



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](#)

석사학위논문

HLA class II C3d 검사법의 평가
- 단일항원비드 검사와의 상관관계계명대학교 대학원
의학과

강혜인

강
혜
인

지도교수 이원목

2019년
8월

2019년 8월

HLA class II C3d 검사법의 평가 - 단일항원비드 검사와의 상관관계

지도교수 이 원 목

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2 0 1 9 년 8 월

계 명 대 학 교 대 학 원

의학과 진단검사의학 전공

강 혜 인

강혜인의 석사학위 논문을 인준함

주 심 전 동 석

부 심 이 원 목

부 심 하 정 숙

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 1 9 년 8 월

감사의 글

이 논문을 준비하기까지 많은 가르침과 격려를 주신 이원목 교수님께 진심으로 감사의 마음을 드리며, 논문이 완성되기까지 세밀하게 검토해주시고 지도해주신 전동석 교수님, 류남희 교수님, 하정숙 교수님, 김도훈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

더불어 지금의 제가 있기까지 항상 응원해주시고 믿어주신 사랑하는 부모님과 가족들, 그리고 저에게 늘 힘이 되어주는 사랑하는 남편에게 감사의 마음을 전합니다.

2019년 8월

강 혜 인

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	4
3. 성 적	7
4. 고 찰	19
5. 요 약	23
참고문헌	25
Abstract	32
국문초록	34

List of Figures

- Figure 1. The numbers of antibodies identified by SAB correlated with those of C3d assay in SAB positive samples. 10
- Figure 2. Distribution of the number of antibodies identified by SAB or C3d assay. 11
- Figure 3. Distribution pattern of the MFI values of antibodies identified by SAB or C3d assay. 12
- Figure 4. Distribution of the number of C3d (-) and C3d (+) antibodies identified by SAB assay. 13
- Figure 5. Distribution of the number of SAB (-) and SAB (+) antibodies identified by C3d assay. 14
- Figure 6. The MFI values of antibodies identified by SAB correlated with those of C3d assay in SAB positive samples. 15
- Figure 7. Distribution pattern of the MFI values of antibodies identified by SAB or C3d assay of DSAs. 16
- Figure 8. Distribution of the number of C3d (-) and C3d (+) antibodies identified by SAB assay of DSAs. 17
- Figure 9. Distribution of the number of SAB (-) and SAB (+) antibodies identified by C3d assay of DSAs. 18

1. 서 론

주조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC)는 자기와 비자기를 구분할 수 있도록 T세포 표면에 외부항원을 제시하는 당단백 분자이다(1). MHC는 자기 및 비자기의 인지, 항원자극에 대한 면역반응 등에 관여하므로 동종인식에 중요한 역할을 한다(2). 사람의 MHC 유전자군은 6번 염색체 단완에 위치하며(3), 사람의 MHC를 사람백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA)이라 한다.

HLA는 종류가 매우 다양하며 장기이식, 임신, 수혈 등의 과정을 통해 다른 사람의 장기나 세포에 노출되어 동종면역이 일어나면 HLA 항체가 생성될 수 있다. 그러나 어떠한 종류의 항원에 대한 항체가 생겼는지 알 수 없기 때문에 생성되는 항체를 예측할 수 없다. HLA 항체는 공여자의 장기에 대한 체액성 면역반응을 유도하여 항체매개성 거부반응(antibody-mediated rejection, ABMR)을 유발하는데, 이는 세포성 거부반응에 비해 훨씬 치명적이고 치료가 어렵기 때문에 예후가 불량하다(4,5). 이처럼 동종항체는 장기이식에서 큰 장애물이 될 수 있기 때문에 이식 전 공여자 선택을 위해 사전에 공여자 HLA에 대한 항체 유무를 확인하는 것이 중요하고 이식 후의 급성 또는 만성 거부반응을 예측하기 위해서도 HLA 항체에 대한 주기적인 추적 검사가 필요하다(6,7).

수혜자의 HLA 항체 존재 여부를 확인하는 검사에는 패널반응항체(panel reactive antibody, PRA) 검사와 교차시험이 있다. PRA 검사는 환자가 속해있는 인종 또는 집단의 HLA 빈도를 고려한 항원 패널을 이용하여 혈청 내의 HLA 항체를 검출 및 동정하는 방법이고, 교차시험은 공여자의 항원과 수혜자의 혈청을 반응시켜 특정 공여자의 림프구와 반응하는 특이적인 HLA 항체가 존재하는지를 확인하는 검사이다. 교차시험은 1968년 Terasaki 등에 의해 개발된 보체의존성 림프구독성(complement dependent cytotoxicity, CDC) 방법(8)이 40여 년간 표준 검사법으로 이용되어 왔으며, 검사의 민감도를 높이기 위해 항온시간을 연장하거나 항인글로불린을 추가

하는 방법 등의 변형된 CDC 방법도 이용되고 있다. 유세포 교차시험(flow cytometry cross-matching, FCXM) 방법은 1980년대에 개발되어 최근에 사용이 증가되고 있는데, 기존의 CDC 방법보다 최대 50배 민감하여 CDC 방법으로 검출하지 못하는 낮은 역가의 공여자 특이항체도 검출이 가능하다(9). 그러나 교차시험은 검사 방법에 따라 다양한 민감도를 보이고, HLA 항체 외에 공여자의 림프구와 반응하는 다른 항체도 검출될 수 있으며, 특정 HLA 항원에 대한 항체 여부를 확인할 수 없고, 검사방법의 표준화가 어렵다는 단점이 있다(10).

한편, PRA 검사법 중 림프구를 대상으로 하여 CDC 방법으로 항체를 검출하는 cell-based PRA 검사는 림프구 패널을 자가 제조하는 경우 HLA 형별을 알고 있는 다수의 림프구 공여자가 필요하고, 패널의 냉동 및 해동 시 세포의 생존도를 유지해야 하는 어려움이 있다. 또한 림프구에 표현된 비 HLA 항원에 의해 비특이적인 반응을 보일 수 있고 검사실간 검사방법과 판독의 표준화가 어렵다는 단점이 있다. Solid phase-based 방법에는 1) microplate에 부착된 HLA 항원을 효소결합면역흡착측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 확인하는 ELISA-PRA, 2) flowbeads를 이용하여 유세포분석기로 검출하는 Flow-PRA, 그리고 3) Luminex-beads를 이용하여 Luminex 장비로 검출하는 Luminex-PRA 등이 있다. Solid phase-based PRA 방법은 추출한 HLA 항원을 이용하므로 비 HLA 항체에 의한 위양성을 배제할 수 있고, 림프구를 이용한 방법에 비해 민감도가 높으며, 상품화된 시약을 이용할 수 있는 장점이 있어 국내 검사실에서는 최근 Luminex 기술을 이용한 PRA 방법이 주로 사용되고 있다(11-13). Luminex-PRA는 유세포분석법과 유사한 원리를 이용하여 항체를 검출하기 때문에 높은 민감도를 보인다. 특히 하나의 비드에 한 종류만의 재조합 HLA를 코팅한 단일항원비드(single antigen bead, SAB)를 사용한 단일항원검사법은 직접 항체특이성을 동정할 수 있어 임상적으로 의미 있는 항체, 특히 공여자특이항체(donor-specific antibody, DSA) 동정에 도움이 된다. 그러나 최근 solid phase-based 방법을 이용한 검사에서 DSA 존재 여부가 이식 후 거부반응 또는 생존율과 큰 상관성을 보이지 않는다는 보고들이

있었다(14,15). 이는 이러한 solid phase-based 방법이 실제 면역반응에서 보체를 활성화시키지 않는 HLA 항체까지 모두 검출하기 때문인 것으로 생각되어(16,17) 이를 보완하여 보체 활성화를 유발시키는 항체인지를 규명하는 검사법이 개발되었다(18,19).

보체 활성화를 유발하는 HLA 항체를 검출할 수 있는 Luminex 검사법은 두 가지로, Immucor사(Immucor Transplant Diagnostics, Norcross, GA, USA)의 항체에 결합한 보체 C3d를 검출하는 방법 C3d Detection kit(Immucor Transplant Diagnostics)와 One Lambda사의 보체 C1q를 검출하는 C1q screen(One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA)이 있다. C1q 검사는 Luminex의 SAB를 환자의 혈청과 반응시킬 때 정제된 C1q 보체를 첨가하여, 형광이 부착된 항 C1q 항체와 반응시켜 HLA 항체 중 C1q가 결합하는 HLA 항체를 검출하는 검사법이다(20,21).

