용출검사 결과에 따라 용혈성빈혈의 원인항체를 판독할 수 있었다.

직접항글로불린검사가 양성이면서 비예기항체 선별 및 동정검사 그리고 항체용출검사가 음성인 환자는 5명으로, 이중 “면역성 용혈성빈혈이 임상적으로 진단”된 환자가 2명, “검사결과가 용혈을 시사”하는 환자는 3명, 이 두 가지 모두 만족하여 “엄격한 기준에 의한 면역성 용혈성빈혈의 진단”이 가능한 환자가 2명이었다. 이 2명의 환자 모두 직접항글로불린검사에서 단특이성 항글로불린 시약 가운데 anti-C3에만 양성으로 IVIG를 사용한 이력은 없었으며, 다른 비면역성 용혈의 증거도 찾을 수 없었다. 이중 한 명은 cold agglutinin 양성으로 한랭응집소병(cold agglutinin disease)의 가능성이 높을 것으로 판단하였다. 나머지 한 명은 선천성 매독(congenital syphilis)에 동반된 용혈성빈혈로 진단된 바 있다.

직접항글로불린검사가 양성이면서 비예기항체 선별 및 동정 검사상 몇 개의 동정용 혈구에만 반응을 보이며, 자가대조 양성, 항체용출검사 양성인 경우는 4명(anti-C + anti-e 항체 1명, 동정불가 항체 3명)으로, 용출액에서 항체가 특이성을 보이지만 자가대조 양성으로 환자가 21일이내에 수혈이력이 없기 때문에 동중항체보다는 자가항체의 가능성이 높다고 판단하였다. “면역성 용혈성빈혈이 임상적으로 진단”된 환자가 3명, “검사결과가 용혈을 시사”하는 환자는 2명, 이 두 가지 모두 만족하여 “엄격한 기준에 의한 면역성 용혈성빈혈의 진단”이 가능한 환자가 2명이었다. 이 2명은 모두 동정불가 항체가 용출되었고 단특이성 항글로불린 시약 가운데 anti-IgG에만 양성으로, 특이성을 동정할 수 없는 온난자가 항체에 의한 용혈성빈혈(Warm autoimmune hemolytic anemia)로 판독하였다.

마지막으로 직접항글로불린검사가 양성이면서 비예기항체 선별

및 동정검사상 모든 동정용 혈구에 대하여 반응을 보이며, 자가대조 양성, 항체용출검사 양성인 경우는 7명으로, 주로 온난 또는 혼합형 자가항체에 의한 용혈성빈혈, 약제비의존성 약제에 의한 용혈성빈혈의 가능성이 높다. “면역성 용혈성빈혈이 임상적으로 진단”된 환자가 7명, “검사결과가 용혈을 시사”하는 환자는 5명, 이 두 가지 모두 만족하여 “엄격한 기준에 의한 면역성 용혈성빈혈의 진단”이 가능한 환자가 5명이었다. 이 5명은 모두 단특이성 항글로불린 시약 가운데 anti-IgG와 anti-C3에 동시에 양성으로 온난자가항체에 의한 용혈성빈혈 또는 혼합형자가항체에 의한 용혈성빈혈의 가능성이 높았다. 특히 2명은 cold agglutinin도 양성이었다.

결과적으로, 임상적으로 용혈성빈혈이 진단되었고, 검사실 소견도 용혈성빈혈을 시사하며, 다른 비면역성 용혈의 원인을 배제하여 “엄격한 기준에 의하여 면역성 용혈성 질환을 진단” 하였을 때, 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 민감도와 특이도를 구하였다. 이 때 직접항글로불린검사는 민감도 9/12(75.0%), 특이도 26/33(78.8%)를 보였다. 그리고 항체용출검사는 민감도 7/12(58.3%), 특이도 29/33(87.9%)를 보였다.

