

# 신생아에서 직접항글로불린 강양성을 보인 D 혈액형 위음성 1예

## A Case of the False-negative D Phenotype in a Neonate with a Strongly Positive Direct Antiglobin Test Rest

정유석 · 임영애

Yu Soek Jung, M.D., Young Ae Lim, M.D.

아주대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Accurate D antigen blood typing is needed owing to the clinical importance of the Rh blood group. We describe a female infant who was suspected to suffer from Rh incompatible hemolytic disease of the newborn, and who showed a strong positive direct antiglobin test (DAT) result and false red blood cell (RBC) agglutination in D typing. Using chloroquine dissociation of IgG, we confirmed that the antibodies coating her RBCs were of anti-D type. D typing with 0.8% RBC suspensions in saline using saline gel cards showed 2+ RBC agglutinations. After increasing the incubation time of dissociation by chloroquine for up to 4 hr, the dissociated RBCs began to show agglutination in both the tube technique (2+) and the gel card technique (4+) for D typing, although the DAT rest was still positive. Therefore, in order to prevent mistyping as a false-negative D blood group, whenever the D blood typing of a patient with a strong positive DAT rest does not show RBC agglutination, retesting of the D blood typing is recommended by using saline-suspended RBCs or dissociated RBCs.

**Key Words:** Hemolytic disease, Rh incompatibility, D blood typing, Direct antiglobin test, Chloroquine

## 서 론

ABO 혈액형 항원 다음으로 강한 면역원성(immunogenicity)을 가지고 있는 D 항원은 신생아태아용혈질환, 부적합 수혈, 자가면역용혈빈혈 등을 초래할 수 있으므로 임상적으로 매우 중요하다. 따라서 응급으로 수혈을 하는 경우가 있더라도, 반드시 ABO 및 D 혈액형 검사는 수혈 전에 필수적으로 실시하여 혈액을 출고하고 있다.

항-D 혈청을 이용한 D 항원 검사상 응집을 보이지 않더라도 환

자가 약-D형 혈액형일 수 있으므로 이에 대한 검사가 필요하다. 특히, 약-D형 현혈혈액을 D 항원 음성으로 잘못 판단하여 D 음성 환자에게 수혈할 경우 항-D 항체를 유발할 수 있으므로 현혈혈액인 경우에는 반드시 약-D 혈액형 검사를 실시하여야 한다[1]. D 항원 검사 상 응집을 보이지 않는 수혈 환자의 경우에는 D 음성으로 간주하는 것이 안전하기 때문에 굳이 약-D 검사를 실시할 필요는 없다. 그러나 D 음성인 산모가 태아를 출산할 때 태어난 신생아의 정확한 D 혈액형 및 신생아가 가지고 있는 항-D 항체의 유무에 따라서 D 면역글로불린의 계속적인 투여 여부가 결정되므로 이러한 산모에서 태어난 신생아에서는 반드시 약-D 혈액형 검사까지 포함해서 정확한 D 혈액형을 확인하여야 한다[2]. 직접항글로불린검사(Direct antiglobin test, DAT)가 양성인 경우에는 D 항원이 음성인 경우에도 약-D 검사에서 위양성 결과가 나올 수 있기 때문에 주의할 요하여야 한다[3]. 반면 산모에서 유래된 항-D 항체가 D 양성인 신생아의 적혈구를 둘러 싸서 DAT가 강양성을 보이는 경우에는 시약용 항-D 항체가 적혈구의 D 항원과 반응할 수 없게 하여 오히려 D 혈액형검사에서 위음성을 보일 수 있는 것으로 되어 있다[3]. 그러나 국내의 D 음성 혈액형의 비율이 서양에 비해서 상대적으로 낮고[4], 신생아태아용혈질환 예방을 위한 산모와 신생아에 대

**Corresponding author:** Young Ae Lim

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine,  
164 Worldcup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea  
Tel: +82-31-219-5786, Fax: +82-31-219-5778, E-mail: limyoung@ajou.ac.kr

Received: December 10, 2014

Revision received: July 8, 2015

Accepted: July 28, 2015

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

© 2016, 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/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한 조치가 잘 되고 있어 이에 대한 발생률이 급감하고 있기 때문에 [5], 신생아태아용혈질환 환자의 D 혈액형 검사에서 DAT 강양성으로 인한 D 혈액형 위음성의 사례는 아직까지 국내에서는 보고된 적이 없다. 이에 본 연구자들은 이러한 D 위음성의 사례를 경험하였기에 문헌 고찰과 함께 보고하고자 한다.