한편, C3d는 보체 C3의 최종 분해산물로(22), 이를 이용한 검사도 마찬가지로 SAB와 환자의 혈청을 반응시킬 때 C3d 보체를 첨가하여 이에 결합하는 항체를 검출해낸다. 이 검사들은 항원-항체 복합체에 결합한 보체를 선택적으로 찾아내어 이식 이후의 거부반응을 예측하는 지표가 될 수 있다(23). 따라서 보체를 이용한 새로운 검사법을 기존의 방법과 비교하는 연구들이 진행되고 있다(23-25). 이들 중 C1q를 이용한 방법이 먼저 연구되었으며(26) 이후에 개발된 C3d를 이용한 검사법이 연구되고 있으나(23,27-29) 현재까지 class II 항원을 이용한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 기존 단일항원검사법에서 class II HLA 항체가 검출된 환자들을 대상으로 C3d 검사를 시행하여 두 검사를 비교하고자 하였고, 그 중 DSA로 확인된 항체만을 선별하여 추가로 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 대상:

계명대학교 동산병원에서 2015년 4월부터 2018년 9월까지 HLA 항체 검사를 위해 검사실로 의뢰된 검체 중 class II 단일항원검사(LIFECODES LSA Single Antigen kit, Immucor Transplant Diagnostics)에서 양성인 총 80개의 혈액 검체를 선별하였다. 선별된 검체 중 DSA가 확인되지 않은 14개는 제외하고 DSA 양성인 66개의 검체를 대상으로 하였다.

정규 검사 후 -80°C 냉동고에 보관되어있던 66개의 검체를 대상으로 C3d Detection kit(Immucor Transplant Diagnostics)를 이용하여 class II C3d 검사를 시행하여 평행 검사를 진행하였다. 이 연구와 관련된 자료 수집 및 분석은 계명대학교 동산병원 기관윤리심의위원(Institutional Review Board, IRB No. DSMC 2019-03-002)의 승인 하에 시행되었다.

2.2. 방법:

2.2.1. 단일항원검사법

Plate의 각 well에 40 μL 의 LSA 비드를 첨가한 후, 10 μL 의 환자 혈청과 대조혈청을 분주하고 혼합하였다. Adhesive plastic cover로 plate를 덮고 호일 또는 상자를 이용하여 빛을 차단한 후 실온에서 30분간 배양하였다. 이후 cover를 제거하고 각 well에 100 μL 의 wash buffer를 첨가하여 비드를 재부유시키기 위해 혼합하고 plate를 부드럽게 흡인하는 과정을 3회 반복하였다. 각 well에 50 μL 의 diluted conjugate를 첨가하고 빛을 차단한 후 실온에서 30분간 배양하였다. 150 μL 의 wash buffer를 각 well에 분주 후 비드를 재부유시키기 위해 혼합하였다. Luminex 장비(Luminex[®] 200[™], Luminex Corp., Austin, TX, USA)를 이용해서 각 비드의 신호 강도를 측

정하여 MATCH IT! Antibody v1.3.1.5(Immucor Transplant Diagnostics)로 분석하였다. 각각의 비드별로 얻어진 median fluorescent intensity(MFI) 값을 이용하여 보정값을 구했다. 다음 3개의 보정값 중에서 두 개 이상의 adjusted(ADJ) MFI 값이 “Suggested Cutoff”보다 높은 경우 양성으로 판정하였다: 1) ADJ1 = raw MFI 값에서 background(BG) MFI 값을 뺀 값; 2) ADJ2 = ADJ1값을 locus “1”에서 가장 낮게 반응한 비드의 raw MFI 값으로 나눈 값; 3) ADJ3 = ADJ2값을 항원 밀도의 상대량으로 나눈 값.

2.2.2. C3d 검사법

40 μ L의 LSA 비드와 1 μ L의 양성대조 비드를 혼합한 후 plate의 각 well에 40 μ L의 mix와 10 μ L의 혈청을 분주하였다. Adhesive plastic cover로 plate를 덮고 호일 또는 상자를 이용하여 빛을 차단한 후 실온에서 30분간 배양하였다. 이후 cover를 제거하고 각 well에 30 μ L의 C3d 보체 혈청을 분주하였다. 다시 cover로 plate를 덮고 빛을 차단한 후 실온에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝나면 각 well에 100 μ L의 washing buffer를 분주하고 섞은 다음 부드럽게 흡인하는 과정을 4회 반복하였다. 각 well에 C3d conjugate를 50 μ L씩 분주하고, 빛을 차단한 후 실온에서 30분간 배양하였다. 그 후 각 well에 100 μ L의 washing buffer를 분주하고 혼합한 다음 흡인하고, 다시 분주하여 혼합하였다. Luminex 장비를 이용해서 각 비드의 신호 강도를 측정하여 MATCH IT! Antibody 프로그램으로 분석하였다. 다음 3개의 보정값 중에서 하나 이상에서 양성수치를 보이는 경우 양성으로 판정하였다: 1) BG Adjusted MFI = 얻어진 MFI 값에서 음성대조혈청 MFI 값을 뺀 값; 2) BCR-Neg = BG Adjusted MFI를 해당 locus의 가장 낮게 반응한 bead의 raw MFI 값으로 나눈 값; 3) R-Strength = BG Adjusted MFI를 항원의 raw MFI 값으로 나눈 값.

2.2.3. 통계 및 자료분석

MATCH IT! Antibody 프로그램을 통해 각 검체를 단일항원검사법과 C3d 검사법으로 분석한 HLA 항체 종류, MFI 값, 양성여부를 수집하였다.

단일항원검사법은 raw MFI 값에서 BG MFI 값을 뺀 BG corrected MFI 값을 기준으로 하였고, C3d 검사법은 raw MFI 값에서 음성대조혈청의 MFI 값을 뺀 BG Adjusted MFI 값을 기준으로 하였다.

각 검체마다 단일항원검사와 C3d 검사의 총 항체 개수, 항체의 MFI 값과 그에 따른 항체 개수, 단일항원검사의 MFI 값에 따른 C3d 검사 양성여부, 반대로 C3d 검사의 MFI 값에 따른 단일항원검사 양성여부, DSA만의 MFI 값에 따른 항체 개수, 그리고 단일항원검사와 C3d 검사 MFI 값의 상관관계를 분석하였다. 통계처리는 Microsoft Office Excel 2016(Microsoft Co., Redmond, WA, USA)을 이용하였고, Analyse-it Software v5.20(Analyse-it Software, Ltd., Leeds, UK)을 이용하여 상관분석을 시행하였다.

3. 성 적

3.1. 전체 항체를 대상으로 한 항체 수 및 MFI 값 분포:

3.1.1. 단일항원검사와 C3d 검사의 항체 수

전체 검체 중 DSA 양성인 검체는 66예였고, 각 검체는 1개에서 48개의 항체를 가지고 있었고 중간값은 12.5개였다. 그 중 52예가 C3d 검사 양성이었다고 1개에서 26개의 항체를 가지며 중간값은 4개였다. 단일항원검사와 C3d 검사에서 각각 996개와 442개의 항체가 양성이었다. 단일항원검사와 C3d 검사에서 확인된 항체수의 피어슨 상관계수는 0.735로 양의 상관관계를 나타냈다(Figure 1). 각 검사별 항체 수는 단일항원검사에서 항체수가 11-20개인 구간에서 24개(36.4%)로 가장 많았고, C3d 검사에서는 항체수가 2-5개인 구간에서 23개(34.8%)로 가장 많았다(Figure 2).

3.1.2. 단일항원검사와 C3d 검사의 MFI 값

단일항원검사의 항체는 MFI 값이 $1,001 \leq \text{MFI} \leq 20,000$ 인 구간에 802개(80.7%)가 속한 반면, C3d 검사는 $\text{MFI} \leq 500$ 인 구간과 $1,001 \leq \text{MFI} \leq 10,000$ 인 구간에 299개(67.6%)의 항체가 속했다(Figure 3).