Table 6. Results of direct antiglobulin tests and antibody elution tests in 69 patients under investigation for hemolytic anemia episodes and clinical correlation with the diagnosis of immune hemolytic anemia

DAT	Unexpected antibody screening and identification	Autologous control	Elution	Total No. of patients	Antibody specificity			Clinically diagnosed as immune hemolytic anemia ¹	Laboratory findings suggestive of hemolytic episodes ²	Diagnosis of immune hemolytic anemia by strict criteria ³
					serum	eluate	No. of patients			
N	N	N	N	27	-	-	-	10	9	2
	P (one or some panel cells)	N	N	2	Anti-M	-	1	1	1	1
					Unidentified antibody	-	1	0	1	0
P	N	N	N	5	-	-	-	2	3	2
	P (one or some panel cells)	P	P	4	Anti-C + Anti-e	Anti-C + Anti-e	1	1	0	0
					Unidentified antibody	Unidentified antibody	3	2	2	2
	P (all or majority panel cells)	P	P	7	panagglutinating antibody	panagglutinating antibody	7	7	5	5
Total				45			13	23	21	12

DAT: Direct antiglobulin test, No.: Number, P: Positive, N: Negative.

¹The criteria of “Clinically diagnoses as hemolytic anemia” was determined by reviewing the patients' medical records and final diagnosis described by physicians'.

²The criteria of “Laboratory findings suggestive of hemolytic episodes” were defined as laboratory test results satisfied all of the following: hemoglobin < 14.0 g/dL (age < 14 years) or < 11.7 g/dL (female age ≥ 14) or < 13.0 g/dL (male age ≥ 14), reticulocyte (%) > 2.31%, total bilirubin > 1.2 mg/dL, LDH > 247 IU/L, and haptoglobin < 30.0 mg/dL.

³“Diagnosis of immune hemolytic anemia by strict criteria” was defined as the patient both “clinically diagnosed as hemolytic anemia” and showed “Laboratory findings suggestive of hemolytic episodes” and evidence of other non-immune causes of hemolytic anemia could not be found.

IV. 고찰

직접항글로불린검사와 항체용출검사는 그 방법이 소개된 지 비교적 오래된 검사지만, 면역성 용혈반응이 주로 적혈구 표면에 부착된 항체를 통해 시작되며, 이 항체를 매개로 하여 적혈구가 망상내피계 내에서 탐식되거나 보체계의 활성화로 파괴되기 때문에 면역성 용혈성빈혈 환자의 진단에 있어서 주요한 검사이다. 직접항글로불린검사는 적혈구 표면에 부착된 IgG 항체 또는 보체의 존재를 확인할 수 있도록 하며, 항체용출검사는 부착된 단백질 IgG 항체일 경우 동정을 가능하게 한다^{2,5}.

태아/신생아 용혈성질환에서 직접항글로불린검사를 통하여 모체에서 유래한 IgG 항체가 태아의 적혈구 표면에 부착되어 있음을 확인할 수 있으며, 항체용출검사를 통하여 이를 동정하고 모체와 태아의 혈액형 상의 부적합을 증명할 수 있다^{1,5}.

본 연구에서도 태아/신생아 용혈성질환이 의심되어 검사가 의뢰된 325명의 환자 중 27명이 직접항글로불린과 항체용출검사가 모두 양성을 보여, 태아의 적혈구가 모체에서 유래한 항체에 높은 수준으로 감작되어 있음을 확인할 수 있다. 그리고 80명의 환자에서는 직접항글로불린검사는 음성 이었지만, 항체용출검사가 양성이어서 좀 더 낮은 수준으로 태아의 적혈구가 모체에서 유래한 항체에 감작되어 있음을 보였다. 이렇게 환자에 따라 서로 감작되는 수준이 다른 가장 큰 이유는 모체의 혈청에 존재하는 항체의 역가가 다르기 때문이다¹. 특히 ABO 태아/신생아 용혈성질환의 경우 본 연구에서도 주로 O형 산모가 많았다. 항체용출검사서 anti-A 또는 anti-B가 용출되고, 태아/신생아 용혈성질환으로 엄격한 기준으로 진단된 환자 9명이 모두 O형 산모에서 출생하였다. O형인 사람은 IgG인 anti-A, anti-B의 역가가 다른 혈액형에 비해 높고, anti-A, anti-B 자체도 대부분 IgG 항체이다¹. Rh 태아/신생아

용혈성질환도 산모의 혈청에 원인이 되는 anti-D, anti-E 항체 등의 역가가 이전 감작의 여부 등에 의하여 다를 수 있다.

