



2015년 국내 HLA 교차시험 현황 설문조사

A Questionnaire Survey of HLA Crossmatch Tests in Korea (2015)

유신애^{1*} · 강은숙¹ · 박명희²Shinae Yu, M.D.^{1*}, Eun-Suk Kang, M.D.¹, Myoung Hee Park, M.D.²성균관대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 한국장기기증원 KODA LAB²Department of Laboratory Medicine and Genetics¹, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul; Korea Organ Donation Agency Laboratory², Seoul, Korea**Background:** We carried out a questionnaire survey for laboratories performing human leukocyte antigen-crossmatch (HLA-XM) to provide a basis for laboratory standardization of HLA-XM tests in Korea.**Methods:** The questionnaires were distributed to 51 HLA laboratories participating in the HLA-XM part of the HLA proficiency survey program organized by the Korean Society for Laboratory Medicine and replies from 50 laboratories were analyzed. The questionnaires included following items: 1) HLA-XM methods performed and annual number of tests, 2) types of the specimen and lymphocyte separation methods, 3) test procedures and reagents for complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDC-XM) and flow cytometry crossmatch (FCXM).**Results:** The number of laboratories performing anti-human globulin (AHG) CDC-XM (47/49, 96%) and FCXM (30/50, 60%) was considerably increased compared to the 2005 survey (AHG CDC-XM, 35/43, 81%; FCXM, 7/44, 16%). As for the annual number of XM tests, more than 50% of the laboratories were low volume laboratories performing ≤ 50 tests, and only 10% of the laboratories were performing > 500 tests. For cell isolation methods, negative selection was used by 43% (21/49) of laboratories performing CDC-XM. Number of cells reacted per 1 μ L of serum varied among different laboratories in both CDC-XM (1,000–8,000) and FCXM tests (1,300–20,000). For the interpretation of FCXM, log fluorescence ratio (26/30, 87%) was more commonly used than channel shift values (5/30, 17%).**Conclusions:** Considerable variation is noted in both CDC-XM and FCXM methods performed by different laboratories. A continuous effort for laboratory standardization is needed to reduce inter-laboratory variation in the HLA-XM test results.**Key Words:** Questionnaire survey, HLA crossmatch, Complement-dependent cytotoxicity, Flow cytometry, Standardization

서론

Corresponding author: Eun-Suk Kang

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea

Tel: +82-2-3410-2703, Fax: +82-2-3410-2719, E-mail: eskang@skku.edu

Co-corresponding author: Myoung Hee Park

Korea Organ Donation Agency Laboratory, 6F, 12 Nonhyeon-ro 132-gil, Gangnam-gu, Seoul 06052, Korea

Tel: +82-2-548-5639, Fax: +82-2-548-5631, E-mail: parkmhee@snu.ac.kr

^{*}Currently affiliated with the Department of Laboratory Medicine, Haeundae Paik Hospital, Inje University College of Medicine, Busan, Korea.

Received: January 3, 2017

Revision received: April 17, 2017

Accepted: April 19, 2017

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2017, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

HLA 교차시험(HLA-crossmatch, HLA-XM)은 장기이식 시 수혜자의 혈액 내에 공여자의 HLA 항원에 반응하는 항체가 존재하는지 여부를 검사하는 것이며, 이는 장기이식 후 초급성거부반응을 방지하고 면역학적 위험인자로 작용하는 항체를 검출하는 목적으로 수행한다[1].

과거 수십 년 동안 HLA-XM에서 보체의존성 세포독성 교차시험(complement-dependent cytotoxicity crossmatch, CDC-XM)이 사용되어 왔으며 기본적인 CDC 방법(NIH 법)에 비해 검사의 민감도를 높이기 위하여 항온시간 연장 방법(long incubation 법), 세척 과정 추가 방법(Amos 법), 항인글로불린 추가 방법(anti-human immunoglobulin, AHG 법) 등의 변형법들이 도입되었다[2]. 특히 유세포분석법(flow cytometry, FC)을 이용한 유세포 교차시험(flow cytometry crossmatch, FCXM)은 CDC-XM에 비하여 유의하게 높은 민감도로 인하여 도입 초기에는 그 임상적 의의 및 해석에 다양한 이견들이 있었으나[3-5], 현재는 많은 검사실에서 CDC-XM과

함께 사용되거나 혹은 단독으로 사용되고 있다. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)의 공인 검사실 기준에 만족하기 위해서도 CDC-XM 기본법 외에 민감도가 높은 AHG-CDC 혹은 FCXM과 같은 방법 중 하나를 추가하여 HLA 교차시험을 시행하여야 한다[6]. 이는 국내에서도 마찬가지로 질병관리본부 뇌사판정대상자 관리전문기관 운영규정(질병관리본부 예규 제208호)에 명시되어 있다. 또한 국내 또는 국외의 신빙도조사 프로그램에 참여하여 외부정도관리를 받아야 하며, 일정기준 이상의 성적을 유지하여 2년마다 국립장기이식관리센터장에게 제출하여 적격여부를 평가 받아야 한다.

국내 HLA 신빙도조사 프로그램은 1996년에 처음 시작되어[7], 2000년부터는 대한진단검사의학회 정도관리위원회에서 주관하여 연 2회 시행 중이며[8], 현재 HLA 형별검사, HLA-XM, 항HLA 항체검사(panel reactive antibody, PRA), 그리고 HLA-B27 항원검사 항목에 대하여 시행하고 있다. 이 항목들 중 HLA-XM에 참여하고 있는 기관은 2015년 현재 51기관으로 CDC-XM 정도관리 회신 분석 결과 양성 검체의 경우 기관마다 역가가 1:1-1:32로 다양하게 분포되어 있었다(자료 미제시). 그리하여 HLA-XM 결과의 검사실 간 변이를 줄여야 하는 필요성이 대두되었다. 이에 본 연구에서는 HLA 검사에 대한 설문조사의 자료를 분석하여 제시함으로써 국내 기관의 현황을 파악하고, 나아가 HLA-XM의 표준화를 이루기 위한 기초자료로 사용하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2015년 8월을 기준으로 국내 HLA 검사 신빙도조사 중 HLA-XM에 참여하고 있는 51개의 의료기관을 대상으로 설문조사를 시행하였다.

Table 1. HLA crossmatch methods used by the participant laboratories (N=50)

T-CDC*	B-CDC*	T-FC†	B-FC†	No. (%)
+	-	-	-	8 (16)
+	+	-	-	12 (24)
+	+	+	-	6 (12)
+	+	+	+	17 (34)
+	-	+	-	1 (2)
+	-	+	+	5 (10)
-	-	+	+	1 (2)

*The number of laboratories performing CDC method among 50 participants: CDC, 49 (98%); T-CDC and B-CDC, 35 (70%); T-CDC only, 14 (28%); †The number of laboratories performing FC method among 50 participants: FC, 30 (60%); T-FC and B-FC, 23 (46%); T-FC only, 7 (14%).
Abbreviations: CDC, complement-dependent cytotoxicity; FC, flow cytometry.

