

장기이식 환자에서 유세포 교차시험 결과와 Luminex-PRA 검사로 검출되는 공여자-특이항체의 비교평가

서울대학교 의과대학 검사의학교실¹, 한림대학교성심병원 진단검사의학과², 인제대학교 의과대학 서울백병원 진단검사의학과³

김선영¹ · 한복연¹ · 현정원² · 주신영³ · 송은영¹ · 박명희¹

Evaluation of Flow Cytometric Crossmatch Results in Comparison with Donor-specific Antibodies Detected by Luminex-PRA Tests in Organ Transplantation Patients

Seon Young Kim, M.D.¹, Bok Youn Han, M.T.¹, Jungwon Hyun, M.D.²,
Shin Young Joo, M.D.³, Eun Young Song, M.D.¹ and Myoung Hee Park, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University College of Medicine¹, Seoul,
Department of Laboratory Medicine, Hallym University Sacred Heart Hospital², Anyang,
Department of Laboratory Medicine, Seoul Paik Hospital, Inje University College of Medicine³, Seoul, Korea

Background: Two of the most sensitive methods for detecting donor-specific HLA antibodies (DSAs) are solid phase panel reactive antibody (PRA) assay using Luminex platform (Luminex-PRA), and a cell-based flow cytometric crossmatch (FCXM) test. We evaluated FCXM results in relation to DSAs detected by the Luminex-PRA method in solid organ transplantation candidates or post-transplant follow-up patients.

Methods: A total of 171 donor-recipient pairs were evaluated by Luminex-PRA (LIFECODES Class I and Class II ID kits; Gen-Probe, USA) and FCXM (T- and B-cells) tests. DSA levels were analyzed using a sum of median fluorescence intensity (MFI) values, and FCXM results were analyzed using MFI ratios.

Results: Class I and II DSAs were detected in 11.7% (20/171) and 11.1% (19/171) of tested sera, respectively. T-FCXM was negative in 97.4% (147/151) of Class I DSA negative sera, and B-FCXM was negative in 99.3% (137/138) of Class I and II DSA negative sera. T-FCXM was positive in 91.7% (11/12) of sera with moderate to strong Class I DSAs and B-FCXM was positive in 88.9% (16/18) of sera with moderate to strong Class II and/or Class I DSAs in the evaluation of sensitivities of FCXM in relation to DSA. There were significant correlations between FCXM ratios and DSA levels for both T-FCXM ($P=0.008$) and B-FCXM ($P<0.001$).

Conclusions: The FCXM results correlated well with the DSAs detected by the Luminex-PRA method. The specificities of T- and B-FCXM in relation to DSAs were high ($>97\%$) and the sensitivities of T- and B-FCXM were satisfactory ($>88\%$) in detecting moderate to strong DSAs.

Key Words: HLA antigens, Panel reactive antibody, Histocompatibility testing, Flow cytometry, Crossmatching

중심 단어: HLA 항원, 패널 반응 항체, 조직적합성 검사, 유세포 분석법, 교차시험

서 론

장기이식 환자들이 이식을 받기 전에 수혈, 임신, 과거

장기이식 등을 통해 다른 사람의 HLA 항원(human leucocyte antigen)에 노출되는 경우 일부 환자에서 항 HLA 항체를 보유하게 된다. 공여자의 HLA 항원에 반응하는 공여자-특이항체(donor-specific antibody, DSA)의 경우 고형장기이식 시 항체매개성 거부반응(antibody-mediated rejection)의 원인이 되며(1,2), 이식장기의 장기 생존율을 저하시킨다고 보고되고 있다(3-6). 따라서 장기이식, 특히 고형장기이식 환자에서 DSA 유무의 검출은 성공적인 이식을 위하여 매우 중요하다. 아직 어느 정도까지 낮은 수준의 DSA가 임상적으로 중요성을 가지는 지

책임저자 : 박명희, 서울시 종로구 대학로 101
서울대학교 의과대학 검사의학교실, 110-744
Tel: 02-2072-3388, Fax: 02-3672-3337
E-mail: parkmhee@snu.ac.kr

접수일 : 2011년 10월 31일, 심사일 : 2012년 3월 7일
게재승인일 : 2012년 5월 2일

2010년 대한이식학회 추계학술대회에서 구연 발표한 내용임.

에 대해서는 명확히 정해진 기준이 없으나(7), 낮은 역가의 DSA도 이식장기의 거부반응과 연관이 있다는 보고들이 있다(8,9). 따라서 탈감작 치료 후 좀더 민감도가 좋은 방법으로 항체 변화를 추적하기 위하여 HLA 항체를 검출하기 위한 검사의 민감도를 높이고자 하는 노력이 지속되어 왔다.

HLA 항체의 검출에는 크게 두 가지 방법이 사용되는데, 환자의 혈청과 공여자의 림프구를 반응시켜 양성 여부를 판정하는 HLA 교차시험과 림프구 패널과 환자의 혈청을 반응시켜서 HLA 항체 유무를 선별하고 특이성을 동정하는 panel reactive antibody (PRA) 검사가 있다. HLA 교차시험 방법으로는 1968년 Terasaki 등에 의해 개발된 보체의존성 림프구독성(complement dependent cytotoxicity, CDC) 방법(10)이 40여년간 표준 검사법으로 이용되고 있는데, 기본적인 CDC 방법 외에 검사의 민감도를 높이기 위해 항온시간을 연장하거나 항인글로불린을 추가하는 방법(anti-human immunoglobulin-CDC, AHG-CDC) 등의 변형된 CDC 방법도 이용되고 있다. 유세포 교차시험(flow cytometry crossmatch, FCXM) 방법은 1980년대에 개발되어 최근에 사용이 증가되고 있는데, 기존의 CDC 방법보다 최대 50배 민감하여 CDC 방법으로 검출하지 못하는 낮은 역가의 HLA 항체도 검출이 가능하다(11). PRA 검사방법으로는 살아있는 림프구를 이용하는 CDC 방법과 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) plate의 well이나 bead의 표면에 추출된 HLA 항원을 부착하여 환자 혈청 내 항체를 검출하는 solid phase 방법이 있다(11). 최근에 개발된 Luminex-PRA는 solid phase 방법 중 하나로, Luminex bead에 HLA 항원을 부착시켜 환자 혈청 내의 HLA 항체와 반응시키고 Luminex 장비를 이용하여 HLA 항체를 검출하는 방법이다(12). Luminex-PRA는 살아있는 림프구를 이용하는 CDC-PRA나 solid phase 법인 ELISA-PRA 등과 비교하였을 때 민감도가 가장 우수한 방법으로 보고되어 있다(12).