그러나 본 연구에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 음성임에도 태아/신생아 용혈성질환으로 진단된 환아가 5명 있었다. 이 환아들은 다른 용혈의 원인이 될만한 증거도 찾을 수 없었다. Desjardins 등¹⁷에 의하면 만약 태아와 모체 사이에 혈액형의 부적합이 존재한다면 직접항글로불린검사나 항체용출검사서 환아 적혈구의 감작이 증명되지 않더라도 어느 정도의 용혈의 증거가 존재할 수 있다고 하였다.

또한 본 연구에서는 직접항글로불린검사가 양성이나 항체용출검사가 음성인 환아가 10명 있었다. 통상적으로 직접항글로불린검사 상 검출된 적혈구 부착 단백질 IgG 항체가 아닌 보체이거나(직접항글로불린검사서 단특이성 anti-C3만 양성), IgG 항체의 비면역성 결합, 약제에 의한 용혈성빈혈을 의심하게 된다^{4,5,10}. 또한 항체용출검사서 시약에 의하여 항체의 분리가 실패한 경우도 가능하다³. 즉, 직접항글로불린검사서 anti-IgG가 양성이라고 하더라도 항상 항체가 용출되는 것은 아니고, 특히 용출방법에 따라 그 수율이 다를 수 있다고 알려져 있다^{12,14,15}. 본 연구에서 10명의 환자 가운데 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”할 수 있었던 환자는 1명뿐 이었으며, 이 환자는 직접항글로불린검사서 anti-IgG만 양성이고 IVIG도 사용하지 않았으며, 다른 비면역성 용혈의 증거도 찾을 수 없어 항체용출검사가 위음성 이었을 것으로 추정하였다.

환아의 적혈구가 감작됨을 직접항글로불린검사와 항체용출검사서 확인하더라도 모든 환아가 용혈을 보이는 것은 아니었다. 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성 환아 80명 가운데 13명(16.3%)만이 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”이 가능하였으며, 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두

양성인 환아 27명 가운데 조금 더 많은 비율인 7명(25.9%)만이 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”이 가능하였다. 즉, 태아/신생아 용혈성질환은 단지 태아 적혈구의 IgG 항체 감작만을 보이는 경우부터 태아사망까지 다양한 양상을 보일 수 있으며, 이를 진단하기 위해서는 직접항글로불린검사 및 항체용출검사뿐만 아니라 환자의 임상양상이나 다른 검사도 같이 참고해야 함을 의미한다¹. 반면에 환아의 적혈구가 감작된 정도는 용혈의 심한 정도와 잘 연관되지 않을 수 있다. 본 연구에서 환아의 적혈구가 감작된 증거가 있고 “엄격한 기준에 의한 태아/신생아 용혈성질환의 진단”된 13명과 7명의 환아는 대조군에 비하여 뚜렷한 빈혈을 보였지만, 감작된 정도에 따른 용혈의 차이는 없었다. 이는 적혈구 표면에 부착된 항체의 양 이외에도 다른 요소가 용혈의 정도에 관여함을 의미한다¹⁷.

앞서 환아의 적혈구가 모체의 항체에 의하여 감작된 정도에 따라 직접항글로불린 검사가 양성 또는 음성으로 나올 수 있다고 하였다. 또한 본 연구에서 항체용출검사의 민감도가 76.9%로 직접항글로불린검사의 30.8%보다 높게 나왔다. 이를 볼 때 환아가 태아/신생아 용혈성질환이 의심될 경우 직접항글로불린검사 뿐만 아니라 항체용출검사를 동시에 실시해야 하며, 직접항글로불린검사가 음성이라고 해서 태아/신생아 용혈성질환을 완전히 배제할 수는 없었다¹. 즉, 직접항글로불린검사는 환아의 적혈구가 감작된 정도를 나타내며, 항체용출검사는 태아/신생아 용혈성질환을 좀 더 민감하게 진단하고, 항체의 특이성을 동정하여 모체 유래 항체의 존재를 환아의 적혈구에서 증명하는 데 그 의의가 있다 하겠다.