2. 방법

이메일을 통하여 설문조사지를 각 기관의 HLA-XM 담당 검사자 및 전문의에게 전송하여 기입하도록 하였으며, 결과지는 이메일 또는 팩스로 회수하였다. 2015년 8월 31부터 9월 14일까지 15일간 1차 설문조사를 시행하였으며, 그 중 한 기관을 제외한 50개의 기관(98%)이 조사에 응답하였다. 1차 설문조사 회신 내용 중 누락되었거나 명확하지 않았던 항목에 대하여 2016년 1월 5일부터 18일까지 10일간 추가 조사하였다. 설문항목은 다음과 같았다.

- 1) 시행 중인 HLA-XM 종류와 검사 건수
- 2) HLA-XM에 사용하는 검체의 종류와 림프구 분리방법
- 3) 보체의존성 세포독성 교차시험(CDC-XM)의 검사방법 및 시약
- 4) 유세포 교차시험(FCXM)의 검사방법 및 시약

결 과

1. 시행 중인 HLA-XM 종류와 검사 건수

50개의 설문 회신 의료기관에서 시행 중인 HLA-XM의 종류와 시행 기관 수는 Table 1과 같다. T-CDC, B-CDC, T-FC와 B-FC를 모두 시행 중인 기관이 17기관(34%)으로 가장 많았다. 각 검사별로는 총 49개 기관(98%)에서 CDC-XM을 시행하고 있었는데 이 중 35개 기관에서는 T-CDC와 B-CDC를 모두 시행하고 있었고, 14개 기관에서는 T-CDC만 시행하고 있었다. FCXM을 시행하고 있는 기관은 30기관(60%)이었는데, 23개 기관에서는 T-FC와 B-FC 모두 시행하고 있었고, 7개 기관에서는 T-FC만 시행하고 있었다.

CDC-XM에 사용하는 검사방법을 Table 2에 제시하였다. 방법별로는 T-CDC를 시행하는 49개 기관 중 NIH법과 AHG법을 함께 검

Table 2. Phases of CDC crossmatches used by the participant laboratories (N=50)

Crossmatch	NIH	Amos wash	Long incubation	AHG	No. (%)
T-CDC*	+	-	-	+	39 (68)
	+	-	+	+	4 (8)
	+	-	+	-	2 (4)
	-	-	+	+	2 (4)
	-	+	+	+	1 (2)
	-	-	-	+	1 (2)
	-	-	-	-	1 (2)
B-CDC†	+	-	-	-	32 (64)
	+	+	-	-	1 (2)
	+	-	-	+	2 (4)
	-	-	-	-	15 (30)

*T-CDC, 49/50 (98%); NIH and AHG, 43 (86%); †B-CDC, 35/50 (70%); NIH only, 32 (64%).

Abbreviations: CDC, complement-dependent cytotoxicity; NIH, National Institutes of Health; AHG, anti-human globulin.

사하고 있는 기관(43기관)이 가장 많았고, B-CDC를 시행하는 35개 기관 중에서는 NIH법만으로 검사 중인 기관(32기관)이 가장 많았다(Table 2).

각 기관당 최근 2년간 시행한 연간 교차시험 건수(2013, 2014년)를 조사하여 Table 3에 정리하였다. T-CDC, B-CDC, T-FC, B-FC 검사에서 모두 각 기관당 검사 건수는 매우 광범위하게 분포하였다. 각 검사 종목에서 연간 50건 이하를 실시하는 소규모 검사기관이 50% 이상으로 많았고, 연간 500건을 넘는 검사를 실시하는 기관은 2014년의 경우 T-CDC 5기관(10%), B-CDC 1기관(3%), T-FC 3기관(10%), B-FC 2기관(9%)에 불과했다.

2. HLA-XM에 사용하는 검체 및 세포의 종류와 분리방법

HLA-XM을 시행하기 위해 공여자 혈액 채취에 사용하는 항응고제의 종류를 조사한 결과, Heparin을 사용하는 기관이 33기관(66%), ACD를 사용하는 기관이 16기관(32%), Heparin 혹은 ACD를 사용한다고 답한 기관이 1기관(2%)이었다. HLA-XM 각 검사법에 사용하는 세포의 종류와 세포 분리방법을 Table 4에 정리하였다. 최근에 도입된 세포분리 방법인 negative selection 방법을 상당

수 기관에서 도입하여 CDC-XM 중 T-CDC 검사에서 43% (21/49), B-CDC 검사에서 43% (15/35)의 기관에서 사용하고 있었다. FCXM의 경우 T-FC와 B-FC 검사에서 모두 단핵세포나 총 림프구를 이용하여 검사하는 것이 일반적인데 소수의 기관에서는 분리한 T 세포나 B 세포를 사용하는 것으로 조사되었다(T-FC, 3/30, 10%; B-FC, 2/23, 9%).

3. 보체의존성 세포독성 교차시험(CDC-XM)의 검사방법 및 시약

1) 세포와 혈청

CDC-XM을 시행하는 49기관에서 well당 분주하는 세포 수는 2,000개에서부터 8,000개까지 범위가 다양하였다. 그 중 well당 2,000-3,000개의 세포를 사용하는 기관이 가장 많았으며, 반응을 위하여 사용하는 혈청 양은 1-2 μ L였다. Well 당 반응시키는 혈청 1 μ L 당 세포 수는 1,000-8,000개로 다양하였다(Table 5).

CDC-XM 시행 시 혈청 최대 연속 희석 배수는 1:32가 44기관(90%)으로 가장 많았으며, 1:16이 4기관(8%)이었고, 한 기관(2%)은 1:8까지의 역가만을 측정하고 있었다. 혈청 희석배지로는 RPMI

Table 3. Annual number of HLA crossmatch tests performed by the participant laboratories in 2013 and 2014

No. of tests	2013, No. (%)				2014, No. (%)			
	T-CDC (N=46)	B-CDC (N=34)	T-FC (N=27)	B-FC (N=18)	T-CDC (N=48)	B-CDC (N=35)	T-FC (N=30)	B-FC (N=23)
≤ 10	7 (15)	7 (21)	5 (19)	2 (11)	9 (19)	11 (31)	8 (27)	7 (30)
11-50	19 (41)	18 (53)	14 (52)	12 (67)	16 (33)	12 (34)	10 (33)	10 (43)
51-100	3 (7)	1 (3)	1 (4)	0 (0)	6 (13)	5 (14)	4 (13)	1 (4)
101-300	10 (22)	3 (9)	2 (7)	1 (6)	10 (21)	3 (9)	2 (7)	2 (9)
301-500	3 (7)	3 (9)	3 (11)	1 (6)	2 (4)	3 (9)	3 (10)	1 (4)
> 500	4 (9)	2 (6)	2 (7)	2 (11)	5 (10)	1 (3)	3 (10)	2 (9)
Median (range)	39 (2-1,903)	26 (1-599)	26 (2-1,607)	33 (2-769)	42 (2-3,089)	25 (0-513)	33 (0-3,065)	29 (0-734)

Abbreviations: CDC, complement-dependent cytotoxicity; FC, flow cytometry.