최근 국내에서도 고형장기이식 전후에 환자의 HLA 감작상태를 평가하기 위해 민감도가 높은 Luminex-PRA와 FCXM 검사의 이용이 증가되고 있지만, DSA 검출에 있어서 Luminex-PRA와 FCXM 검사간의 상관관계에 대한 연구 결과는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 장기이식 환자를 대상으로 Luminex-PRA 검사로 검출한 DSA 결과와 FCXM 결과간의 상관관계를 비교 평가해 보았다.

대상 및 방법

1) 연구대상

연구대상은 서울대학교병원에서 2009년 10월부터 2010년 9월까지 12개월간 고형장기이식 전 혹은 이식 후 추적관찰을 위하여 Luminex-PRA와 FCXM 검사를 모두 시행한 141명의 환자를 대상으로 하였다. 이 두 가지 검사에는 동시에 채취한 검체를 사용하거나, 혹은 3개월 이내의 간격으로 채취한 검체를 사용하되 그 사이에 수혈, 감염, 이식, 탈감작치료 등 항체가의 변화를 일으킬 수 있는 병력이나 치료력이 없는 것을 확인하였다. Luminex-PRA 검사를 실시하여 HLA 항체가 동정되었으나 공여자의 HLA 형을 알지 못하거나 PRA%가 높아 DSA 여부를 명확하게 규명하지 못한 8명의 검체는 본 연구의 대상군에서 제외하였다. 환자는 남자 83명, 여자 58명이었고, 평균연령은 44세(범위 9~72세)이었다. 이식장기는 신장 120명(85%), 심장 13명(9%), 간 5명(4%), 폐 3명(2%)이었다. 검체로는 141명의 환자로부터 얻은 156개의 혈청 검체(추적 검체 15개 포함)를 대상으로 하여 Luminex-PRA 검사를 시행하였고, 이들 156개의 환자 혈청과 171개의 공여자 림프구를 이용하여 FCXM 법으로 교차시험을 실시하였다. 환자의 혈청 검체 중 장기이식이 시행되기 이전에 채취된 것이 136개, 장기이식 후에 채취된 것이 18개였다.

2) 연구방법

(1) FCXM 검사

① **FCXM 검사방법:** 한 튜브 내에서 환자 혈청과 공여자 림프구를 반응시켜 3색 면역형광염색 방법을 이용하여 염색함으로써 T 세포와 B 세포에 대한 FCXM을 동시에 시행하였다(single tube T/B FCXM). 이 때 환자 혈청과 함께 양성대조 혈청과 음성대조(AB형 정상인) 혈청에 대한 검사도 나란히 실시하였다. 공여자의 림프구는 말초혈액으로부터 Ficoll-Hypaque 법으로 분리하여 이전에 기술된 방법에 따라 pronase를 처리하였다(13). Pronase 처리에 대해 간략히 기술하면, 1.0 mg/mL 농도의 pronase (type XIV; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 1.0 mL을 공여자 림프구 침사에 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 상층액을 버리고 세척액(washing solution, 0.1% NaN₃-PBS)으로 2회 세척한 후 다음 과정의 검사를 진행하였다. 면역형광염색에는 T 세포 표지자로 CD3-PerCP (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를, B 세포 표지자로 CD19-PE (Becton Dickinson)를, 공여자 림프구에 반응하는 IgG 항체 표지자로 goat F(ab')₂ an-

ti-human IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)를 사용하였다. 각 tube에 환자혈청, 음성대조, 양성대조 혈청을 25 μ L씩 넣고 세포수를 5×10^6 /mL로 맞춘 pronase 처리된 공여자의 림프구를 100 μ L씩 분주하고 실온 암소에서 30분간 반응시켰다. 세척액으로 3회 세척 후 anti-human IgG-FITC (적절히 희석), CD3-PerCP, CD19-PE 혼합액 100 μ L를 넣고 4°C 암소에서 20분간 반응시켰다. 다시 세척액으로 3회 세척 후 최종적으로 300 μ L의 세척액을 넣고 채부유시켜 FACSCalibur (Becton Dickinson)로 측정하여 Cellquest 프로그램(Becton Dickinson)으로 분석하였다.

② FCXM 결과의 해석: T 세포와 B 세포를 각각 gating 한 다음 공여자 림프구에 대한 환자 혈청의 중앙형광강도(median fluorescence intensity, MFI) 값을 음성대조 혈청 결과와 비교하였다. T 세포와 B 세포 모두에서 MFI ratio (환자 혈청/음성대조 혈청)가 2.0 이상인 경우에 양성으로 판정하였다.