ABO 부적합 조혈모세포 또는 고형장기 이식에서도 태아/신생아 용혈성질환에서와 같이 자신이 생성하지 않은 anti-A, anti-B가 환자의 적혈구를 감작시켰음을 직접항글로불린검사와 항체용출검사로 확인할 수 있다 (부부적합). 반대로 수혈의 경우와 같이

조혈모세포 또는 고형장기 이식 시 같이 전달된 공여자의 적혈구가 환자의 항체에 의하여 감작되어 용혈이 생길 수 있으며, 이를 직접항글로불린검사와 항체용출검사로 확인할 수 있다 (주부적합)¹.

본 연구에 포함된 환자들은 ABO 부적합 조혈모세포 이식의 전후에 환자가 임상적으로 용혈성빈혈의 소견을 보이는 것과 무관하게 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 연속적으로 검사하였다. 이는 주부적합 이식으로 인하여 면역성 용혈성빈혈이 급성 또는 만성으로 발생할 수 있으며, 순수 적혈구 무형성증(pure red cell aplasia)도 가능¹⁸하기 때문에 이에 대한 혈청학적 관찰의 목적이 있겠다. 그리고 부부적합 이식으로 인하여 passenger lymphocyte syndrome이 발생할 수 있으며, 역시 면역성 용혈성빈혈이 가능하다¹⁸.

ABO 부적합 조혈모세포 이식에 있어서 수여자 또는 공여자 적혈구의 감작이 이식 후에 확인되는 비율은 주부적합의 경우가 가장 높아 절반(48.2%)정도 되었고, 부부적합이나 양방향성 부부적합의 경우 1/3(33.3%와 34.5%)정도 되었다. 이렇게 감작이 확인되고, 그 정도의 차이가 있다고 하더라도 본 연구에서는 실제로 환자가 용혈을 보이는 정도에 차이는 없었다. 여기서 사용한 용혈의 지표는 혈색소와 젖산탈수소효소 이었는데, 많은 환자들이 이식 후 생착이 되어가는 과정에 있기 때문에 혈색소는 대부분의 환자가 낮은 수치를 보였다. 그리고 조혈모세포 이식은 대부분 말초 혈액조혈모세포 이식(peripheral blood stem cell transplantation)인 경우가 많으며, Bolwell 등에 의하면 이 경우에 젖산탈수소효소의 상승이 99%가까이에서 보였다고 하였다¹⁹. 그 외에 용혈의 증거가 될 수 있는 총빌리루빈이나 망상적혈구(%), 합토클로빈 등은 본 연구에서 많은 환자에서 측정되지 않아 용혈의 지표로 삼기 어려웠다.

또한 연구에 포함된 ABO 부적합 조혈모세포 이식을 받은 89명의

환자 가운데 이식 후 직접항글로불린검사나 항체용출검사가 양성으로 변하기 이전에 IVIG를 사용하지 않은 사람은 단 3명으로, 직접항글로불린검사나 항체용출검사가 양성으로 나왔을 때 그 원인이 이식으로 인한 것인지 IVIG로 인한 것인지 감별하기 어려운 점이 있었다. Robertson 등은 골수 이식 후 IVIG를 사용한 환자의 48.9%에서 직접항글로불린검사가 양성으로 나올 수 있다고 하였다²⁰. 이러한 IVIG의 영향으로 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사가 양성이 늘어나 실제로 환자의 체내 적혈구 감작과 이에 의한 용혈을 반영하지 못하는 것으로 보인다.

따라서 ABO 부적합 조혈모세포 이식의 경우는 환자가 실제로 용혈성 빈혈의 증상과 증후, 그리고 검사실 소견을 보이는 경우에 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행하여 환자 내의 적혈구가 감작되어있는지 여부와 그 특이성을 동정하여 공여자 또는 수여자 유래 항체를 증명하는 것이 필요하다고 하겠다. 즉, 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 통하여 환자에게 용혈성빈혈이 발생하는지 관찰하기 위한 지표로 삼는 것은 용이하지 않다고 볼 수 있다.