Table 4. Types of the cells and cell separation methods used for HLA crossmatch by the participant laboratories (N=50)

Crossmatch methods (N)	Types of the cells (N, %)	Nylon wool No. (%)	Negative selection No. (%)	Positive selection No. (%)	Nylon wool or negative selection No. (%)
T-CDC (49)	MNC* (8, 16)				
	T cell (34, 69)	15 (31)	11 (22)	5 (10)	3 (6)
	Total lymphocyte (7, 14)	0 (0)	7 (14)	0 (0)	0 (0)
B-CDC (35)	MNC* (1, 3)				
	B cell (34, 97)	14 (49)	12 (34)	5 (14)	3 (9)
T-FC (30)	MNC* (20, 67)				
	T cell (3, 10)	0 (0)	2 (7)	0 (0)	1 (3)
	Total lymphocyte (7, 23)	0 (0)	7 (23)	0 (0)	0 (0)
B-FC (23)	MNC* (15, 65)				
	B cell (2, 9)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1 (4)
	Total lymphocyte (6, 26)	0 (0)	6 (26)	0 (0)	0 (0)

*Separated by ficoll density gradient.

Abbreviations: CDC, complement-dependent cytotoxicity; FC, flow cytometry; MNC, mononuclear cell.

Table 5. Number of cells and volume of sera used for CDC crossmatch by the participant laboratories (N=49)

No. of cells per well	Volume of sera per well (μL)	No. (%)
2,000-3,000	1	35 (71)
2,000-3,000	1.4	1 (2)
2,000-3,000	2	3 (6)
2,000-3,000	1 or 2*	1 (2)
2,000-5,000	1	1 (2)
2,000-5,000	2	1 (2)
3,000-4,000	1	2 (4)
3,000-5,000	1	2 (4)
5,000	2	1 (2)
7,000	2	1 (2)
8,000	1	1 (2)

*1 μL used for NIH and 2 μL used for AHG.

Abbreviation: CDC, complement-dependent cytotoxicity.

Table 6. Type of media and percentage of FCS used for serum dilution of CDC crossmatch by the participant laboratories (N=49)

Media	Percentage of FCS used, No. (%)							Total No. (%)
	0%	2%	3%	5%	10%	15%	20%	
RPMI 1640	6 (12)	3 (6)	1 (2)	16 (33)	8 (16)	2 (4)	1 (2)	37 (76)
IMDM				3 (6)			6 (12)	9 (18)
McCoy				2 (4)				2 (4)
PBS		1 (2)						1 (2)

Abbreviations: FCS, fetal calf serum; CDC, complement-dependent cytotoxicity; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; IMDM, Iscove's modified Dulbecco's media; PBS, phosphate buffered saline.

1640을 가장 많이 사용하고 있었다(Table 6). 건조 방지를 위해 well에 oil을 도포하는 기관은 37기관(76%), 도포하지 않는 기관은 12기관(24%)이었다.

CDC-XM 검사에서 공여자 자가대조를 시행하는 기관은 45기관(92%)이었고, 수여자 자가대조와 양성대조 및 음성대조를 시행하는 기관은 47기관(96%)이었다. T 세포와 B 세포의 순도를 측정하는 기관은 각각 4기관(8%), 9기관(18%)으로, 다수의 기관에서 T 세포와 B 세포의 순도를 측정하지 않고 있었다.

2) 배양 조건

T-CDC와 B-CDC를 함께 시행하고 있는 35기관 중 20기관(57%)에서는 두 가지 검사에 같은 보체를 사용하고 있었으며, 15기관(43%)에서는 다른 보체를 사용하고 있었다. 검사에 사용 전 보체의 역가 측정을 시행하고 있는 기관은 35기관(71%), 시행하지 않고 있는 기관은 14기관(29%)이었다. CDC-XM 검사방법 별 세포와 혈청 배양 조건과 보체 배양 조건을 Table 7에 정리하였다. T-CDC-NIH의 경우 실온 또는 37°C에서 30분 동안 세포와 혈청 배양 후 실온에서 60분 동안 보체 배양하는 기관이 41기관(91%)이었다. T-

Table 7. Incubation conditions of CDC crossmatch used by the participant laboratories (N=49)

CDC methods (N)	Cell and serum incubation		Complement incubation		No. (%)
	Temperature	Time, minutes	Temperature	Time, minutes	
T-CDC NIH (45)	RT	30	RT	60	29 (64)
	37°C	30	RT	60	12 (27)
	RT	60	RT	60	2 (4)
	RT	60	RT	90	1 (2)
	4°C and 37°C	30	RT	60	1 (2)
T-CDC Amos-wash (1)	RT	30	RT	60	1 (100)
T-CDC long incubation (10)	RT	60	RT	120	9 (90)
	RT	30	RT	120	1 (10)
T-CDC AHG (47)	RT	60	RT	120	29 (62)
	RT	30	RT	60	6 (13)
	RT	60	RT	90	4 (9)
	RT	30	RT	120	2 (4)
	37°C	60	RT	120	2 (4)
	RT	45	RT	60	1 (2)
	RT	60	RT	60	1 (2)
	RT	90	RT	90	1 (2)
	37°C	30	RT	120	1 (2)
	37°C	60	RT	120	22 (63)
B-CDC NIH (35)	37°C	60	RT	60	4 (11)
	37°C	30	RT	60	2 (6)
	RT	60	RT	120	2 (6)
	4°C and 37°C	60	RT	120	2 (6)
	RT	30	RT	60	1 (3)
	4°C	60	RT	120	1 (3)
	4°C	60	4°C	120	1 (3)
B-CDC Amos-wash (1)	37°C	60	RT	120	1 (100)
B-CDC AHG (2)	RT	60	RT	120	2 (100)

Abbreviations: CDC, complement-dependent cytotoxicity; NIH, National Institutes of Health; AHG, anti-human globulin; RT, room temperature.