3.1.3. 단일항원검사와 C3d 검사의 비교

단일항원검사에서 양성인 항체 중에서 $\text{MFI} \leq 3,000$ 인 항체 440개 중 28개(6.4%)만이 C3d 검사 양성이었다고, $\text{MFI} \geq 3,001$ 인 항체 556개 중 341개(61.3%)가 C3d 검사 양성이었다(Figure 4). 반면, C3d 검사에서 양성인 항체 중에서는 $\text{MFI} \leq 500$, $1,001 \leq \text{MFI} \leq 10,000$ 인 구간에서 각각 32개(49.2%), 41개(25.5%)를 제외하고는 모두 단일항원검사도 양성이었다(Figure 5). 단일항원검사와 C3d 검사의 MFI 값 사이의 피어슨 상관계수는 0.434였다(Figure 6). 한편, 단일항원검사에서 음성이었으나 C3d 검사 양성

인 항체는 26종, 총 73개였다. 이들의 MFI 값은 98부터 9,710까지였으며 평균값은 2,062, 중간값은 1,817이었다. 이에 해당하는 항체의 종류는 DRB1*03:02, DRB1*04:02, DRB1*04:03, DRB1*10:01, DRB1*13:03, DRB1*14:01, DRB1*14:04, DRB1*15:03, DRB3*01:01, DRB4*01:01, DQB1*03:01/DQA1*06:01, DQB1*03:02/DQA1*03:01, DQB1*03:02/DQA1*03:02, DQB1*03:03/DQA1*04:01, DQB1*03:03/DQA1*06:01, DQB1*04:01/DQA1*02:01, DQB1*04:02/DQA1*06:01, DQB1*06:02/DQA1*01:02, DPB1*01:01/DPA1*01:03, DPB1*01:01/DPA1*02:02, DPB1*03:01/DPA1*01:03, DPB1*05:01/DPA1*02:01, DPB1*05:01/DPA1*02:01, DPB1*05:01/DPA1*02:02, DPB1*05:01/DPA1*02:02, DPB1*17:01/DPA1*02:01 이었다. 반대로, SAB 양성이나 C3d 검사 음성인 항체는 총 92종, 627개로 63.1%를 차지했다. 이들의 MFI 값은 86부터 14,888까지였으며 평균값은 3,207, 중간값은 1,935였다.

3.2 DSA를 대상으로 한 항체 수 및 MFI 값 분포:

3.2.1. 단일항원검사와 C3d 검사의 항체 수

전체 항체 중 DSA는 총 181개였다. 그 중 단일항원검사 양성인 항체는 178개, C3d 검사 양성인 항체는 78개였다.

3.2.2. 단일항원검사와 C3d 검사의 MFI 값

단일항원검사의 항체는 MFI 값이 $1,001 \leq \text{MFI} \leq 10,000$ 인 구간에 113개(62.4%)가 속한 반면, C3d 검사는 $\text{MFI} \leq 500$ 인 구간에 106개(58.6%)의 항체가 속했다(Figure 7).

단일항원검사의 MFI 값의 분포를 전체 항체 996개를 대상으로 했을 때와 비교해보면 $\text{MFI} \leq 500$ 인 구간에서 각각 12개(6.6%)와 55개(5.5%), $501 \leq$

MFI \leq 1,000인 구간에서 각각 20개(11.0%)와 117개(11.7%), 1,001 \leq MFI \leq 3,000인 구간에서 각각 52개(28.7%)와 268개(26.9%), 3,001 \leq MFI \leq 10,000인 구간에서 각각 61개(34.2%)와 291개(29.2%), 10,001 \leq MFI \leq 20,000인 구간에서 각각 29개(16.0%)와 243개(24.4%), 20,001 \leq MFI \leq 30,000인 구간에서 각각 7개(3.9%)와 22개(2.2%)로 비슷한 분포를 보였다 (Figure 3&7).

3.2.3. 단일항원검사와 C3d 검사의 비교

단일항원검사에서 양성인 항체 중에서 MFI \leq 3,000인 항체 84개 중 10개 (11.9%)만이 C3d 검사 양성이었다고, MFI \geq 3,001인 항체 97개 중 68개 (70.1%)가 C3d 검사 양성이었다(Figure 8). 반면, C3d 검사에서 양성인 항체 중에서는 1,001 \leq MFI \leq 3,000, 3,001 \leq MFI \leq 10,000인 구간에서 각각 2개(1.1%), 1개(0.6%)를 제외하고는 모두 단일항원검사도 양성이었다 (Figure 9). 한편, 단일항원검사에서 음성이었으나 C3d 검사 양성인 항체는 1종, 총 3개로 0.6%였다. 이들의 MFI 값은 2,027부터 3,760까지였으며 평균 값은 2,722, 중간값은 2,379였다. 이에 해당하는 항체의 종류는 DRB3*01:01이었다. 반대로, SAB 양성이나 C3d 검사 음성인 항체는 총 42종, 103개로 56.9%를 차지했다. 이들의 MFI 값은 206부터 8,505까지였으며 평균값은 2,488, 중간값은 1,591이었다.

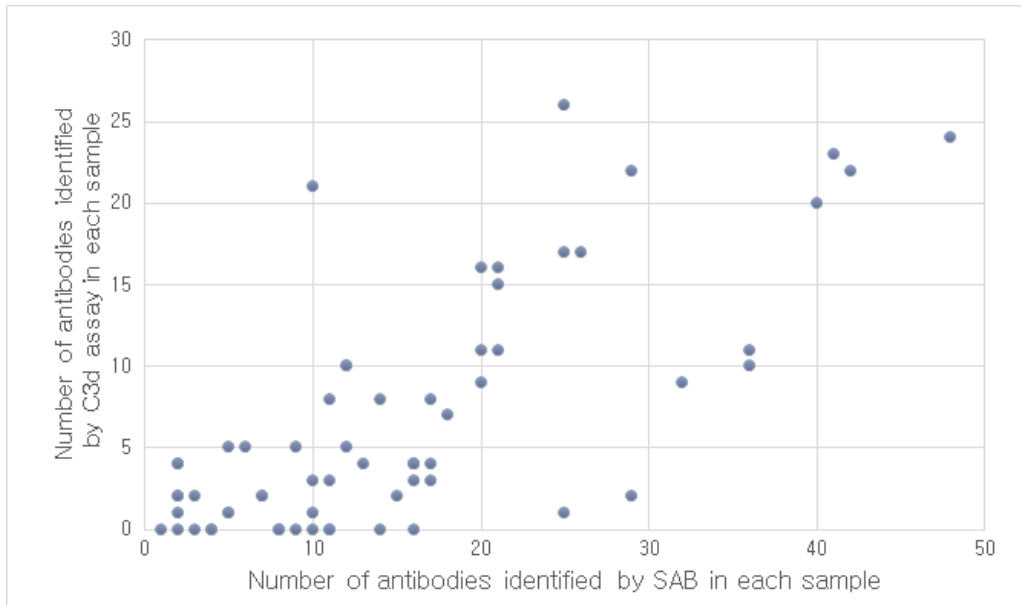


Figure 1. The number of antibodies identified by SAB correlated with those of C3d assay in SAB positive samples. Pearson's r was 0.735. SAB: single antigen bead.

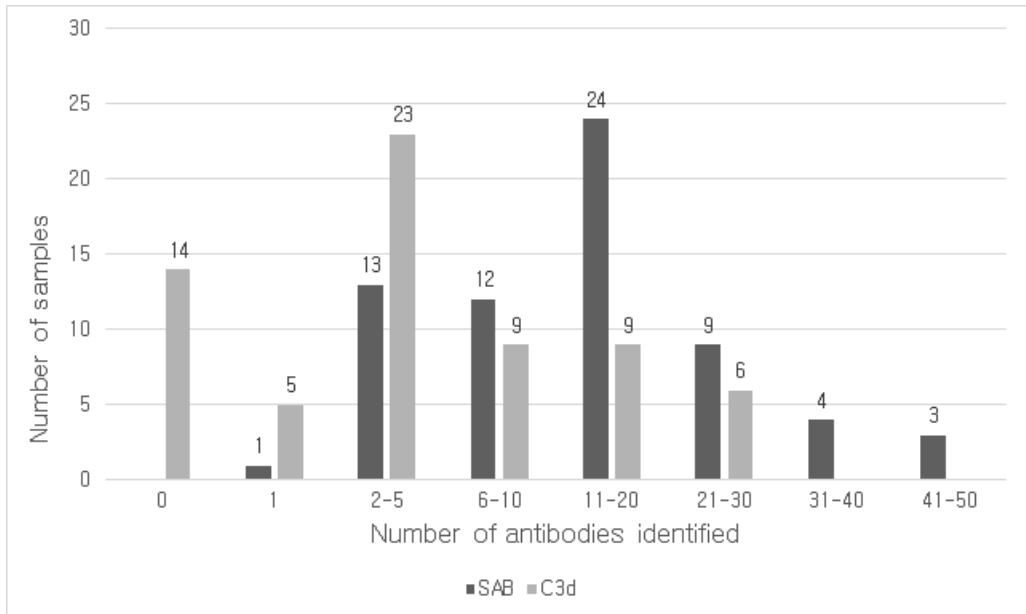


Figure 2. Distribution of the number of antibodies identified by SAB or C3d assay. SAB: single antigen bead.