(2) Luminex-PRA 검사

① Luminex-PRA 선별 및 동정 검사방법: HLA Class I 과 Class II 항체 유무를 선별하기 위한 Luminex-PRA 선별검사는 LIFECODES LifeScreen Deluxe kit (Gen-Probe, Stamford, CT, USA)를 이용하여 실시하였고, 검사 결과의 양성 여부를 판정하였다. Class I 또는 Class II 선별검사에서 양성 결과가 나온 모든 검체에 대하여 LIFECODES Class I 또는 Class II ID kit (Gen-Probe)를 이용하여 PRA 동정검사를 실시하였다. 동정검사에서는 PRA%를 산정하고, 양성인 경우 HLA 항체의 특이성을 동정하고 항체 강도(MFI 값)를 분석하였다. 선별 및 동정검사의 구체적인 실험 방법은 제조회사의 지침에 따라 시행하였고, 반응이 끝난 bead 부유액을 LABScan 200 flow cytometer (Luminex, Austin, TX, USA) 장비를 이용하여 각종 bead에 대한 검사결과(MFI 값)를 측정하였다.

② Luminex-PRA 결과의 해석: PRA 검사 결과의 해석을 위해 LABScan 200 flow cytometer에서 얻은 각종 bead에 대한 검사결과(MFI 값)를 Quick Type Version 2.4 User's Manual RUO 프로그램을 사용하여 분석하였다. Luminex-PRA 선별검사의 경우 시약 구성이 Class I 및 Class II 항체를 동시에 검사하도록 되어 있다. 각 well에 분주하는 반응시약 내에는 Class I HLA 항원이 코팅된 7가지의 bead (pool 1종, 교차반응그룹[cross-reactive group, CREG] 6종)와 Class II HLA 항원이 코팅된 5가지의 bead (pool 1종, DR CREG 3종, DQ CREG 1종), 및 3종류의 음성대조 bead와 양성대조 bead를 합해서 총 16가지의 bead가 들어있다. 결과 판독을 위하여

각각의 bead와 환자의 혈청을 반응시켜 얻은 MFI 값을 3종류의 음성대조 bead (CON1, CON2, CON3)의 MFI 값으로 각각 나눈 후 제조회사에서 시약의 lot 별로 제공하는 background adjustment factor (BAF)를 빼서 계산된 adjusted ratio 값 3개를 얻게 된다. 3개의 값 중 pool bead의 경우 1개 이상, CREG bead의 경우 2개 이상 양의 값(>0)을 가질 경우에 해당 bead에 대한 환자 혈청의 반응을 양성으로 판정하였다. Class I 및 Class II 선별검사에서 각각 7가지 bead 및 5가지 bead 중 1가지 이상에 양성 결과를 보이는 경우 양성으로 판정하였다.

동정검사의 경우 Class I과 Class II 항체를 별도의 kit로 검사하는데, Class I ID kit의 경우 총 50가지(50명 패널)의 항원 bead가, Class II ID kit의 경우 총 42가지(DR 30명 패널+enriched DQ 항원 12종)의 항원 bead가 각각 포함되어 있으며, 선별검사와 마찬가지로 3종류의 음성대조 bead와 양성대조 bead가 포함되어 있다. 결과 판독을 위해서는 각각의 bead와 환자의 혈청을 반응시켜 얻은 MFI 값에 대해 선별검사와 동일한 방법으로 계산된 3개의 adjusted ratio 값을 얻고, 여기에 추가로 CalcCON 값(항원 bead 중에 가장 낮은 MFI 값+20)을 이용하여 계산된 4번째 adjusted ratio 값을 얻게 된다. 이들 4개의 adjusted ratio 값 중 2개 이상이 양의 값을 갖는 경우에 해당 bead (패널)에 대한 환자 혈청의 반응을 양성으로 판정하도록 되어 있다. 그러나, 개별 환자 결과의 해석 시에 판독자가 adjusted ratio 값을 2개 대신 3개 또는 4개로 조정하여 판정할 수도 있고, cutoff MFI 값을 정하여 판정할 수도 있다.

동정검사에서 각 bead (패널)에 대한 양성 여부를 판정 후 PRA% (검사한 패널 수 중에 양성을 보인 패널의 백분율)를 산정하였고, 1개 또는 그 이상의 패널에서 양성 반응이 관찰되는 경우 HLA 항체 특이성을 분석하였다. HLA 항체 특이성은 꼬리분석(tail analysis) 방법을 이용하여 분석하게 되는데 결과 분석 프로그램에서 필요한 통계자료(해당 HLA 항원 유무와 양성반응 유무에 따른 2×2 table, chi-square 값 및 상관계수 r 값 등)를 제공하여 준다. HLA 항체 특이성의 분석에는 기본적으로 환자 자신이 가지고 있는 항원에 대한 항체는 가지고 있지 않다는 가정 하에 환자 자신의 HLA-A, B 형별을 고려하여 판정하였다. 개별 항원에 대한 반응과 함께 CREG 항원에 대한 반응도 고려하여 분석하였다(14,15). 일반적으로 HLA 항체 특이성에 대해 결과 분석 프로그램에서 자동으로 제공되는 automated 분석 결과는 부적절한 경우가 많아 대부분의 환자에서 manual 분석을 실시하였다.

DSA는 PRA에서 양성으로 동정된 HLA 항체의 정보와 공여자의 HLA-A, B, DR 형별 정보를 이용하여 양성 여부를 판단하였다. DSA의 강도는 MFI 값을 이용하여 분석하였고, 한 검체에서 두 개 이상의 DSA가 존재할 경우 MFI 값 총합을 계산하였다. DSA의 강도는 MFI 값에 따라 very weak ($<1,000$), weak ($1,000 \sim 2,999$), moderate ($3,000 \sim 9,999$), strong ($10,000 \leq$)으로 판정하였다. Class II 항체의 경우 HLA-DQ 항체에 대한 결과는 환자와 공여자의 HLA-DQ 자료가 없어서 결과 분석에 포함하지 않았다.