CDC-AHG의 경우 실온에서 60분 동안 세포와 혈청 배양 후 실온에서 120분 동안 보체 배양하는 기관이 29기관(62%)이었다. B-CDC-NIH의 경우 37°C에서 60분 동안 세포와 혈청 배양 후 실온에서 120분 동안 보체 배양하는 기관이 22기관(63%)이었다. T-CDC-AHG를 시행하고 있는 47기관 중 anti-kappa 첨가 후 보체를 첨가하는 시간 간격이 최대 2분 이내인 기관이 43기관(91%)이었고, 3분 이내인 기관이 1기관(2%)이었다. 3기관(6%)에서는 anti-kappa와 보체의 혼합액을 사용하고 있었다.

CDC-XM 시행 시 추가로 dithiotheritol (DTT)을 처리한 혈청으로 검사하는 기관이 37기관(76%)이었다. 그 중 DTT 처리 혈청을 모든 환자에 대해서 검사하는 기관이 16기관(43%), 수여자 자가대조 양성 시에만 검사하는 기관이 13기관(35%), 수여자 또는 공여자 자가대조 양성 시 검사하는 기관이 4기관(11%)이었다. 그 외 B-CDC-XM상 양성인 경우 시행하는 기관이 2기관(5%), 공여자 자가

Table 8. Number of cells and volume of sera used for flow cytometry crossmatch by the participant laboratories (N=30)

No. of cells per tube	Volume of sera per tube (μL)	No. of cells/1 μL serum	No. (%)
50,000	5	10,000	1 (3)
100,000	20	5,000	2 (7)
100,000-150,000	50	2,000-3,000	3 (10)
130,000	100	1,300	1 (3)
200,000	50	4,000	3 (10)
200,000-300,000	20	10,000-15,000	4 (13)
200,000-300,000	25	8,000-12,000	3 (10)
200,000-300,000	30	6,667-10,000	1 (3)
200,000-300,000	50	4,000-6,000	3 (10)
200,000-300,000	70	2,857-4,286	1 (3)
200,000-300,000	100	2,000-3,000	1 (3)
300,000	25	12,000	1 (3)
300,000-500,000	50	6,000-10,000	1 (3)
500,000	25	20,000	1 (3)
500,000	50	10,000	3 (10)
500,000	100	5,000	1 (3)

대조 양성 시와 FCXM 음성인면서 CDC-XM 양성인 경우 시행하는 기관이 각각 1기관(3%)이었다.

3) 결과의 판독

CDC-XM에서 염색법은 34기관(69%)에서 Eosin Y 염색을, 12기관(25%)에서 형광염색을, 3기관(6%)에서 Trypan blue 염색을 사용하고 있었다. CDC-XM 결과 판독 시 죽은 세포를 퍼센트로 기록하는 기관이 27기관(55%), score로 기록하는 기관이 18기관(37%)이었고, 퍼센트와 score를 함께 기록하는 기관이 4기관(8%)이었다. 양성 판정은 퍼센트만 사용하여 판정하는 경우가 37기관(76%)이었었는데, 이는 10기관에서 기록은 score로 하지만 판독은 퍼센트로 하기 때문이었다. 퍼센트로만 양성 판정을 하는 기관에서는 죽은 세포가 20% 이상일 경우 양성으로 판정하는 기관이 20기관(54%)으로 가장 많았고, 10%가 12기관(32%), 15%가 5기관(14%) 순이었다. Score로만 판정하는 기관은 score가 4점 이상인 경우 양성으로 판정하는 기관이 5기관(63%), 2점 이상인 경우가 3기관(38%)이었다. 퍼센트와 score를 함께 기록하는 4기관의 경우 3기관에서는 죽은 세포 20%와 score가 4점 이상인 경우, 1기관에서는 죽은 세포 20%와 score가 2점 이상인 경우 양성으로 판정한다고 답하였다.

4. 유세포 교차시험(FCXM)의 검사방법 및 시행

1) 세포와 혈청

FCXM을 시행하고 있는 30기관의 답변을 분석하였다. FCXM 시행 시 CDC-XM과 세포 부유액을 동일하게 사용하는 기관이 20기

Table 9. Incubation conditions of flow cytometry crossmatch used by the participant laboratories (N=30)

Cell and serum incubation		Conjugate incubation		No. (%)
Temperature	Time, minutes	Temperature	Time, minutes	
RT	15	RT	20	1 (3)
RT	20	RT	20	4 (13)
RT	20	4°C	30	2 (7)
RT	30	RT	15	1 (3)
RT	30	RT	20	5 (17)
RT	30	RT	30	3 (10)
RT	30	4°C	20	2 (7)
RT	30	4°C	30	5 (17)
RT	60	RT	45	1 (3)
RT	30*/60 [†]	RT	30*/60 [†]	1 (3)
37°C	20	RT	20	2 (7)
37°C	20	RT	30	1 (3)
37°C	30	4°C	30	2 (7)

*T cell incubation time; [†]B cell incubation time.
Abbreviation: RT, room temperature.

관(67%), 다르게 사용하는 기관이 9기관(30%)이었으며, CDC-XM을 시행하지 않는 1기관(3%)은 5% FCS-RPMI를 세포부유액으로 사용하고 있었다.

T-FCXM에 사용하는 세포 수와 혈청 양을 Table 8에 정리하였다. 튜브당 세포 수는 50,000개에서 500,000개로 범위가 다양하였으나, 200,000-300,000개의 세포를 사용하는 기관이 17기관으로 57%를 차지하였다. 사용하는 혈청 양은 5-100 μL였고, 튜브당 반응시키는 혈청 1 μL당 세포 수는 1,300-20,000개의 분포를 보였다. B-FCXM 시행 시 세포 수와 혈청 양을 T-FCXM과 동일하게 사용한다고 답한 기관은 15기관(65%), 다르게 사용한다고 답한 기관은 8기관(35%)이었다. 세포에 pronase 처리를 하는 기관은 14기관(61%), 하지 않는 기관이 9기관(39%)이었다. Pronase 처리를 하는 14기관에서 사용하는 pronase의 최종농도는 0.5 mg/mL (6기관), 1 mg/mL (6기관), 2 mg/mL (2기관) 순이었으며, 37°C에서 15-30분 동안 처리한다고 답하였다.