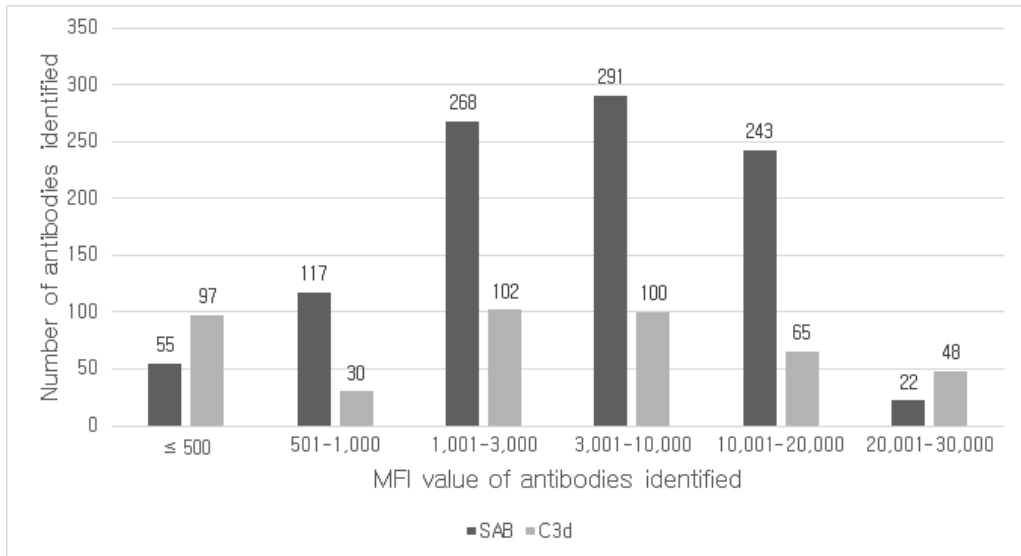


Figure 3. Distribution pattern of the MFI value of antibodies identified by SAB or C3d assay. MFI: median fluorescent intensity; SAB: single antigen bead.

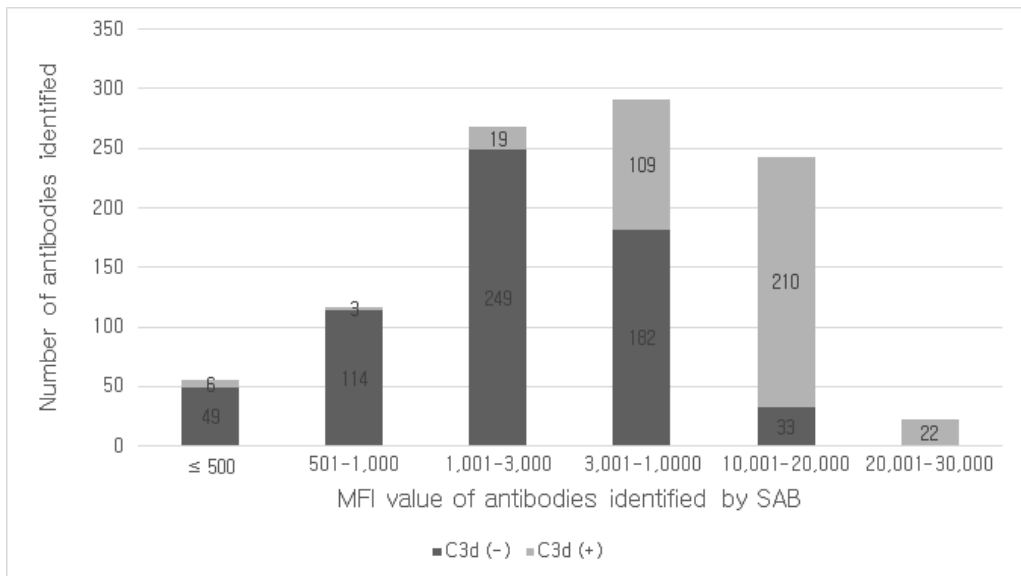


Figure 4. Distribution of the number of C3d (-) and C3d (+) antibodies identified by SAB assay. MFI: median fluorescent intensity; SAB: single antigen bead.

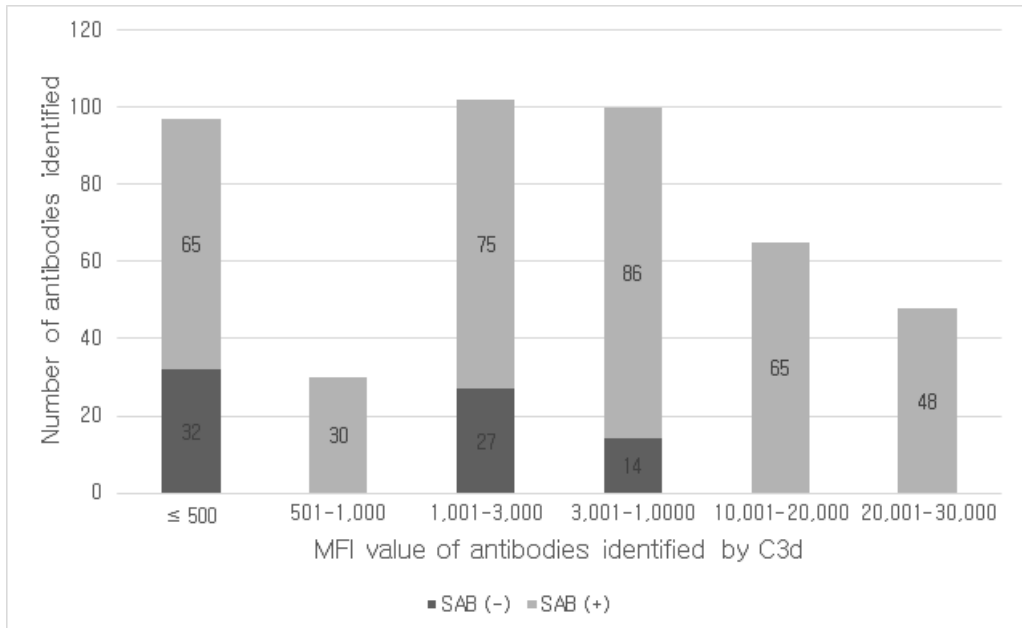


Figure 5. Distribution of the number of SAB (-) and SAB (+) antibodies identified by C3d assay. MFI: median fluorescent intensity; SAB: single antigen bead.