반면에 본 연구에서 ABO 부적합 고형장기 이식의 경우는 환자가 실제로 용혈성빈혈이 의심이 되어 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 의뢰되었고, 용혈성빈혈을 진단하기 위하여 혈색소와 망상적혈구(%), 총빌리루빈 등의 참고할만한 다른 검사도 있었기에 좀 더 용이하게 면역성 용혈성빈혈의 진단이 가능하였다. 고형장기 이식의 경우 직접적으로 수여자에게 주입되는 적혈구 자체가 작기 때문에 주로 부부적합 이식에서 발생할 수 있는 passenger lymphocyte syndrome이 문제가 되며¹⁸, 본 연구에서도 심한 용혈성 빈혈을 겪은 1례가 있었다. 그러나 이 환자에서 직접항글로불린검사 및 항체용출검사의 양성 소견이 용혈성 빈혈의 임상적 또는 검사실 소견과 연관이 있음을 알 수 있다고 하여도

연구에 포함된 총 환자가 3명으로 그 의의를 단정할 수는 없었다.

용혈성빈혈 사례 조사를 위해서 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행하는 경우 각각의 양성 여부에 따라 용혈의 원인을 어느 정도 추정할 수 있다. 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 양성으로 나오는 경우 전형적으로 면역성 용혈을 의미하며, 부착된 IgG 항체의 혈청학적 성상도 규명되었다고 해석할 수 있다⁵. 물론 면역성 용혈이 있다고 해서 항상 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 양성인 것은 아니고, 부착된 항체나 단백질 성상에 따라 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사가 음성으로 나오는 경우도 있다. 즉, 직접항글로불린검사가 양성이나 항체용출검사가 음성인 경우 앞서 말한 한랭응집소병(cold agglutinin disease), 발작성 한랭혈색소뇨증(paroxysmal cold hemoglobinuria)과 같이 검출된 단백질이 IgG 항체가 아니고 보체인 경우(직접항글로불린검사 상 단백질성 anti-C3만 양성), 약제의존성 약제에 의한 용혈성빈혈, IVIG 사용, 해당 항체가 특정 항체용출검사 시약으로 용출이 되지 않는 경우(항체용출검사의 위음성)를 생각해 보아야 한다^{3-5,10}. 그리고 직접항글로불린검사가 음성이나 항체용출검사가 양성인 경우는 부착된 IgG 항체의 역가가 직접항글로불린검사의 검출 민감도 이하이거나, IgG 항체의 친화도(affinity)가 낮은 경우를 고려해 보아야 한다^{1,2}. 환자가 용혈을 보이더라도 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 음성이라면 우선적으로 비면역성 용혈을 고려해 보아야 하며, 드물지만 비면역성 용혈이 매체가 된다면 IgA, IgM 항체에 의한 면역성 용혈의 가능성을 평가해 보아야 한다^{2,21}.

이처럼 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 통하여 면역성 용혈성빈혈을 진단하는 데 있어서 두 검사가 항상 양성으로 나오는 것이 아니기 때문에 해석이 어렵다. 적혈구에 부착된 항체가 IgG

항체가 아닌 경우는 2-7%가량 되며, 직접항글로불린검사 양성이라도 비예기항체 선별 및 동정검사 또는 항체용출검사에서 음성으로 나오기 때문에 적혈구 부착 항체를 동정할 수 없다¹. 이러한 경우 환자의 증상 및 증후, 그리고 다른 검사 소견들을 종합했을 때 어렵게 진단이 가능하다.

본 연구에서 직접항글로불린검사 및 항체용출검사가 모두 양성으로 나오는 환자는 11명 이었고, 이 가운데 7명이 “엄밀한 기준에 의하여 면역성 용혈성빈혈로 진단”되어 두 검사의 결과의 따른 환자군들 중 면역성 용혈성빈혈의 빈도가 가장 높았다(63.6%). 그리고 이 7명 모두 온난자가항체 또는 혼합형자가항체에 의한 용혈성빈혈이 의심되었다. 이는 자가면역성 용혈성빈혈의 가장 많은 빈도를 차지하는 온난자가항체에 의한 용혈성빈혈의 원인 중 70%가 IgG 항체가기 때문일 것이다¹. 이처럼 직접항글로불린검사가 양성이라면 Pierce 등¹⁰이 제시한 algorithm과 Leger 등⁵이 제시한 내용을 참고하고 비예기항체 선별 및 동정검사와 자가대조, 그리고 항체용출검사 결과를 종합하여 어느 정도 원인 항체를 추정 가능하였다. 여기서 구한 직접 항글로불린검사의 민감도는 75.0%로 항체용출검사의 58.3%보다 더 높아서 직접항글로불린검사만으로도 면역성 용혈성빈혈 환자의 상당 수를 진단할 수 있을 것이다.