2) 배양 조건

FCXM의 형광염색 배양 조건을 Table 9에 정리하였다. 세포와 혈청 배양 조건과 형광 접합체 배양 조건은 다양하였으나, 세포와 혈청 배양의 경우에는 실온에서 30분이 17기관(57%)으로 가장 많았고 형광 접합체 배양의 경우에는 실온에서 20분이 12기관(40%)으로 가장 많았다. 세포와 혈청 배양 후 세척은 2-4회, 접합체 배양 후 세척은 1-3회로 시행하고 있었다. 세척 시 상층액을 제거하는 방법으로는 튜브를 뒤집어 제거하는 기관이 18기관(60%)으로 가장 많았고, vacuum aspirator나 파이펫을 이용하여 제거하는 기관이 11기관(37%), microplate를 털어서(flick off) 제거하는 기관이 1

Table 10. Analysis of flow cytometry crossmatch results by the participant laboratories (N=30)

FC methods (N)	MFI ratio (log)	MCS (channel)	Channel ratio (channel)	% Dead cell (7-AAD)	No. (%)
T-FC (30)	+	-	-	-	23 (77)
	+	+	-	-	2 (7)
	-	-	+	-	2 (7)
	-	+	-	-	1 (3)
	-	+	+	-	1 (3)
	+	+	+	-	1 (3)
B-FC (23)	+	-	-	-	17 (74)
	+	+	-	-	2 (9)
	-	-	-	+	2 (9)
	+	+	+	-	1 (4)
	-	-	+	-	1 (4)

Abbreviations: FC, flow cytometry; MFI, median fluorescence intensity; MCS, median channel shift; 7-AAD, 7-aminoactinomycin D.

기관(3%)이었다. 세포와 세척액을 섞을 때에는 vortexing을 사용하는 기관이 22기관(73%)으로 가장 많았고, 파이펫을 사용해 섞는 기관이 6기관(20%), vortexing과 파이펫을 같이 사용하는 기관이 2기관(7%)이었다.

3) 결과의 해석

FCXM 결과 분석시 사용하는 유세포 분석기로는 Beckman Coulter사의 Cytomix FC500이 13기관(43%)으로 가장 많았으며, Becton Dickinson사의 FACS Canto II 7기관(23%), Beckman Coulter사의 Navios 6기관(20%), Becton Dickinson사의 FACSCalibur 4기관(13%) 순이었다. FCXM 결과 분석 시 획득(acquisition) 하는 세포 수(T-FCXM의 경우 총 세포 수, B-FCXM의 경우 B 세포 수)에 대해 조사한 결과, T-FCXM의 경우 총 10,000개의 세포를, B-FCXM의 경우 5,000개의 B 세포를 획득한다고 답한 기관이 각각 10기관(34%)과 7기관(30%)으로 가장 많았다. 그러나 획득하는 세포 수의 분포(T-FCXM, 1,000-1,500,000개; B-FCXM, 300-20,000개)로 볼 때 T-FCXM에서 T 세포 수를, B-FCXM에서 총 세포 수를 답한 기관이 소수 포함되어 있을 가능성이 있는 것으로 판단된다. 또한 T-FCXM에서 획득하는 세포 수를 따로 설정하지 않고, 상대적으로 적은 B 세포 수를 기준으로 하고 있다고 답한 기관도 1기관 있었다.

FCXM의 결과 판정을 위해 사용하는 형광값 판독 방법을 Table 10에 제시하였다. Log 형광값을 이용해 계산한 median fluorescence intensity (MFI) ratio와 channel 형광값을 이용해 계산한 median channel shift (MCS) 또는 channel ratio 중 어느 것을 사용하는지 설문조사 하였는데, T-FCXM의 경우 30기관 전부에서, B-FCXM의 경우 23기관 중 21기관(91%)에서 위 세가지 방법 중 하나 또는 그 이상을 사용한다고 답하였다. B-FCXM 결과 판정에서 2기관(9%)에서는 7-aminoactinomycin D (7-AAD)를 이용하여 죽은 세포의 퍼

Table 11. Cut-off values of log MFI ratio for positive flow cytometry crossmatch by the participant laboratories (N=26)

FC methods (N)	Cut-off	No. (%)
T-FC (26)	1.1	1 (4)
	1.2	4 (15)
	1.3	2 (8)
	1.44	1 (4)
	1.5	2 (8)
	1.6	1 (4)
	1.8	1 (4)
	2	13 (50)
	1.5-2	1 (4)
B-FC (20)	1.1	1 (5)
	1.4	2 (10)
	1.5	1 (5)
	1.7	1 (5)
	1.8	1 (5)
	2	10 (50)
	2.35	1 (5)
	2.7	1 (5)
	3	1 (5)
	1.5-2	1 (5)

Abbreviations: MFI, median fluorescence intensity; FC, flow cytometry.

센트를 결과 판정에 사용한다고 답하였다. 결과 판정을 위하여 log MFI ratio를 사용하는 기관수는 T-FCXM 경우 26기관(87%), B-FCXM 경우 20기관(87%)이었고, 양성 판정 기준은 Table 11과 같다. 양성 판정에 이용되는 MFI ratio 값은 기관에 따라 차이를 보였는데 T-FCXM의 경우 1.1-2, B-FCXM의 경우 1.1-3 사이에 분포하였다.

고 찰

국내 HLA 검사 신빙도조사 중 HLA-XM에 참여하고 있는 기관 수는 2015년 설문 조사 시 51기관으로, 이는 1993년 18기관, 1995년 29기관, 1997년 34기관, 2005년 44기관에 비교하여 보았을 때 꾸준히 증가하고 있음을 알 수 있다[9-12]. HLA-XM에서 예민한 검사법을 시행하고 있는 기관 수도 증가하였는데 T-CDC-XM에서 AHG를 시행하는 기관(47/49, 96%)과 FCXM을 시행하는 기관(30/50, 60%)이 모두 2005년 조사(AHG CDC-XM, 35/43, 81%; FCXM, 7/44, 16%)에 비하여 현저히 증가하였다[12]. FCXM의 경우 CDC-XM으로 검출하기 어려운 아주 적은 양의 공여자 특이 항HLA 항체를 검출할 뿐 아니라, 비교적 빠른 시간 내에 검사가 이루어지므로 사용하는 기관 수가 점차 늘고 있는 추세이다[13, 14]. 외국, 특히 북미 지역에서는 CDC-XM을 실시하지 않고 FCXM만을 실시하는 기관이 증가하고 있으나 국내에서는 FCXM을 실시하는 30개 기관 중 한 기관을 제외한 29기관이 CDC-XM을 병용해 사용하는 것으로 나타났다. 최근 낮은 역가의 공여자 특이 항체도 이식 후 합병증의

원인으로 그 중요성이 높아지고 있으며 급성 거부반응뿐 아니라 장기간의 이식생존율과도 연관성이 보고되고 있다[15-17]. 또한 다양한 이식전 유도면역억제요법 및 탈감작 치료법[18-20]이 시도되면서 FCXM과 같이 충분히 민감도가 높은 교차시험만을 시행하여 그 임상적 의의를 부여하는 이식 의료가관이 증가 추세에 있는 것으로 판단된다.