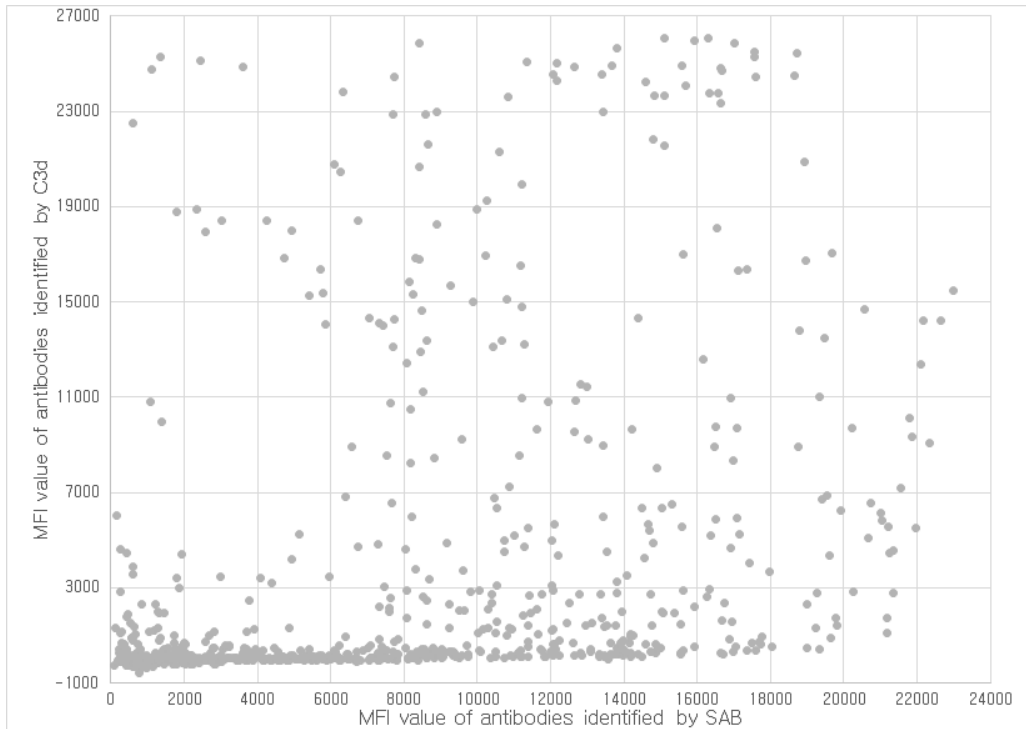


Figure 6. The MFI value of antibodies identified by SAB correlated with those of C3d assay in SAB positive samples. Pearson's r was 0.434. MFI: median fluorescent intensity; SAB: single antigen bead.

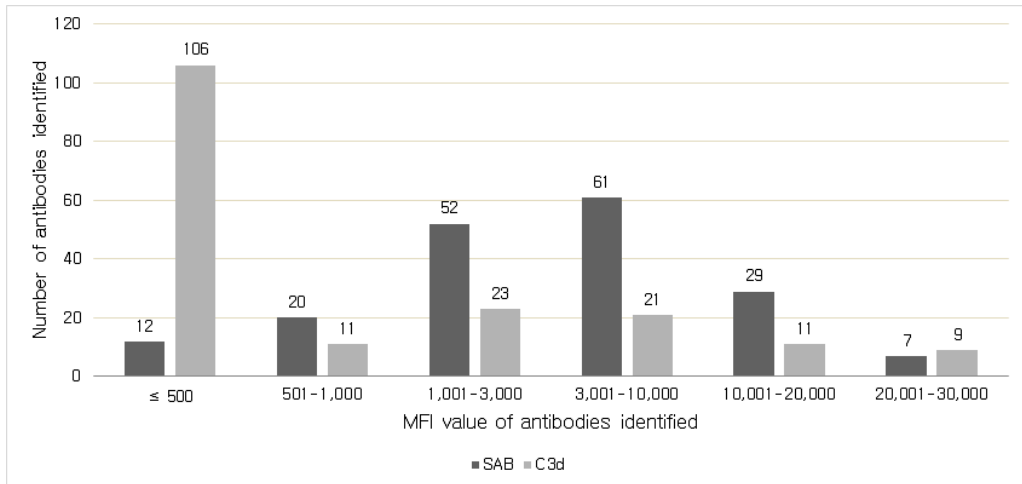


Figure 7. Distribution pattern of the MFI value of antibodies identified by SAB or C3d assay of DSAs. MFI: median fluorescent intensity; SAB: single antigen bead; DSA: donor-specific antibody.

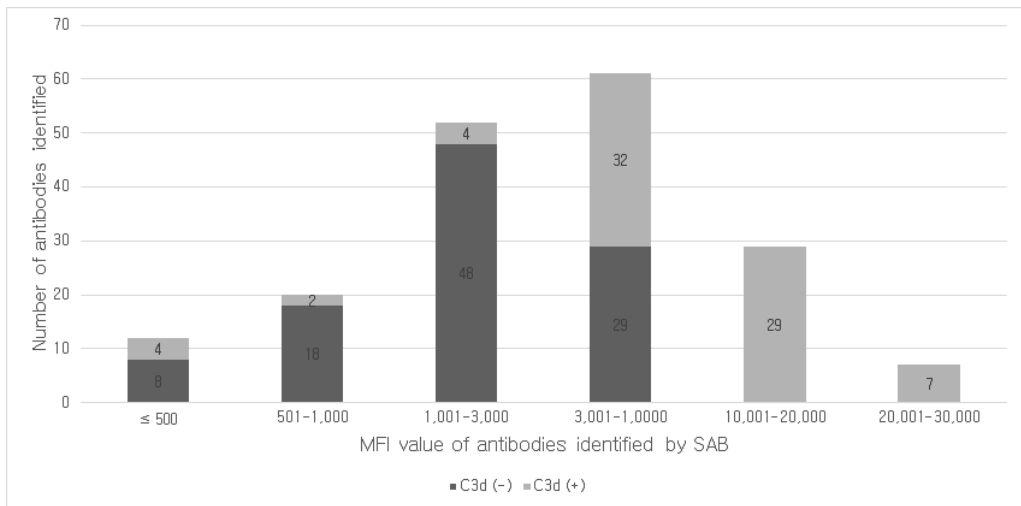


Figure 8. Distribution of the number of C3d (-) and C3d (+) antibodies identified by SAB assay of DSAs. MFI: median fluorescent intensity; SAB: single antigen bead; DSA: donor-specific antibody.

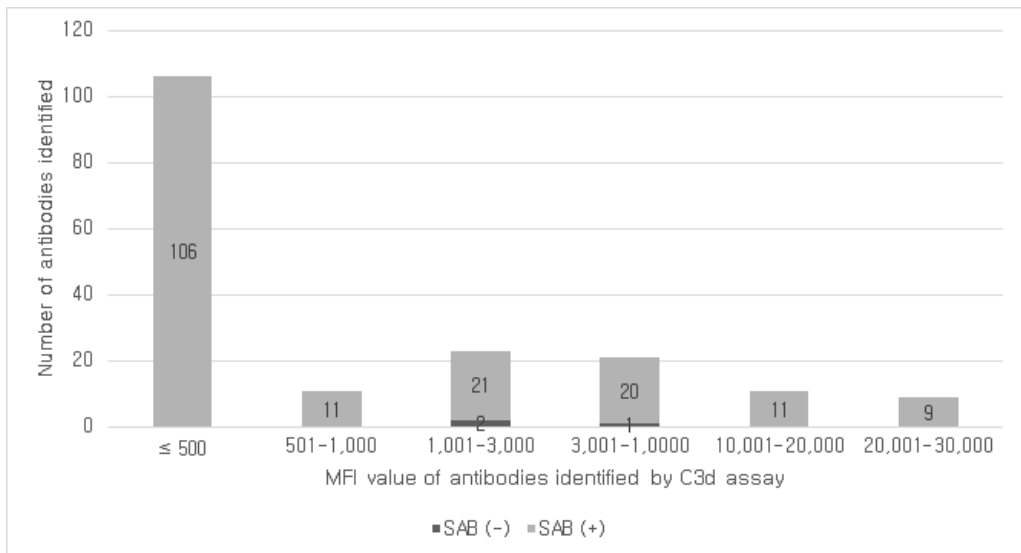


Figure 9. Distribution of the number of SAB (-) and SAB (+) antibodies identified by C3d assay of DSAs. MFI: median fluorescent intensity; SAB: single antigen bead; DSA: donor-specific antibody.