반면에 직접항글로불린검사가 양성이었지만 항체용출검사가 음성인 환자가 5명 이었고, 이 가운데 2명이 “엄격한 기준에 의한 면역성 용혈성빈혈의 진단”되어 두 검사의 결과의 따른 환자군들 중 면역성 용혈성빈혈의 빈도가 두 번째로 높았다(40.0%). 이 환자 중 한 명은 한랭응집소병이 의심 되었으며, 다른 한 환자는 선천성매독에 동반된 용혈성빈혈이었다. 통상적으로 선천성 매독에 동반된 용혈성빈혈은 직접항글로불린검사 음성이며²², 드물게 발작성 한랭혈색소뇨증의 보고가 있어 이 질환의 가능성이 의심되었다²³. 또한 환자는 고용량 penicillin을 투여 받고

있었으므로 약제의존성 약제에 의한 용혈성빈혈 가능성도 배제할 수 없었다¹⁰.

그리고 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 음성인 환자가 29명이었고, 이 가운데 3명만이 “임상적으로 면역성 용혈성빈혈로 진단”되고 “검사 결과가 용혈을 시사”하며, 다른 비면역성 용혈성빈혈의 증거를 찾을 수 없어 “엄격한 기준에 의한 면역성 용혈성빈혈의 진단” 가능성이 있다고 판단하였다. 그러나 이 3명 환자들은 IgA, IgM 항체를 검출할 수 있는 추가 검사의 도움을 받아야 면역성 용혈성빈혈의 확진이 가능하다고도 볼 수 있다²¹. Garratty 등은 자가면역성 용혈성빈혈 환자의 5-10%가 직접항글로불린검사 음성이라고 보고하였다²¹. 이렇게 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 음성인 면역성 용혈성빈혈의 비율이 낮은 이유는 그 원인항체가 IgA, IgM 항체인 면역성 용혈성빈혈이 비교적 드물기 때문이다¹. 이 3명의 환자 가운데 1명에서 혈청에서만 anti-M이 동정 되었다. Anti-M은 용혈성 수혈반응을 일으킬 수 있으나, 주로 자연항체(naturally occurring antibodies)이어서 본 환자가 항체발견 이전에 수혈이력이 없었던 점을 설명할 수 있었다.

따라서 용혈성빈혈 사례에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 통하여 용혈의 원인이 무엇인지를 추정할 수 있으며, 특히 직접항글로불린검사의 경우 좀 더 민감하게 면역성 용혈성빈혈을 확인하는 검사로 활용을 할 수 있다. 그러나 두 검사가 모두 음성인 경우도 낮은 비율로 존재 하기 때문에 면역성 용혈성빈혈을 확진 하기 위한 추가 검사의 필요성은 여전히 남아 있다.

본 연구의 한계로는 신생아 환자의 비율이 50% 이상으로 각 의뢰 사유 별로 환자 수의 고른 분포가 되지 않았다는 점이 있다. 그리고 이식 환자의 경우 후향적 연구의 한계로 실제로 임상적으로

면역성 용혈성빈혈을 겪은 환자의 수를 구하지 못했다는 점이 있다. 또한 앞서 밝힌 바와 같이 직접항글로불린검사 음성 면역성 용혈성빈혈의 환자의 경우 보완할 수 있는 추가적인 검사법이 있으나 이를 시행하지 못하였다는 점이다. 그리고 면역성 용혈성빈혈의 주요한 원인 중 하나인 용혈성 수혈반응이 직접적으로 의심되었던 환자가 포함되어 있지 않았다.

그러므로 추후 연구에서는 각 의뢰 사유 별로 좀 더 많은 수의 환자를 대상으로 전향적으로 검체를 수집하여 검사를 진행할 필요가 있으며, 이식 환자의 경우 면역성 용혈성빈혈을 판별하기 위한 총빌리루빈이나 합토클로불린 등의 검사의 진행도 필요할 것이다. 그리고 용혈성빈혈 사례의 조사에 대하여 추가적인 검사로서 다양한 검사법을 도입하여 시행할 필요가 있겠다.