(3) 통계분석: Luminex-PRA로 동정된 DSA를 중심으로 FCXM의 민감도와 특이도를 분석하였다. T 세포에는 HLA Class I 항원만 표현되고 B 세포에는 HLA Class I, II 항원이 모두 표현되므로 T-FCXM 결과는 Class I DSA 결과를 중심으로 분석하였고, B-FCXM 결과는 Class I과 Class II DSA를 모두 고려하여 분석하였다. FCXM의 강도는 MFI ratio로, Luminex-PRA로 구한 DSA 강도는 MFI 값으로 판정하되 2개 이상의 DSA가 있는 경우 각 DSA의 MFI 총합으로 판정하였다. FCXM의 강도와 DSA의 강도간에 상관관계를 분석하기 위해서는 T-FCXM의 경우 Class I DSA의 MFI 총합과 비교하였고, B-FCXM의 경우 양성이 나온 Class I DSA와 Class II DSA의 MFI 총합과 비교하였다.

FCXM의 MFI ratio와 DSA의 MFI 총합의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient로, DSA 강도의 각 구간(very weak~strong)과 FCXM의 MFI ratio 평균값의 비교는 Kruskal Wallis ANOVA test로 분석하였다. ROC(receiver operating characteristic) 곡선을 이용하여 FCXM 양성 여부에 대한 DSA의 MFI 총합의 경계값(cutoff value) 및 곡선의 아래영역(area under the curve, AUC)을 구하였다. 통계프로그램은 SPSS (version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)와 Excel (Microsoft Office 2007)를 사용하였고 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 판정하였다.

결 과

1) Luminex-PRA와 FCXM 검사 결과의 비교

전체 156개의 환자 검체 중에서 HLA Class I 및 Class II 항체는 각각 26.3% (41/156)와 25.0% (39/156)에서 검출되었다(Table 1). 공여자와 환자의 HLA 형별을 고려하여 171 공여자-환자 조합에 대한 DSA를 분석해 보면 Class I DSA는 11.7% (20/171), Class II DSA는 11.1% (19/171)에서 검출되었다. PRA 양성인 혈청 중에 DSA 양성인 비율은 Class I 및 Class II에서 각각 48.8% (20/41)

와 48.7% (19/39)이었다. 두 개 이상의 DSA가 검출된 경우는 Class I DSA만 검출된 14건 중 9건, Class II DSA만 검출된 13건 중 3건이었다. Class I과 Class II DSA가 동시에 검출된 검체는 6개였다. 전체 171 공여자-환자 조합에서 시행된 FCXM 검사 중 T-FCXM 양성률은 10.5% (18/171), B-FCXM 양성률은 11.7% (20/171)이었다.

DSA를 중심으로 FCXM의 민감도와 특이도를 분석하였다(Table 2). Class I DSA와 T-FCXM 결과를 비교하여 보았을 때, Class I DSA 양성인 20 검체 중 T-FCXM 양성 검체는 14개로 민감도는 70.0%이었고, Class I DSA 음성인 151 검체 중 T-FCXM 음성 검체는 147개로 97.4%의 높은 특이도를 보였다. Class I과 Class II DSA가 모두 음성일 경우 B-FCXM의 음성률은 99.3% (137/138)로 나타나 매우 높은 특이도를 보였으나, Class I 혹은 Class II DSA가 양성일 경우 B-FCXM의 민감도는 57.6% (19/33)로 낮은 결과를 보였다. 전체적으로 Class I DSA와 T-FCXM의 양성/음성 일치율은 94.2% (161/171), Class I 및 Class II DSA와 B-FCXM의 일치율은 91.2% (156/171)로 높았다. 신장이식 검체 137건을 별도로 분석한 결과도 DSA와 FCXM의 일치율이 각각 94.6%, 91.3%로 전체 검체 171건 분석결과와 유사한 결

Table 1. Results of Luminex-PRA and flow cytometric cross-match (FCXM) tests

Test	No. of positive results/total tests ^a (%)
Luminex-PRA ^b	
Class I	41/156 (26.3%)
Class II	39/156 (25.0%)
Class I only	13/156 (8.3%)
Class II only	11/156 (7.1%)
Class I and Class II	28/156 (17.9%)
Class I or Class II	52/156 (33.3%)
DSA ^c	
Class I	20/171 (11.7%)
Class II	19/171 (11.1%)
Class I only	14/171 (8.2%)
Class II only	13/171 (7.6%)
Class I and Class II	6/171 (3.5%)
Class I or Class II	33/171 (19.3%)
FCXM	
T-cell	18/171 (10.5%)
B-cell	20/171 (11.7%)

Abbreviations: PRA, panel reactive antibody; DSA, donor-specific antibody.

^aLuminex-PRA results in 156 samples from 141 patients, and DSA and FCXM results in 171 donor-recipient pairs; ^bResults of Luminex-PRA screening test for HLA Class I and Class II antibodies; ^cDSA detected by Luminex-PRA test.

Table 2. Comparison between the results of Luminex-PRA and flow cytometric crossmatch (FCXM) tests

	T-FCXM				B-FCXM			
	Positive (n=18)	Negative (n=153)	Concordance	Kappa	Positive (n=20)	Negative (n=151)	Concordance	Kappa
Class I DSA								
Positive (n=20)	14 (70.0%)	6 (30.0%)	161/171 (94.2%)	0.660	14 (70.0%)	6 (30.0%)	159/171 (93.0%)	0.660
Negative (n=151)	4 (2.6%)	147 (97.4%)			6 (4.0%)	145 (96.0%)		
Class I &/or II DSA								
Positive (n=33)	15 (45.5%)	18 (54.5%)	150/171 (87.7%)	0.523	19 (57.6%)	14 (42.4%)	156/171 (91.2%)	0.669
Negative (n=138)	3 (2.2%)	135 (97.8%)			1 (0.7%)	137 (99.3%)		

Abbreviations: PRA, panel reactive antibody; DSA, donor-specific antibody.