4. 고 찰

과거 CDC 검사법으로 하던 PRA 검사 대신 단일항원비드 Luminex PRA 검사를 이용함으로써 이전보다 더 정확하고 민감하게 HLA 항체를 검출할 수 있게 되었다(24). 또한 Luminex PRA 검사는 100여 종류의 비드로부터 다량의 결과를 3-6시간 내의 빠른 시간 안에 얻을 수 있다는 장점이 있다(30). Solid phase-based PRA 검사법은 추출한 HLA 항원을 사용하기 때문에 비 HLA로 인한 위양성은 줄일 수 있으나(13), 그 중 비드를 이용하는 방법은 비드를 정제하고 코팅하는 과정에서 cryptic epitope을 드러내는 구조적인 변화를 일으킴으로써 임상적으로 무관한 항체까지도 결합시킬 가능성이 있다(31). 어떤 연구에 따르면, 자연항체 중 일부는 비드에 있는 HLA class I 분자와는 반응하지만 살아있는 세포에 있는 자연항원과는 반응하지 않았다. 그리고 이 항체들은 HLA 항원의 해리된 구조에서만 결합 가능한 epitope에 대한 항체인 것으로 생각되었다(32,33). 변성된 HLA(denatured HLA)라고 불리는 이 분자들은 HLA 분자 추출, 정제, 또는 비드에 붙이는 과정에서 생성될 수 있다. 단일항원검사법과 살아있는 세포의 유세포분석 교차시험의 비교를 통해 특정 class II 항 HLA 항체들의 표적이 비드에만 존재하는 epitope이라는 것을 확인한 연구도 있었다(34). 국내에서 주로 사용되는 LIFECODES LSA Single Antigen kit로 denatured HLA class II antibody에 대한 항체를 실험한 한 연구에서는 각막이식 환자 1예에서 HLA 항체를 알기 위해 시행한 PRA 선별 검사 상 class II 동정검사와 FCXM에서는 음성이었으나 단일항원검사법에서 양성을 보임을 확인하였다(35). 결과의 차이가 생긴 이유는 변성된 항원 때문일 수도 있지만 다른 요인들도 배제할 수는 없었다. 그러나 결과적으로 장기이식 환자에서 위양성으로 인한 부적절한 면역억제치료와 불필요한 장벽을 예방하기 위해서는 다른 PRA 검사 결과와 종합하여 볼 필요가 있다.

반대로, 단일항원검사법에서 위음성을 나타내는 요인도 있다. 역가가 매우 높은 항체는 훅 효과(hook effect)라고도 불리는 프로존 효과(prozone

effect)를 보인다. 이 효과는 인식되지 못한 경우에 높은 역가의 항체가 검출되지 못하거나 매우 약하게 검출된다. 이 때 1:10으로 희석하면 높은 역가의 항체는 HLA 항원과 반응하게 되고(36), EDTA를 첨가하면 위음성을 피할 수 있다(37).

현재의 ABMR 진단은 Banff 2017 ABMR 진단기준을 따르고 있는데, 1) 급성조직손상에 대한 병리학적 소견, 2) 혈관내피세포에 대한 항체의 현재 또는 최근 결합을 뒷받침할 수 있는 소견, 3) 혈청 내 DSA 소견을 모두 만족하여야 한다(38). 이 중 2)에 해당하는 소견은 세관주위모세혈관에의 C4d 침착인데, 최근의 연구에서는 C4d 침착보다 혈청 내 DSA 양성 여부가 생존율에 더 큰 영향을 미친다는 보고가 있었다(39,40). 또한 HLA 항체 검사법 중 보체 C1q를 이용한 방법으로 DSA를 검출하여 ABMR과 생존율을 후향적으로 분석한 결과, C4d 침착 여부나 IgG DSA에 관계없이 보체로 검출한 DSA가 존재할 경우 급성 및 만성 거부반응 발생률과 양의 상관관계가 있었다. 반면, C4d 양성인 환자와 음성인 환자에서 신장이식 이후 5년 생존율은 큰 차이가 없었다(41). C4d 침착을 확인하기 위해서는 조직검사가 필요하지만 DSA 검출은 말초혈액 채혈로 가능하기 때문에 훨씬 용이하다는 이점을 고려했을 때 DSA에 대한 연구가 더욱 중요하게 생각된다.

어느 정도까지 낮은 수준의 DSA가 임상적으로 중요성을 가지는지에 대해서는 아직 명확한 기준이 없으나(42), 낮은 역가의 DSA도 이식장기의 거부반응과 연관이 있다는 보고들이 있다(43,44). 다양한 검사 및 지표를 이용한 이전의 연구들에서 DSA 강도는 HLA 항체 양을 반영하는 것으로 보고하였고, DSA 강도가 이식 후 이식장기의 생존율과 상관관계를 보인다는 보고들이 있었다(45,46). 그러나 Luminex-PRA로만 검출되는 약한 강도의 DSA의 경우 아직 임상적 의미가 명확하지 않다. 낮은 역가의 DSA는 임상적 거부반응의 발생 및 이식장기의 예후와 연관이 있다는 보고도 있으나(43,44,47), 몇몇 연구에서는 약한 DSA는 임상적인 의미가 떨어진다고 보고 지나치게 민감한 검사로 인해 환자가 이식을 받을 수 있는 기회가 줄어들게 되며, PRA 양성결과로 인해 고위험군으로 간주되어 불필요한 치료와 검사를 받게 되는 문제점에 대한 우려를 제기하고 있다(14,15). 따라서 향후

약한 DSA와 장기이식 환자의 임상 경과 사이의 상관관계에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. DSA 측정은 DSA 강도에 따른 임상적 위험성을 평가하는데 유용할 뿐 아니라 이미 DSA를 가지고 있는 환자의 추적 관찰에도 도움이 될 수 있다. 이전에는 DSA 양성 및 HLA 교차시험 양성은 신장이식의 금기로 간주되어 왔으나, 최근에는 DSA가 존재하더라도 혈장 교환술 및 rituximab 투여 등 다양한 탈감작치료 후 성공적인 신장이식을 시행하고 있다. 이러한 탈감작치료 후 추적관찰을 할 때 FCXM의 MFI ratio 및 Luminex-PRA의 MFI 값은 혈중 DSA의 역가를 반영하는 좋은 지표가 될 수 있을 것이라고 생각된다(48).

DSA가 ABMR의 진단과 이후 치료에 중요하게 생각되는 요인인 만큼 DSA를 정확하고 빠르게 파악하는 것이 중요하다. DSA의 임상적 중요성이 거론되면서 항체의 강도, 항체의 종류, 항원결정기, 대립유전자, 염기서열 분석 및 새로운 검사법과 검사법 간 비교 등에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있다(23,25,27-29,31,32,41). 그 중 단일항원검사와 C1q, C3d 보체를 이용한 검사를 CDC 검사법과 비교한 한 연구에서는 단일항원검사가 혈청학적으로 가장 높은 일치도를 보였다. 또한 단일항원검사에서 MFI 값이 5,000에서 10,000 사이일 경우 보체결합검사에서는 대부분의 항체가 검출되지 못했지만, 10,000보다 클 경우에 C1q와 C3d 보체검사의 민감도가 높은 것으로 나타났다(23). 단일항원검사법과 C3d 검사법에서의 HLA class I 항체를 비교하기 위해 시행한 다른 연구에 의하면 C3d 검사 양성 검체가 C3d 검사 음성 검체보다 단일항원검사의 최대 MFI 값이 큰 것으로 나타났다. 그리고 단일항원검사의 MFI 값은 C3d의 양성여부와 상관관계를 보였다(28).

본 연구는 처음으로 단일항원검사법과 C3d 검사법에서 HLA class II 항체를 비교한 것으로, 단일 기관에서 시행된 66예의 검체를 분석하였다. 그 결과 앞선 연구와 같이 C3d 검사 양성 검체가 C3d 검사 음성 검체보다 단일항원비드의 최대 MFI 값이 더 컸으며 단일항원비드의 MFI 값은 C3d의 양성여부와 상관관계를 나타냈다. 이는 MFI 값이 C3d 검사 양성여부의 강력한 예측인자라는 기존의 보고와 일치한다(29). 하지만 단일항원검사와

C3d의 양성여부 또는 MFI 값의 크기는 위에서 언급한 바와 같이 상관관계를 보이지 않는 경우도 있었다. 특히 단일항원검사에서 양성이지만 C3d 검사에서 음성인 항체가 63.1%였다. C3d 검사법은 면역반응에서 활성화되는 보체를 이용한 검사법이므로 실제 면역반응에 관여하는 HLA 항체만을 검출한다. 따라서 이전에 단일항원검사에서 실제로 면역반응에 관여하지 않지만 양성으로 검출되었던 항체들이 음성으로 나왔을 것이라 예상해볼 수 있었다. 그러나 이를 증명할 수는 없었기에 추후 이에 대한 추가적인 검증이 필요하다. 반대로 단일항원검사에서 음성이지만 C3d 검사에서 양성으로 검출된 항체는 항체 자체의 특성 때문에 기존 방법으로 찾아내지 못했던 항체를 찾을 수 있어서 유용하다고 생각하였으나 이에 대한 원인은 아직 밝혀지지 않았다. 또한 이번 연구에서는 이식 후 환자의 임상 양상에 대해서는 분석하지 못하였기에 단일항원검사 결과가 위양성 또는 위음성이었을 경우 그 결과가 환자의 생존률에 어떠한 영향을 미쳤는지는 알 수 없었다는 한계가 있다. 이러한 한계점을 보완하기 위해서는 단일항원검사와 C3d 검사 결과를 임상양상과 종합하여 파악하는 연구가 지속되어야 할 것이다.