CDC-XM 검사에서 T 및 B 림프구를 분리하는 방법으로 2005년 이전까지는 nylon wool column법을 보편적으로 사용하였다. 현재도 nylon wool column법이 많이 이용되고는 있으나 최근에 개발된 negative selection을 사용하는 기관이 43% (T-CDC, 21/49, 43%; B-CDC 15/35, 43%)에 달하는 것으로 조사되었다(Table 4). T-CDC-XM에서 T 림프구를 분리하지 않고, 총 림프구나 ficoll을 이용하여 분리한 단핵세포를 사용하는 기관이 2005년에는 43기관 중 8기관(19%)이었는데, 이번 조사에서는 49기관 중 15기관(31%)으로 약간 증가하였지만 이 중에는 negative selection을 이용하는 7기관(14%)이 포함되어 있다. T 림프구와 B 림프구를 분리하지 않은 상태에서 검사를 실시하여 T-CDC-XM 또는 B-CDC-XM 결과를 보고하게 되면 어떤 class의 항HLA 항체인지를 정확하게 판별하기가 어려울 수 있다. CDC-XM에서 class I과 class II 항HLA 항체에 의한 반응을 구분지어 해석하기 위해서는 T 림프구와 B 림프구를 분리하여 교차시험을 시행하는 것이 필요하다.

CDC-XM에서 세포와 혈청 배양 온도는 T-CDC의 경우 실온, 37°C, 4°C를, B-CDC의 경우 실온, 37°C를 사용할 수 있다[21]. 본 조사에서 T-CDC-XM (NIH)의 경우 실온을 이용하는 검사실이 더 많았지만 일부 기관(13/45, 29%)에서는 37°C 배양을 하는 것으로 조사되었다(Table 7). 이번 설문 조사에서 B-CDC-XM의 경우 대부분의 기관에서 37°C 배양을 하는 것으로 조사되었지만 4°C에서만 배양하는 기관이 소수(2/35, 6%) 있었다. 그러나 4°C B-CDC-XM에만 양성 반응을 보이는 항체는 이식 성적과 무관한 비특이적 자가항체의 가능성이 있으므로[22], 해당 검사실에서는 그 해석에 주의가 필요하겠다.

ASHI의 CDC-XM 양성 판정 기준은 score 2 (음성대조 대비 죽은 세포가 11% 이상인 경우)로 제시하고 있다[21]. 이번 조사에서는 퍼센트로 판정하는 기관의 54% (20/37)가 죽은 세포 20% 이상을, score로 판정하는 기관의 63% (5/8)가 score 4 (죽은 세포 21-50% 해당) 이상을 양성 판정 기준으로 답하였다. 이러한 기준이 음성대조의 죽은 세포 %를 빼고 판독한 결과라면 양성 판정 기준이 위의 ASHI 기준보다 약간 높은 것이다. 따라서 약한 양성을 음성으로 판정할 소지가 있으므로 각 기관에서 사용하는 양성 판정 기준에 대한 재검토가 필요하다고 판단된다.

그 외에 본 조사를 통하여 일부 기관에서 CDC-XM 검사를 실시하는데 있어서 일부 문제점이 파악되었고, 이를 개선할 필요가 있

는 것으로 나타났다. 첫째, 양성대조와 음성대조를 반드시 포함하여 검사해야 하는데 소수 기관(2/49, 4%)에서는 두 가지 대조를 검사에 포함하지 않는 것으로 조사되었다. 양성대조에서는 모든 검사에서 세포 독성 반응이 나타나야 하고, 음성대조에서는 세포가 90% 이상의 생존율을 보여야 검사의 정확성을 확인할 수 있으므로[2], 이들 기관에서는 두 가지 대조를 반드시 포함해 검사하도록 개선이 필요하겠다. 둘째, CDC-XM 검사 과정 중 반응시키는 세포와 혈청의 건조 방지를 위해 well에 oil을 도포해야 하는데[2], 상당수 기관(12/49, 24%)에서 oil을 도포하지 않고 검사를 실시하는 것으로 나타났다. 이들 기관에서는 건조방지를 위한 대책으로 젖은 거즈로 습도를 유지하거나 film을 부착하는 방법을 사용하고 있었는데 oil을 사용하도록 개선할 필요가 있겠다.

FCXM 검사에서도 사용하는 세포 수와 혈청의 비율이 중요한데, 이는 세포 수를 정확하게 세지 못하여 혈청 양에 비해 지나치게 많은 세포를 반응시킬 경우에는 위음성 결과를 초래할 수 있기 때문이다[23]. ASHI 매뉴얼에서는 튜브당 500,000개의 세포(30 μ L 부유액)에 혈청 30 μ L를 반응시켜 혈청 1 μ L당 약 17,000개의 세포를 반응시키는 검사방법을 제시하고 있다[23]. 이번 조사에서 FCXM을 시행하고 있는 30개 기관 중 세포 수를 300,000개 이하로 사용하는 기관이 대부분이었으며(24기관, 80%), 100,000개 이하로 사용하는 기관도 3기관(10%)이 있었다(Table 8). 혈청 1 μ L당 반응시키는 세포 수는 21기관(70%)에서 5,000개에서 20,000개 사이를, 9기관(30%)에서 5,000개 미만을 사용하는 것으로 나타나 혈청 양에 비해 너무 많은 세포 수(혈청 1 μ L당 세포 수 20,000개 초과)를 사용하는 문제는 없는 것으로 판단된다. 다만 한 기관 내에서 동일한 민감도를 유지하기 위해서는 매번 검사 시에 세포 수를 정확히 산정하여 사용하는 세포 수와 혈청의 비율을 일정하게 유지할 필요가 있겠다. 또한 세포부유액의 양과 혈청 양에 따라 혈청이 희석되는 정도가 달라 예민도에 영향을 미칠 수가 있는데, ASHI 매뉴얼에서는 두 가지를 동량을 사용하는 방법을 제시하고 있다[23].

B-FCXM은 B 세포의 표면에 존재하는 Fc 수용체와 반응하는 비특이적 면역글로불린으로 인하여 T-FCXM보다 형광 반응 정도가 강하고, 세포표면마커에 대한 항체 치료(예. Anti-CD20, rituximab)를 받을 경우 위양성 결과를 초래할 수 있다[24]. B-FCXM의 예민도와 특이도를 높이기 위해 많은 검사실에서는 세포 표면의 Fc 수용체를 제거하는 단백질 분해효소인 pronase를 사용한다[25-28]. 그 외에도 검사 전 혈청을 가열하여 혈청 내의 면역복합체를 제거해 B 세포의 Fc 수용체와의 비특이적 결합을 방지하는 열불활성화 방법을 이용하기도 한다[28-30]. 이번 조사에서는 B-FCXM을 실시하는 23기관 중 14기관(61%)에서 pronase 처리를 한다고 답하였고, pronase 최종농도는 검사실에 따라 0.5 mg/mL (6기관), 1 mg/mL (6기관), 2 mg/mL (2기관)을 사용하는 것으로 나타났다.