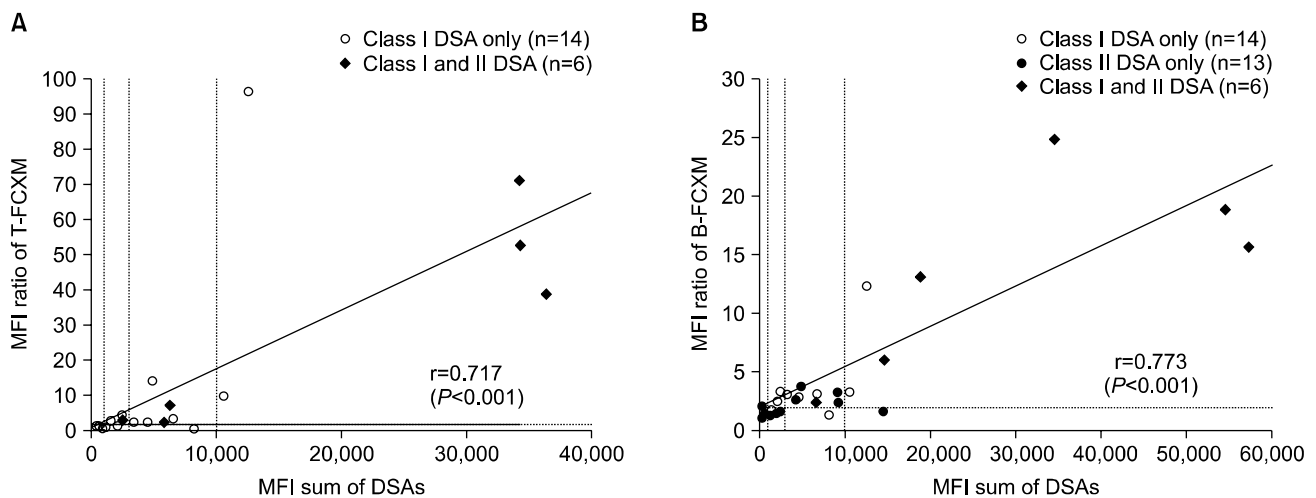


Fig. 1. Relationship between DSA intensity (MFI sum) and FCXM strength (MFI ratio). (A) T-FCXM results in patients with Class I DSA (n=20), and (B) B-FCXM results in patients with Class I or Class II DSA (n=33). Abbreviations: DSA, donor-specific antibody; FCXM, flow cytometric crossmatch; MFI, median fluorescence intensity.

과를 보였다.

2) Luminex-PRA로 검출한 DSA 강도와 FCXM 강도의 상관관계

MFI sum으로 나타낸 DSA 강도와 MFI ratio 값으로 나타낸 FCXM 강도를 비교하여 보았다(Fig. 1). 그 결과 Class I DSA의 MFI sum 값과 T-FCXM MFI ratio 간에 그리고 Class I과 Class II MFI sum 값과 B-FCXM MFI ratio 간에 유의한 상관관계가 관찰되었다(각각 $r=0.717$, $P<0.001$; $r=0.773$, $P<0.001$). Class I과 Class II DSA가 모두 양성인 경우에는 Class I 혹은 Class II 단독으로 나온 경우에 비하여 DSA 강도 및 FCXM 강도가 모두 현저히 높은 경향을 보였다.

MFI sum 값의 구간을 1,000, 3,000, 10,000을 기준으로 하여 DSA 강도를 4개군(very weak, weak, moderate,

strong)으로 분류하였을 때, DSA 강도가 강한 군에서 T-FCXM 및 B-FCXM의 강도(MFI ratio)가 유의하게 증가하는 경향을 볼 수 있었다(각각 $P=0.008$, $P<0.001$; Table 3). 또한 T-FCXM과 B-FCXM의 MFI ratio 값을 비교하여 보면, DSA 강도가 강한 군에서 T-FCXM이 B-FCXM에 비해 현저히 높은 MFI ratio 값을 보이는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, Table 3).

3) Luminex-PRA로 검출한 DSA 강도에 따른 FCXM 양성률

DSA의 강도에 따른 FCXM의 양성률(민감도)을 분석하여 보았다(Fig. 2). T-FCXM 양성률은 Class I DSA의 강도에 따라, 그리고 B-FCXM의 양성률은 Class I 및 Class II DSA의 강도에 따라 분석하였다. T-FCXM 양성률은 Class I DSA 강도가 weak, moderate, strong 군에서 각

Table 3. Flow cytometric crossmatch (FCXM) results according to DSA intensity

DSA intensity (MFI value) ^a	T-FCXM		B-FCXM	
	n=20	MFI ratio	n=33	MFI ratio
Very weak (<1,000)	n=3	1.48 (0.95 ~ 1.55) ^b	n=8	1.43 (1.03 ~ 2.13)
Weak (1,000 ~ 2,999)	n=5	2.89 (1.31 ~ 4.70)	n=7	1.75 (1.33 ~ 3.37)
Moderate (3,000 ~ 9,999)	n=7	2.62 (0.78 ~ 14.18)	n=10	3.02 (1.37 ~ 3.82)
Strong (10,000 ≤)	n=5	52.46 (9.92 ~ 96.34)	n=8	12.72 (1.69 ~ 24.80)
P value ^c		0.008		< 0.001

Abbreviations: DSA, donor-specific antibody; MFI, median fluorescence intensity; n, number.