DSA 181개만을 분석해봤을 때에도 마찬가지로 단일항원검사에서 양성이지만 C3d 검사에서 음성인 항체는 56.9%로 상당수가 존재했다. DSA가 환자의 치료와 임상 결과에 미치는 영향이 크기 때문에 C3d 검사법을 상용화하여 사용하기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 지속되어야 할 것으로 여겨진다. 추가적으로, C1q 검사법은 수년간 연구를 해왔음에도 불구하고 임상적 중요성에 대해서는 아직 논란이 많다. C1q가 결합하는 HLA 항체가 존재할 경우 불량한 예후와 관련이 있지만(49) MFI 역가와 C1q 반응은 관련이 없다는 보고가 있다(26). 하지만 C1q가 결합하는 항체는 고역가의 HLA 항체에서 검출된다는 보고도 있으므로(49,50) C1q 검사의 임상적인 적용에 대한 추가적인 연구들이 필요하다. 단일항원검사법과 C3d 검사법, C1q 검사법과의 비교평가 뿐만 아니라 이식 후 거부반응이나 환자의 임상양상과의 연관성도 함께 연구되어야 할 것으로 생각된다.

5. 요약

장기이식 전에 공여자 선택을 위해 사전에 공여자 HLA에 대한 항체 유무를 확인하는 것이 중요하고, 이식 후의 급성 또는 만성 거부반응을 예측하기 위해서도 HLA 항체에 대한 주기적인 추적 검사가 필요하다. 본 연구에서는 보체 활성화를 유발하는 HLA 항체를 검출할 수 있는 Luminex 검사법 중 C3d 검사를 시행하여 기존의 단일항원검사법과 비교하였다. 계명대학교 동산병원에서 2015년 4월부터 2018년 9월까지 HLA 항체 검사를 위해 검사실로 의뢰된 검체 중 class II 단일항원검사서 양성인 혈액 검체 중 최종적으로 DSA 양성인 66개의 검체를 대상으로 하였다. 각 검체를 단일항원검사법과 C3d 검사법으로 검사를 시행한 후 MATCH IT! Antibody 프로그램으로 HLA 항체 종류, MFI 값, 양성여부를 파악한 후 두 검사의 상관관계를 분석하였다. 단일항원검사서 양성인 항체 중에서 MFI \geq 3,001인 구간에서 61.3%가 C3d 검사 양성이었다. 반면, C3d 검사에서 양성인 항체 중에서는 MFI \leq 500, 1,001 \leq MFI \leq 10,000인 구간에서 각각 32개(49.2%), 41개(25.5%)를 제외하고는 모두 단일항원검사도 양성이었다. 한편, 단일항원검사서 음성이었으나 C3d 검사 양성인 항체는 16.5%였고 SAB 양성이나 C3d 검사 음성인 항체는 63.1%였다. 전체 항체 중 DSA는 총 181개였으며, DSA 중 단일항원검사서 양성인 항체가 C3d 검사에서도 양성인 항체는 MFI \geq 3,001 구간에서 70.1%였다. 반면, C3d 검사에서 양성인 항체 중에서는 93.8%가 단일항원검사도 양성이었다. 한편, 단일항원검사서 음성이었으나 C3d 검사 양성인 항체는 0.6%였고 SAB 양성이나 C3d 검사 음성인 항체는 56.9%를 차지했다. 본 연구 결과 C3d 검사 양성 검체가 C3d 검사 음성 검체보다 단일항원비드의 최대 MFI 값이 더 컸으며 단일항원비드의 MFI 값은 C3d의 양성여부와 상관관계를 나타냈다. 하지만 단일항원검사와 C3d의 양성여부 또는 MFI 값의 크기는 상관관계를 보이지 않는 경우도 있었으나, 이에 대한 추가적인 검증이 필요하다. 또한 이식 후 거부반응이나 환자의 임상양상과의 연관성도 함께 연구되어야 할 것으로

생각된다.

참고문헌

1. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th ed. New York, Garland Science, 2001, p.42-5.
2. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST: Lewin's Genes XI. 11th ed. Burlington, MA, Jones & Bartlett Publishers, 2014, p.493.
3. Cunliffe V, Trowsdale J: The molecular genetics of human chromosome 6. J Med Genet 1987; 24: 649-58.
4. Patel R, Terasaki PI: Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. New Engl J Med 1969; 280: 735-9.
5. Oh EJ, Park YJ, Kim JY, Yang CW, Kim DG, Moon IS: Detection of donor specific anti-HLA antibodies using antibody monitoring system. J Korean Soc Transplant 2006; 20: 63-8.
6. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al.: Outcome of subclinical antibody mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor specific antibodies. Am J Transplant 2009; 9: 2561-70.
7. Schonemann C, Groth J, Leverenz S, May G: HLA class I and class II antibodies: monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance. Transplantation 1998; 65: 1519-23.
8. Terasaki PI, McClelland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature 1964; 204: 998-1000.
9. Zachary AA, Houp JA, Vega R, Chesterton K, Lucas DP: Evaluation of the humoral response in transplantation. In Detrick B, Hamilton R, Folds J (Eds): Manual of molecular and clinical laboratory immunology. 7th ed. Washington, DC, ASM Press, 2006, p.1215-27.
10. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P: Pre-transplant assessment of

donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003; 3: 1488-500.

11. Oh EJ, Lee J, Yang CW, Moon IS, Park YJ, Han K: Comparison of anti-HLA detecting methods; cytotoxicity, flow cytometric crossmatch, multiple antigen-ELISA, single antigen-ELISA. *J Korean Soc Transplant* 2008; 22: 85-91.

12. Jung S, Oh EJ, Yang CW, Ahn WS, Kim Y, Park YJ, et al.: Comparative evaluation of ELISA and Luminex panel reactive antibody assays for HLA alloantibody screening. *Korean J Lab Med* 2009; 29: 473-80.

13. Joo DJ, Huh KH, Kim YS, Yoon SJ, Kim HJ, Sohn SS, et al.: Predictive value of donor specific antibody measured by Luminex single antigen assay for antibody mediated rejection after kidney transplantation. *J Korean Soc Transplant* 2011; 25: 169-75.

14. Aubert V, Venetz JP, Pantaleo G, Pascual M: Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Hum Immunol* 2009; 70: 580-3.

15. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, Colovai AI, Stokes MB, Markowitz GS, et al.: Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. *Hum Immunol* 2009; 70: 589-94.

16. Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, et al.: Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2011; 11: 2405-13.