V. 결론

저자는 세브란스병원에서 10년간 의뢰된 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 결과를 정리하여 그 해석과 임상적 의의에 대하여 분석해 보았다. 태아/신생아 용혈성질환의 진단에서 환자의 적혈구가 감작된 강도, 즉 직접항글로불린검사 양성 여부에 따라 실제로 진단된 환자의 비율을 알 수 있었다. 또한 항체용출검사를 통하여 항체의 특이성을 확인할 수 있을 뿐만 아니라 더 민감하게 진단이 가능하기 때문에 직접항글로불린검사와 더불어 시행이 필요하다고 판단하였다. ABO 부적합 조혈모세포 이식의 혈청학적 관찰에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 통하여 이식 후에 수여자 또는 공여자의 적혈구가 감작되는 비율을 알 수 있었으나, 이는 환자의 용혈의 정도와 연관되지 않아 환자가 임상적으로 용혈을 보이는 경우에만 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 시행하는 것에 검사의 의의가 있다고 하겠다. 용혈성빈혈 사례 조사를 위해 검사가 의뢰된 환자들은 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과에 따라 용혈의 원인이 무엇인지를 추정할 수 있었으며, 면역성 용혈성빈혈 환자의 비율을 구할 수 있었다. 또한 직접항글로불린검사는 면역성 용혈성빈혈을 더 민감하게 진단할 수 있으나, 두 검사가 모두 음성인 경우도 낮은 비율로 존재 하기 때문에 면역성 용혈성빈혈을 확진 하기 위한 추가 검사의 필요성을 제기할 수 있었다. 따라서, 직접항글로불린검사와 항체용출검사는 이러한 면역성 용혈성빈혈을 일으키는 질환들에서 그 결과에 따라 임상적 해석을 가능하게 하며, 두 검사를 모두 검사하고 연관하여 해석할 경우 좀 더 유용한 정보를 얻을 수 있었다. 이를 바탕으로 국내에서도 혈액은행에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 활용할 수 있는 기본적 자료로서의 역할을 하며, 추가적인 연구의 필요성도 제기할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. 한규섭, 박경운, 송은영. 면역성 용혈성빈혈에서의 수혈요법. 수혈의학. 4th ed. 서울: 고려의학; 2014. p.145-52.
2. Zantek ND, Koepsell SA, Tharp DR, Jr., Cohn CS. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol* 2012;87:707-9.
3. Yazer MH, Triulzi DJ. The role of the elution in antibody investigations. *Transfusion* 2009;49:2395-9.
4. Heddle NM, Kelton JG, Turchyn KL, Ali MA. Hypergammaglobulinemia can be associated with a positive direct antiglobulin test, a nonreactive eluate, and no evidence of hemolysis. *Transfusion* 1988;28:29-33.
5. Leger RM. The Positive Direct Antiglobulin Test and Immune-Mediated Hemolysis. In: Fung MK, editor. *Technical Manual*. 18th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks; 2014. p.425-45.
6. Domen RE, Grattan J. Efficacy of performing red-cell antibody elutions in patients with a positive direct antiglobulin test. *Vox Sang* 1986;51:324-6.
7. Stec N, Shirey RS, Smith B, Kickler TS, Ness PM. The efficacy of performing red cell elution studies in the pretransfusion testing of patients with positive direct antiglobulin tests. *Transfusion* 1986;26:225-6.
8. Richa E, Benidt G, Tauscher C, Stowers R, Bryant S, Stubbs J. Eluate testing following microscopically positive direct

- antiglobulin tests with anti-IgG. *Ann Clin Lab Sci* 2007;37:167-9.
9. Gehrs BC, Friedberg RC. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 2002;69:258-71.
 10. Pierce A, Nester T. Pathology consultation on drug-induced hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 2011; 136:7-12.
 11. South SF, Rea AE, Tregellas WM. An evaluation of 11 red cell elution procedures. *Transfusion* 1986;26:167-70.
 12. Burin des Roziers N, Squalli S. Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods. *Transfusion* 1997; 37:497-501.
 13. Alvarez A, Rives S, Montoto S, Sanz C, Pereira A. Relative sensitivity of direct antiglobulin test, antibody's elution and flow cytometry in the serologic diagnosis of immune hemolytic transfusion reactions. *Haematologica* 2000; 85:186-8.
 14. 이선호, 오영철, 김기홍, 한규섭, 한복연, 김상인. Glycine Acid EDTA 처리에 의한 항체용출법. *대한수혈학회지* 1993;4:61-6.
 15. Katharia R, Chaudhary RK. Removal of antibodies from red cells: Comparison of three elution methods. *Asian J Transfus Sci* 2013;7:29-32.
 16. Barcellini W. Immune Hemolysis: Diagnosis and Treatment Recommendations. *Semin Hematol* 2015;52:304-12.