^aSum of MFI of Class I DSA was calculated for T-FCXM, and sum of MFI of Class I and Class II DSA was calculated for B-FCXM; ^bMedian value with ranges in parentheses; ^cP values by Kruskal-Wallis ANOVA test.

FCXM	DSA intensity (MFI value)				Sensitivity
	Very weak (<1,000)	Weak (1,000~2,999)	Moderate (3,000~9,999)	Strong (10,000≤)	
T (+)	0/3 (0%)	3/5 (60.0%)	6/7 (85.7%)	5/5 (100%)	
					14/17 (82.4%) 11/12 (91.7%)
B (+)	1/8 (12.5%)	2/7 (28.6%)	9/10 (90.0%)	7/8 (87.5%)	
					18/25 (72.0%) 16/18 (88.9%)

Fig. 2. Relationship between DSA intensity and flow cytometric crossmatch (FCXM) results. Sensitivities of FCXM tests detecting DSA-positive samples of different intensities are shown. Abbreviations: DSA, donor-specific antibody; MFI, median fluorescence intensity.

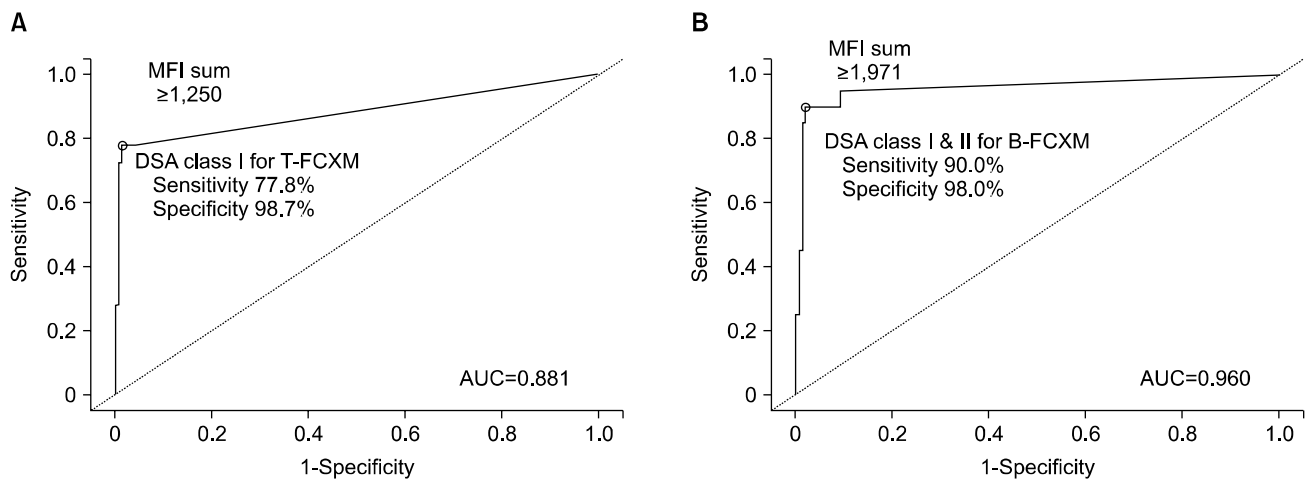


Fig. 3. Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis of DSA intensity (MFI sum) for FCXM positivity. MFI sum values of Class I DSAs were used for T-FCXM (A), and those of Class I and Class II were used for B-FCXM (B). Abbreviations: AUC, area under the curve; DSA, donor-specific antibody; FCXM, flow cytometric crossmatch; MFI, median fluorescence intensity.

각 60% (3/5), 85.7% (6/7), 100% (5/5)로 나타났다. B-FCXM 양성률은 Class I 및 Class II DSA 강도가 weak, moderate, strong 군에서 각각 28.6% (2/7), 90.0% (9/10), 87.5% (7/8)로 나타났다. 따라서 DSA 강도가

weak 군에서는 T-FCXM에 비해 B-FCXM의 양성률이 낮게 나왔다. DSA 강도가 moderate/strong 군에서는 T-FCXM과 B-FCXM의 양성률이 각각 91.7% (11/12)와 88.9% (16/18)로 비교적 높은 것으로 나타났다.

FCXM 양성 검출을 위한 DSA MFI 값의 ROC 곡선 분석을 실시하여 보았다(Fig. 3). T-FCXM 양성 검출을 위해서는 Class I DSA의 MFI 총합 1,250을 경계값으로 하였을 때 민감도가 77.8%, 특이도가 98.7%로 가장 좋은 결과를 보였다. 또한 B-FCXM에 대해서는 Class I과 Class II DSA의 MFI 총합 1,971을 경계값으로 하였을 때 민감도가 90.0%, 특이도가 98.0%로 상당히 높은 민감도와 특이도를 나타내었다. 이 때 ROC 곡선의 AUC는 T-FCXM의 경우 0.881, B-FCXM의 경우 0.960으로 나타났다.