적정 pronase 농도에 대해서 정해진 지침은 없으나 pronase 처리를 한 혈청으로 T-FCXM을 시행하게 되면 간혹 위양성을 초래할 수도 있으므로 pronase 적정 농도의 결정이나 결과 해석 시에 주의하여야 하겠다[31, 32].

FCXM의 결과 해석은 log 형광값을 이용하는 경우와 channel 형광값을 이용하는 경우가 서로 다르다. FCXM의 양성 및 음성 판정에서 log 형광값을 이용하는 경우 검사한 검체의 형광값을 음성대조(AB형 혈청)의 형광값으로 나눈 비율인 MFI ratio를 사용하고, channel 형광값을 이용하는 경우 검사한 검체의 형광값에서 음성대조의 형광값을 뺀 MCS로 판정하게 된다. 본 조사에서 특이한 점은 channel 형광값을 사용하면서 결과를 ratio (channel ratio)로 잘못 판정하는 기관(T-FCXM 4기관, B-FCXM 2기관)과 B-FCXM에서 보체를 이용한 CDC 검사를 진행하고 7-AAD 염색을 이용하여 죽은 세포 %로 판정하는 기관(2기관)이 소수 있었다는 점이다(Table 10). FCXM의 양성 판정 기준은 각 검사실에 따라 다르겠으나 ASHI에서는 1024 channel을 이용한 대략적인 양성 판정 MCS 값으로 T-FCXM의 경우 40-60을, B-FCXM의 경우 100-120을 제시하고 있다[23]. 이러한 양성 판정 기준은 log 형광값을 이용한 MFI ratio로는 T-FCXM의 경우 1.4-1.7에, B-FCXM의 경우 2.5-2.9에 해당하는 값이다. 이번 조사에서는 국내 각 검사실의 MFI ratio 양성 판정 기준이 상당히 다양하여 T-FCXM의 경우 1.1-2.0 사이에 분포하고 대부분(19/26, 73%)에서 1.4 이상을, B-FCXM의 경우 1.1-3.0 사이에 분포하고 대부분(15/20, 75%)에서 1.8 이상을 사용하는 것으로 나타났다(Table 11). 양성 판정 기준이 너무 낮으면 양성 및 음성의 판정이 부정확하게 될 수도 있는데 소수의 기관에서 사용하는 양성 판정 기준(예. T-FCXM, ratio 1.3 이하; B-FCXM, ratio 1.5 이하)은 너무 낮은 것으로 생각된다. FCXM은 CDC-XM에 비하여 결과값을 객관적으로 정량화 할 수 있는 장점이 있지만[4], 기관별 검사 조건이나 판정 기준이 상당히 다르고 검사자간 변이에 의한 영향도 적지 않다. 각 기관에서는 검사 시약 특히 음성대조가 변경될 때 적절히 양성 판정 기준을 재설정하고, FCXM 결과와 HLA 항체 검사에서 항체가(형광값)의 연관성이나 이식 환자에서 임상적 연관성 등에 대한 검토가 필요하겠다.

이번 설문조사를 통하여 기관 간 HLA-XM 시 사용하는 세포의 종류와 수, 세포와 혈청의 배양 온도 및 시간, 세척 횟수 및 방법, 양성 판정 기준 등에 상당한 차이가 있음을 확인하였다. 이러한 요소들이 검사의 민감도에 영향을 주어 외부 정도관리 결과에서 같은 양성으로 보고한 경우라도 다양한 역가를 보이거나, 잘못된 위 음성 결과를 내는데 작용하였을 것으로 판단된다. HLA-XM의 결과에 따라 장기이식 여부가 결정됨은 물론 치료방침의 결정 및 예후에 영향을 미치므로 최적의 민감도와 특이도를 유지하는 것은 매우 중요하며, 장기이식, 특히 뇌사자 이식에서는 여러 의료기관

의 검사실과 임상과가 연계되어 이식 절차가 진행되므로 검사실 간의 결과 차이를 줄이는 것이 필수적이다. 이미 ASHI와 College of American Pathologists (CAP)에서도 HLA-XM을 시행하는 검사실 간의 결과의 차이에 대한 문제점을 지적하였고, 표준화에 대한 중요성과 필요성을 강조해왔다[33]. 그러므로 국내에서도 HLA-XM의 표준화 작업을 통하여 검사 결과의 정확성과 신뢰도를 높이기 위한 노력을 지속적으로 하여야 할 것이다.

요 약

배경: HLA 교차시험(HLA crossmatch, HLA-XM) 표준화를 위한 설문조사의 자료를 분석하여 HLA-XM을 시행하는 국내 기관의 현황을 파악하고, 나아가 HLA-XM의 표준화를 이루기 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다.

방법: 2015년 8월을 기준으로 국내 HLA 검사 신빙도조사 중 HLA-XM에 참여하고 있는 51개의 의료기관을 대상으로 설문조사를 시행하여, 응답한 50개 기관을 대상으로 결과를 분석하였다. 설문 항목은 1) 시행 중인 HLA-XM 종류와 연간 검사 건수, 2) HLA-XM에 사용하는 검체의 종류와 림프구 분리방법, 3) 보체의존성 세포독성 교차시험(complement-dependent cytotoxicity crossmatch, CDC-XM) 및 유세포분석 교차시험(flow cytometry crossmatch, FCXM)의 검사방법 및 시약에 대해 조사하였다.

결과: Anti-human globulin (AHG) CDC-XM (47/49, 96%)과 FCXM (30/50, 60%)을 시행하고 있는 기관은 2005년 설문조사(AHG CDC-XM, 35/43, 81%; FCXM, 7/44, 16%)에 비해 현저히 증가하였다. 연간 검사건수에서 50% 이상의 기관이 50건 이하를 실시하는 소규모 검사실에 속했고, 연간 500건을 넘는 검사를 실시하는 곳은 10%에 불과했다. 세포 분리방법에 있어서는 CDC-XM을 실시하는 기관의 43% (21/49)에서 negative selection 방법을 사용하고 있었다. 혈청 1 μ L당 반응시키는 세포 수는 CDC-XM (1,000-8,000)과 FCXM (1,300-20,000) 모두에서 넓은 범위의 분포를 보였다. FCXM의 결과 판정에서 log 형광값 비율(log fluorescence ratio)을 사용하는 기관(26/30, 87%)이 channel shift 값을 사용하는 기관(5/30, 17%)에 비해 더 많았다.

결론: CDC-XM과 FCXM 모두에서 서로 다른 기관에서 사용하는 검사방법이나 판정 기준에 상당한 차이가 있는 것이 확인되었다. 기관별 검사결과의 차이를 줄이기 위하여 HLA-XM의 표준화 작업을 지속적으로 시행하여야 할 것이다.