17. Desjardins L, Blajchman MA, Chintu C, Gent M, Zipursky A. The spectrum of ABO hemolytic disease of the newborn infant. *J Pediatr* 1979;95:447-9.
18. Yazer MH, Triulzi DJ. Immune hemolysis following ABO-mismatched stem cell or solid organ transplantation. *Curr Opin Hematol* 2007;14:664-70.
19. Bolwell B, Pohlman B, Kalaycio M, Wise K, Goormastic M, Andresen S. LDH elevation after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:53-5.
20. Robertson VM, Dickson LG, Romond EH, Ash RC. Positive antiglobulin tests due to intravenous immunoglobulin in patients who received bone marrow transplant. *Transfusion* 1987;27:28-31.
21. Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol* 2005;42:156-64.
22. Whitaker JA, Sartain P, Shaheedy M. Hematological aspects of congenital syphilis. *J Pediatr* 1965;66:629-36.
23. Rosenblum R, Centnar EJ. Paroxysmal cold hemoglobinuria in treated congenital syphilis. *AMA Arch Intern Med* 1954;93:304-6.

ABSTRACT

The clinical significance of direct antiglobulin tests and antibody elution tests

Hyunjin Nah

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hyun Ok Kim)

Direct antiglobulin test (DAT) is performed to distinguish the patient's immune hemolysis from non-immune hemolysis. Antibody elution test can identify the specificity of antibody from sensitized red cells. We analyzed ten-year experience of DATs and elution tests from 2005 January to 2015 December according to the disease categories for requesting the tests, and evaluated their clinical significance.

Total 1,186 specimens from 536 patients were requested during the period. Results of laboratory tests and clinical diagnosis of the patients were reviewed retrospectively using medical records. Disease categories for requesting DATs and elution tests were hemolytic disease of the fetus/newborn (HDFN), ABO incompatible hematopoietic stem cell transplantations (HP SCTs), ABO incompatible solid organ transplantations (SOTs), and hemolytic anemia episodes. Whether or not the patients had clinically significant hemolysis was evaluated by laboratory findings including hemoglobin, reticulocyte (%), total bilirubin, lactate dehydrogenase, and haptoglobin, along with medical records of the patients. For hemolytic anemia episodes, the unexpected antibody screening and identification were also included. Sensitivity of elution test was higher than DAT in

the patients with HDFN. However, there was no significant difference in severity of hemolysis according to the degree of red cell sensitization. The proportion of the patients who showed both DAT and elution test negative after ABO incompatible HPSTs was highest among four groups. The other groups with either DATs or elution tests were positive did not correlate with laboratory findings of hemolytic events. Whereas in ABO incompatible SOTs, one patients with both DAT and elution test positive showed correlation between their clinical features and laboratory findings and the results of those two tests, but their clinical significance could not be concluded due to few number of the patients requested for this reason. Regarding hemolytic anemia episodes, the number of the patients who diagnosed as immune hemolytic anemia can be evaluated according to the results of DAT, unexpected antibody screening and identification with autologous control, and elution test. The sensitivity of DAT was higher than elution test in these patients.

Therefore, HDFN could be diagnosed more sensitively and specifically when DAT and elution test was performed simultaneously. However, DAT and elution test might be restricted for the patients who had evidences of hemolytic anemia after ABO incompatible HPST, since there was no significant difference in degree of hemolysis according to the results of DAT and elution test. In patients with hemolytic anemia episodes, DATs and elution tests were useful for the diagnosis of immune hemolytic anemia. Although DAT was sensitive for diagnosing immune hemolytic anemia in most of these patients, other tests were still needed to diagnose a few DAT negative cases.

Key Words: Direct antiglobulin test, antibody elution test, immune hemolytic anemia