고 찰

HLA 항체를 검출하기 위한 매우 민감한 검사법인 FCXM법과 Luminex-PRA가 이식검사에 도입됨에 따라 전통적인 방법으로는 검출할 수 없었던 낮은 수준의 DSA까지 검출할 수 있게 되었고, 따라서 이러한 새로운 검사법으로 얻은 결과를 적절히 해석하고 장기이식 환자의 치료 성적 향상을 위하여 적용하는 것의 중요성이 더욱 더 커지고 있다(16-19). Luminex-PRA는 CDC, ELISA, Flow cytometry 등의 다른 PRA 방법과 비교하여 민감도가 가장 우수한 것으로 보고되고 있다(20). 또한, Luminex-PRA는 검사자가 사용하기에 편리하며 데이터 분석이 좀더 용이하고, 소량의 시료로도 항체 동정검사가 가능한 장점이 있다(12). 최근에는 실제 공여자의 림프구를 이용하는 교차시험 대신 이러한 민감도가 증가된 PRA 검사를 통하여 동정된 HLA 항체 결과를 토대로 공여자의 HLA 형별에 대한 DSA 유무를 결정하는 방법인 virtual crossmatch의 개념도 도입되어 이용되고 있다(21,22). 혈청과 공여자 림프구를 반응시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광광도를 측정하는 FCXM법은 기존의 CDC 방법에 비하여 민감도를 높이고 IgM 자가항체에 의한 위양성을 방지할 수 있는 교차시험 방법이다. 또한 T 세포와 B 세포에 대한 검사가 한 튜브 내에서 가능하며, 결과 판정 시 더 객관적이고 정량적인 판단이 가능하다는 장점이 있다(11,23).

본 연구에서는 단일 기관에서 시행된 171건의 Luminex-PRA로 검출한 DSA와 FCXM 결과를 비교하여 본 결과 두 검사 사이에 상당히 좋은 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다. Luminex-PRA로 검출되는 DSA와 FCXM의 양성률을 비교하여 보았을 때, 두 가지 검사결과의 일치도가 T-FCXM과 B-FCXM에서 모두 90% 이상으로 높았으나, Luminex-PRA로 검출되는 DSA가 FCXM 결과보다 다소 높은 양성률을 보였다. 이러한 결과는 Luminex-PRA

검사로 구한 DSA의 FCXM에 대한 음성 예측도(negative predictive value)를 90% 이상으로 보고한 이전의 연구들과 합치되는 결과이다(21,22). 본 연구에서 DSA 음성이고 FCXM만 양성인 경우는 드물었다.

다양한 검사 및 지표를 이용한 이전의 연구들에서 DSA 강도는 HLA 항체 양을 반영하는 것으로 보고하였고, 또한 몇몇 연구들에서는 DSA 강도가 이식 후 이식장기의 생존율과 상관관계를 보인다고 보고하였다(23,24). 본 연구에서는 DSA 강도를 반영하는 지표로 FCXM의 경우 MFI ratio를 사용하였고, Luminex-PRA로 검출되는 DSA의 경우 MFI 값을 사용하되 2개 이상의 DSA가 있는 경우 MFI 총합으로 비교하였다. Luminex-PRA 검사로 검출한 DSA 강도와 FCXM의 강도를 정량적으로 비교하여 보았을 때 둘 사이에 상당히 좋은 상관관계를 볼 수 있었다(T-FCXM, B-FCXM 각각 $P < 0.001$; Fig. 1). Luminex-PRA에서 검출되는 HLA 항체(DSA) 강도를 분류하는 MFI 값의 기준은 연구마다 다양하나, 본 연구에서는 MFI 1,000, 3,000, 10,000을 기준으로 강도를 나누어 비교해 보았다. DSA의 강도에 따라 T-FCXM과 B-FCXM의 민감도(양성률)를 비교하여 보았을 때 DSA 강도가 중등도 혹은 강양성일 경우 T-FCXM과 B-FCXM의 민감도가 모두 만족할 만한 수준이었다($> 88\%$, Fig. 2). 따라서 DSA 강도가 중등도 이상일 경우에는 FCXM 양성 결과와 비교적 잘 일치하는 것으로 생각된다. 약한 강도의 DSA의 경우 T-FCXM에 비해 B-FCXM의 민감도는 더 낮은 것으로 나타났다(60% vs. 28.6%). 본 연구 결과 ROC 곡선 분석에서 가장 좋은 민감도와 특이도를 보이는 DSA MFI 값의 경계값이 T-FCXM에 대해서는 1,250 (민감도 77.8%, 특이도 98.7%), B-FCXM에 대해서는 1,971 (민감도 90%, 특이도 98%)로 나타났다(Fig. 3). 이는 항체매개성 거부 반응을 예측하는 Class I DSA 경계값으로 MFI 값 900을 제시한 연구 결과와 유사하였다(25). 그러나 같은 제조사에서 생산된 Luminex-PRA 검사키트의 경우 MFI 값이 재현성이 있음이 알려져 있으나, 다른 제조사에서 생산된 제품의 경우 MFI 값에 차이가 있음이 알려져 있으므로 MFI 값을 해석함에 있어 주의가 필요하다(8,25).

Luminex-PRA로만 검출되는 약한 강도의 DSA의 경우 아직 임상적 의미가 명확하지 않다. 낮은 역가의 DSA도 임상적으로 거부반응의 발생 및 이식장기의 예후와 연관이 있다는 보고도 있다(8,9,25). 그러나 몇몇 연구에서는 Luminex-PRA로만 검출되는 약한 DSA는 환자 경과와 연관성이 낮고 임상적인 의미가 떨어지는 것으로 보고하면서 지나치게 민감한 검사로 인하여 환자가 이식을 받을 수 있는 기회가 줄어들고 PRA 양성결과로 인해 고위험

군으로 간주되어 불필요한 치료와 검사를 동반하게 되는 문제점에 대한 우려를 제기하고 있다(26,27). 따라서 향후 약한 DSA와 장기이식 환자의 임상 경과 사이의 상관관계에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

DSA를 정량적으로 측정하는 것은 DSA 강도에 따른 임상적 위험성을 평가하는데 유용할 뿐 아니라 이미 DSA를 가지고 있는 환자의 추적 관찰에도 도움이 될 수 있다. 이전에는 DSA의 존재 및 HLA 교차시험 양성인 신장이식의 금기로 간주되어 왔으나, 최근에는 DSA가 존재하는 경우에도 혈장교환술 및 rituximab 투여 등 다양한 탈감작치료를 시행하여 성공적인 신장이식을 시행하고 있다. 이러한 탈감작치료 후 추적관찰을 할 때 FCXM의 MFI ratio 및 Luminex-PRA의 MFI 값은 혈중 DSA의 역가를 반영하는 지표가 될 수 있으리라 생각된다. 두 가지 중 어떤 지표가 더욱 환자의 상태를 민감하게 반영할 수 있을지 여부는 향후 더 연구가 필요하겠으나 FCXM은 생존도가 좋은 공여자 림프구가 필요하다는 제한점이 있다.