17. Stegall MD, Gloor JM.: Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 8-10.

18. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al.: Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 98-105.
19. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong JP, Mooney N, et al.: Complement binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013; 369: 1215-26.
20. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schönemann C: Luminex and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother* 2013; 40: 182-9.
21. Chin C, Chen G, Sequeria F, Berry G, Siehr S, Bernstein D, et al.: Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 158-63.
22. Rasmussen KJ, Skjoedt MO, Vitved L, Skjoedt K, Palarasah Y: A novel antihuman C3d monoclonal antibody with specificity to the C3d complement split product. *J Immunol Methods* 2017; 444: 51-5.
23. Moreno Gonzales MA, Mitema DG, Smith BH, Schinstock CA, Stegall MD, Wakefield LL, et al.: Comparison between total IgG, C1q, and C3d single antigen bead assays in detecting class I complement-binding anti-HLA antibodies. *Transplant Proc* 2017; 49: 2031-5.
24. Gebel HM, Bray RA: The evolution and clinical impact of human leukocyte antigen technology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19: 598-602.
25. Kawaguchi S, Higasa K, Shimizu M, Yamada R, Matsuda F: HLA-HD: An accurate HLA typing algorithm for next-generation

- sequencing data. *Hum Mutat* 2017; 38: 788-97.
26. Llorente S, Boix F, Eguia J, López M, Bosch A, Martinez H, et al.: C1q-fixing human leukocyte antigen assay in immunized renal patients: correlation between Luminex SAB-C1q and SAB-IgG. *Transplant Proc* 2012; 44: 2535-7.
27. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, et al.: Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 457-67.
28. Ko SY, Lee W, Jung CW, Cho Y: C3d assay in correlation with single antigen bead assay for human leukocyte antigen antibodies. *Transplant Proc* 2018; 50: 2354-8.
29. Claisse G, Absi L, Cognasse F, Alamartine E, Mariat C, Maillard N: Relationship between mean fluorescence intensity and C1q/C3d-fixing capacities of anti-HLA antibodies. *Human Immunol* 2017; 78: 336-41.
30. Konvalinka A, Tinckam K: Utility of HLA antibody testing in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 1489-502.
31. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J: "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86: 1111-5.
32. El-Awar N, Lee JH, Tarsitani C, Terasaki PI: HLA Class I epitopes: recognition of binding sites by mAbs or eluted alloantibody confirmed with single recombinant antigens. *Hum Immunol* 2007; 68: 170-80.
33. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, et al.: Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009; 70: 844-53.
34. Grenzi PC, de Marco R, Silva RZ, Campos EF, Gerbase-DeLima M:

Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. *Hum Immunol* 2013; 74: 1300-3.

35. In JW, Rho EY, Shin S, Park KU, Song EY: False-positive reactions against HLA class II molecules detected in Luminex single-antigen bead assays. *Ann Lab Med* 2014; 34: 408-10.

36. Weinstock C, Schnaidt M: The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int J Immunogenet* 2013; 40: 171-7.

37. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D: HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011; 92: 510-5.

38. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al.: The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* 2018; 18: 293-307.

39. Bailly E, Anglicheau D, Blancho G, Gatault P, Vuiblet V, Chatelet V, et al.: Prognostic value of the persistence of C1q-binding anti-HLA antibodies in acute antibody mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2018; 102: 688-98.

40. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al.: Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013; 369: 1215-26.

41. Malheiro J, Santos S, Tafulo S, Dias L, Martins S, Fonseca I, et al.: Detection of complement-binding donor-specific antibodies, not IgG-antibody strength nor C4d status, at antibody-mediated rejection diagnosis is an independent predictor of kidney graft failure. *Transplantation* 2018; 102: 1943-54.

42. Leffell MS, Zachary AA: Antiallograft antibodies: relevance, detection, and monitoring. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 2-7.
43. Eng HS, Bennett G, Bardy P, Coghlan P, Russ GR, Coates PT: Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Hum Immunol* 2009; 70: 595-9.
44. Zeevi A, Lunz JG 3rd, Shapiro R, Randhawa P, Mazariegos G, Webber S, et al.: Emerging role of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibody determination for clinical management after solid organ transplantation. *Hum Immunol* 2009; 70: 645-50.
45. Lee YS, Won DI: Analysis of positive flow cytometric crossmatch in organ transplantation. *Lab Med Online* 2011; 1: 43-50.
46. Christiaans MH, Overhof-de Roos R, Nieman F, van Hooff JP, van den Berg-Loonen EM: Donor-specific antibodies after transplantation by flow cytometry: relative change in fluorescence ratio most sensitive risk factor for graft survival. *Transplantation* 1998; 65: 427-33.
47. Riethmüller S, Ferrari-Lacraz S, Müller MK, Raptis DA, Hadaya K, Rüsi B, et al.: Donor-specific antibody levels and three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2010; 90: 160-7.
48. Kim SY, Han BY, Hyun J, Joo SY, Song EY, Park MH: Evaluation of flow cytometric crossmatch results in comparison with donor-specific antibodies detected by Luminex-PRA tests in organ transplantation patients. *J Korean Soc Transplant* 2012; 26: 92-100.
49. Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB: Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* 2012; 16: 12-7.
50. Schaub S, Höonger G, Koller MT, Liwski R, Amico P: Determinants

of C1q binding in the single antigen bead assay. Transplantation 2014;
98: 387-93.

Evaluation of Human Leukocyte Antigen Class II C3d Assay - Correlation with Single Antigen Bead Assay

Kang, Hyein

Department of Laboratory Medicine
Graduate school

Keimyung University

(Supervised by professor Lee, Wonmok)

(Abstract)

Anti-human leukocyte antigen (HLA) antibody detection is important before organ transplantation to select an appropriate donor. Regular monitoring of anti-HLA antibody is also critical to predict acute or chronic rejection after transplantation. In this study, we compared C3d assay to single antigen bead (SAB) assay, which detects antibodies activating complements, especially C3d. A total of 66 serum samples were tested in parallel by SAB and C3d assay for detection of HLA class II antibodies. The relationship between two methods was analyzed for the type, the numbers and median fluorescent intensity (MFI) values, and positivity of the antibodies. Among 996 SAB-positive samples in MFI \geq 3,001 range, 610 (61.3%) were positive on C3d assay. Among C3d-positive samples, 369 (83.5%) were positive. SAB-negative but

C3d-positive samples were 16.5% and SAB-positive but C3d-negative samples were 63.1%. Correlation between the two methods showed similar distribution among donor-specific antibodies. Finally, C3d assay positivity seemed to be dependent on its MFI value on SAB assay but some of them were not. The reason and specific factors should be verified. Further studies are also needed to ascertain antibody mediated rejection after transplantation and correlation between the clinical aspects of the patients.

HLA class II C3d 검사법의 평가 - 단일항원비드 검사와의 상관관계

강 혜 인

계명대학교 대학원
의학과 진단검사의학 전공
(지도교수 이 원 목)

(초록)

장기이식 전에 공여자 선택을 위해 사전에 공여자 사람백혈구항원 (human leukocyte antigen, HLA)에 대한 항체 유무를 확인하는 것이 중요하고, 이식 후의 급성 또는 만성 거부반응을 예측하기 위해서도 HLA 항체에 대한 주기적인 추적 검사가 필요하다. 본 연구에서는 보체 활성화를 유발하는 HLA 항체를 검출할 수 있는 Luminex 검사법 중 C3d 검사를 시행하여 기존의 단일항원검사법과 비교하였다. 한 대학병원에서 HLA 항체 검사를 위해 검사실로 의뢰된 검체 중 class II 단일항원검사서 양성인 혈액 검체 중 최종적으로 DSA 양성인 66개의 검체를 대상으로 하였다. 단일항원검사법과 C3d 검사법으로 검사를 시행한 후 HLA 항체 종류, MFI(median fluorescent intensity) 값, 양성여부를 파악하여 두 검사의 상관관계를 분석하였다. 단일항원검사서 양성인 항체 중에서 $MFI \geq 3,001$ 인 구간에서 610개(61.3%)가 C3d 검사 양성이었다. C3d 검사에서 양성인

항체 중에서는 369개(83.5%)가 단일항원검사도 양성이었다. 한편, 단일항원 검사에서 음성이었으나 C3d 검사 양성인 항체는 16.5%였고 단일항원비드 (single antigen bead) 양성이나 C3d assay 음성인 항체는 63.1%였다. DSA만을 대상으로 분석했을 때에도 두 검사간의 상관관계는 비슷한 분포를 보였다. 본 연구 결과 C3d 검사 양성 검체가 C3d 검사 음성 검체보다 단일항원비드의 최대 MFI 값이 더 컸으며 단일항원비드의 MFI 값은 C3d의 양성 여부와 상관관계를 나타냈다. 하지만 단일항원검사와 C3d의 양성여부 또는 MFI 값의 크기는 상관관계를 보이지 않는 경우도 있어, 이에 대한 추가적인 검증이 필요하다. 또한 이식 후 거부반응이나 환자의 임상양상과의 연관성도 함께 연구되어야 할 것으로 생각된다.