검사의 글

본 설문에 성실히 응답해 주신 전국 HLA 검사실 검사책임자 및

실무담당자분들께 깊은 감사를 전합니다.

REFERENCES

- Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013;95:19-47.
- Hopkins KA. The basic lymphocyte microcytotoxicity tests: standard and AHG enhancement. In: Hahn AB, Land GA, Strothman RM, eds. *ASHI laboratory manual*. 4th ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000: I.C.1.1-I.C.1.7.
- Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM. The flow cytometric crossmatch. Dual-color analysis of T cell and B cell reactivities. *Transplantation* 1989;48: 834-40.
- Scornik JC, Bray RA, Pollack MS, Cook DJ, Marrari M, Duquesnoy R, et al. Multicenter evaluation of the flow cytometry T-cell crossmatch: results from the American Society of Histocompatibility and Immunogenetics-College of American Pathologists proficiency testing program. *Transplantation* 1997;63:1440-5.
- Gebel HM and Bray RA. Sensitization and sensitivity: defining the unsensitized patient. *Transplantation* 2000;69:1370-4.
- Bray RA, Pollack MS, Gebel HM. The HLA System. In: Fung MK, Grossman BJ, et al. eds. *Technical manual*. 18th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2014:475-97.
- Park MH, Whang DH, Kim BC. A two-year study on the HLA typing proficiency survey in Korea, 1996-1998. *Korean J Clin Pathol* 1999;19: 714-22.
- Park MH, Kim BC, Han BY. Results of the HLA typing proficiency survey in Korea, 2000-2002. *Korean J Lab Med* 2005;25:329-39.
- Park MH. A questionnaire survey of HLA laboratories in Korea (1993). *J Korean Soc Transplant* 1993;7:245-8.
- Park MH and Yang YS. A questionnaire survey of HLA laboratories in Korea (1995). *Korean J Lab Med* 1996;16:987-1000.
- Park MH and Whang DH. A questionnaire survey of HLA laboratories in Korea (1997). *Korean J Lab Med* 1998;18:650-9.
- Lim JH, Hwang SH, Oh HB. A questionnaire survey of HLA laboratories in Korea (2005). *Korean J Lab Med* 2005;25:425-33.
- Tinckam K. Histocompatibility methods. *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23:80-93.
- Ayna TK, Soyoz M, Kurtulmus Y, Dogan SM, Ozyilmaz B, Tugmen C, et al. Comparison of complement-dependent cytotoxic and flow-cytometry crossmatch results before cadaveric kidney transplantation. *Transplant Proc* 2013;45:878-80.
- Tian J, Li D, Alberghini TV, Rewinski M, Guo N, Bow LM. Pre-transplant low level HLA antibody shows a composite poor outcome in long-term outcome of renal transplant recipients. *Ren Fail* 2015;37:198-202.
- Mongkolsuk T, Ingsathit A, Worawichawong S, Jirasiritham S, Kitpoka P, Thammanichanon D. Shared molecular eplet stimulates acute antibody-mediated rejection in a kidney transplant recipient with low-level donor-specific antibodies: a case report. *Transplant Proc* 2014;46:644-7.
- Wu P, Jin J, Everly MJ, Lin C, Terasaki PI, Chen J. Impact of alloantibody strength in crossmatch negative DSA positive kidney transplantation. *Clin Biochem* 2013;46:1389-93.
- Bachler K, Amico P, Honger G, Biemann D, Hopfer H, Mihatsch MJ, et al. Efficacy of induction therapy with ATG and intravenous immunoglobulins in patients with low-level donor-specific HLA-antibodies. *Am J Transplant* 2010;10:1254-62.
- Kute VB, Vanikar AV, Trivedi HL, Shah PR, Gopani KR, Patel HV, et al. Desensitization protocol for highly sensitized renal transplant patients: a single-center experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2011;22:662-9.
- Jeong JC, Jambaldorj E, Kwon HY, Kim MG, Im HJ, Jeon HJ, et al. Desensitization using bortezomib and high-dose immunoglobulin increases rate of deceased donor kidney transplantation. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e2635.
- Saiz PA and Blanck CE. Lymphocyte crossmatch: extended incubation and antiglobulin augmented. In: Hahn AB, Land GA, Strothman RM, eds. *ASHI laboratory manual*. 4th ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000:I.C.9.1-I.C.9.5.
- Lou C and Garovoy MR. Current crossmatch techniques. In: Moulds JM, Fawcett KJ, Garner RJ, eds. *Scientific and technical aspect of the major histocompatibility complex*. Arlington: American Association of Blood Banks, 1989:187-205.
- Hamrick CW and Lebeck LK. Flow cytometric T and B cell crossmatching. In: Hahn AB, Land GA, Strothman RM, eds. *ASHI laboratory manual*. 4th ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000:VI.B.4.1-VI.B.4.5.
- Book BK, Agarwal A, Milgrom AB, Bearden CM, Sidner RA, Higgins NG, et al. New crossmatch technique eliminates interference by humanized and chimeric monoclonal antibodies. *Transplant Proc* 2005; 37:640-2.
- Lobo PI, Spencer CE, Isaacs RB, McCullough C. Hyperacute renal allograft rejection from anti-HLA class 1 antibody to B cells--antibody detection by two color FCXM was possible only after using pronase-

- digested donor lymphocytes. *Transpl Int* 1997;10:69-73.
26. Vaidya S, Cooper TY, Stewart D, Gugliuzza K, Daller J, Bray RA. Pronase improves detection of HLA antibodies in flow crossmatches. *Transplant Proc* 2001;33:473-4.
27. 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.
28. Lee YS and Won DI. Analysis of positive flow cytometric crossmatch in organ transplantation. *Lab Med Online* 2011;1:43-50.
29. Ta M and Scornik JC. Improved flow cytometric detection of donor-specific HLA class II antibodies by heat inactivation. *Transplantation* 2002;73:1611-4.
30. Al-Muzairai IA, Mansour M, Almajed L, Alkanderi N, Alshatti N, Samhan M. Heat inactivation can differentiate between IgG and IgM antibodies in the pretransplant cross match. *Transplant Proc* 2008;40:2198-9.
31. Hetrick SJ, Schillinger KP, Zachary AA, Jackson AM. Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. *Hum Immunol* 2011;72:330-6.
32. Park H, Lim YM, Han BY, Hyun J, Song EY, Park MH. Frequent false-positive reactions in pronase-treated T-cell flow cytometric cross-match tests. *Transplant Proc* 2012;44:87-90.
33. Duquesnoy RJ and Marrari M. Multilaboratory evaluation of serum analysis for HLA antibody and crossmatch reactivity by lymphocytotoxicity methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:149-56.