Luminex-PRA 검사의 한계점으로 패널 구성을 들 수 있다. CDC-PRA 검사법에서는 림프구 패널을 자가 제조 가능하므로 한국인의 HLA 형별 분포에 맞는 림프구 패널을 구성할 수 있다. 그러나 Luminex-PRA 검사의 경우 외국 제조사에서 제공하는 패널을 사용하게 되므로 한국인에 있는 HLA 항원 중에 패널 구성에 포함되지 않은 항원에 대한 항체를 검출하지 못하는 문제점이 있다. 또한 본 연구에서 사용한 다항원을 이용한 Luminex-PRA의 경우 PRA%가 매우 높은 경우 DSA를 정확히 동정할 수 없는 어려움이 있다. 따라서 Luminex-PRA 검사가 FCXM 검사보다 다소 민감한 결과를 보였지만, 이식 전 검사로 Luminex-PRA가 FCXM를 대체하기에는 부족하며 이식 전 검사로 두 검사를 모두 시행할 필요가 있을 것이다.

결 론

Luminex-PRA와 FCXM 검사는 기존의 검사에 비하여 HLA 항체를 검출하는데 있어 민감도가 높고 편리한 검사이다. 본 연구에서 두 가지 검사는 서로 비교적 높은 일치율을 나타내었고, 특히 Luminex-PRA로 검출되는 DSA의 강도가 중등도 이상(MFI $\geq 3,000$)의 강도인 경우 FCXM 결과가 비교적 높은 민감도와 특이도를 보였다. Luminex-PRA 검사로 검출되는 DSA의 임상적 의의 및 추적관찰 지표로서의 유용성에 대해 향후 더 연구가 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive cross-match test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280:735-9.
- 2) Süsal C, Döhler B, Sadeghi M, Ovens J, Opelz G. HLA antibodies and the occurrence of early adverse events in the modern era of transplantation: a collaborative transplant study report. *Transplantation* 2009;87:1367-71. Erratum in *Transplantation*. 2009;88(2):293.
- 3) Fernández-Fresnedo G, Pastor JM, López-Hoyos M, Ruiz JC, Zubimendi JA, Gonzalez-Cotorruelo J, et al. ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:990-5.
- 4) 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.
- 5) Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003;75:1034-40.
- 6) Cardarelli F, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Delmonico FL, Wong W, Schoenfeld DA, et al. Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation. *Transpl Int* 2005;18:532-40.
- 7) Leffell MS, Zachary AA. Antiallograft antibodies: relevance, detection, and monitoring. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15:2-7.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998-1000.
- 11) Zachary AA, Houpt JA, et al. Evaluation of the humoral response in transplantation. In: Detrick B, Hamilton RG, et al., ed. *Manuals of molecular and clinical laboratory immunology*. 7th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2006:1215-27.
- 12) Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A, et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:465-71.
- 13) Vaidya S, Cooper TY, Avandsalehi J, Barnes T, Brooks K, Hymel P, et al. Improved flow cytometric detection

- of HLA alloantibodies using pronase: potential implications in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71:422-8.
- 14) Rodey GE, Neylan JF, Whelchel JD, Revels KW, Bray RA. Epitope specificity of HLA Class I alloantibodies. I. Frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. *Hum Immunol* 1994;39:272-80.
- 15) Rodey GE, Revels K, Fuller TC. Epitope specificity of HLA Class I alloantibodies: II. Stability of cross-reactive group antibody patterns over extended time periods. *Transplantation* 1997;63:885-93.
- 16) Reinsmoen NL, Lai CH, Vo A, Cao K, Ong G, Naim M, et al. Acceptable donor-specific antibody levels allowing for successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitization therapy. *Transplantation* 2008;86:820-5.
- 17) Zachary AA, Leffell MS. Detecting and monitoring human leukocyte antigen-specific antibodies. *Hum Immunol* 2008;69:591-604.
- 18) Gebel HM, Moussa O, Eckels DD, Bray RA. Donor-reactive HLA antibodies in renal allograft recipients: considerations, complications, and conundrums. *Hum Immunol* 2009;70:610-7.
- 19) Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology - challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010;76: 87-95.
- 20) Muro M, Llorente S, Marín L, Moya-Quiles MR, Gonzalez-Soriano MJ, Prieto A, et al. Acute vascular rejection mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient: discrepancies between FlowPRA, ELISA and CDC vs luminex screening. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:223-6.
- 21) Lee PC, Ozawa M, Hung CJ, Lin YJ, Chang SS, Chou TC. Reappraisal of HLA antibody analysis and cross-matching in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:95-8.
- 22) Morris GP, Phelan DL, Jendrisak MD, Mohanakumar T. Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: a 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Hum Immunol* 2010;71:268-73.
- 23) Lee YS, Won DI. Analysis of positive flow cytometric crossmatch in organ transplantation. *Lab Med Online* 2011;1:43-50. (이윤수, 원동일. 장기이식 시 유세포 분석법에 의한 HLA 교차시험의 양성례 분석. *Lab Med Online* 2011;1:43-50.)
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.