## 증 례

개인산부인과의원에서 39주 3,580 g으로 태어난 여환아는 태어난 지 12시간 안에 고빌리루빈혈증 및 호흡곤란을 주소로 본원으로 전원되었다. 내원 시 산소 마스크를 통해 산소 3 L 투여되고 있었고, 동맥혈 산소포화도는 97%, 분당 심장박동수는 156회, 분당 호흡수는 52회였으며, 피부는 전신적으로 황달색이면서 복부와 등 부위에 점상 출혈이 있었다. 그리고 TBA-200FR NEO (Toshiba Medical System Corporation, Tochigi-ken, Japan) 장비와 Labmaster T-BIL (Hanlab Co., Ltd., Cheongju, Korea) 시약으로 측정된 환자의 총 빌리루빈은 14.7 mg/dL로 고빌리루빈혈증 소견을 보였다. 황달의 치료로 우선 광선요법을 실시하였으나, 환자의 총빌리루빈은 16.6 mg/dL로 증가되었으며, 쇼어(shower)를 통하여 산소가 5 L 투여 되었지만, 동맥혈 산소포화도는 90% 이하로 감소하여, 교환수혈이 필요할 정도로 임상 증상이 심각해졌다.

환아가 전원될 때 산모가 같이 동행하지 않았고, 산모의 혈액 검체가 환아와 같이 이송되지 않았으므로, 본원에서는 산모의 검체를 얻을 수 없었다. 그러나 환아 진료의뢰서를 통하여 산모는 D 음성 혈액형이며, 환아는 둘째 아이였으며, 첫째 아이는 D 양성이고, 출산 시 산모가 정상적으로 D 면역글로불린을 투여 받은 사실을 확인할 수 있었다. 응급으로 교환수혈을 해야 할 필요성이 있다고 판단되어, 확보되지 않은 산모의 혈액 대신 환자의 혈액으로 혈액형 검사와 교차시험을 실시하여 교환수혈 혈액을 선택하려고 하였다.

환아의 3% 혈청 적혈구부유액으로 시험관법을 이용하여 혈액형 검사를 하였는데, ABO 혈액형 검사(Anti-A, Anti-B Blood grouping serum, Milipore, Livingston, UK)에서 A형이었으며, D 혈액형 검사(Anti D Blood grouping serum, Milipore, Livingston, UK)상 환자의 적혈구와 항-D 항체 반응에서 응집을 보이지 않았다. D 음성인 산모에서 태어난 환아가 신생아태아용혈질환 증상이 심하였기 때문에 D 양성이라고 예상하였던 검사실에서는 다음의 두 가지 가능성을 생각해 볼 수 있었다. 첫 번째는 D 양성인 환아가 D 혈액형 검사에서 위음성을 보였을 가능성과 두 번째는 D 음성인 환아가 항-D 항체 이외의 다른 비예기항체로 인한 신생아태아용혈질환을 가졌을 가능성이었다.

환아의 DAT (DC-Screening II, BIO-RAD, DiaMed, GmbH,

Switzerland) 결과는 4+ (IgG 4+, C3d 음성)이었다. 그러나 DAT가 양성일 경우 약-D 검사는 위양성을 보일 수 있으므로 환자의 적혈구를 코팅한 항체를 해리(dissociation)시킨 후 검사를 실시하여야 한다고 판단하였다.

항체의 해리법은 클로로퀸법[6]을 사용하였다. 이를 간략히 기술하면 chloroquine diphosphate (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) 20 g을 100 mL 식염수에 녹여서 1 N 수산화나트륨용액으로 pH 5.1 정도의 클로로퀸 용액을 만든 후, 이 용액 0.8 mL를 환자의 적혈구 0.2 mL에 넣고 주기적으로 흔들어주면서 2시간 동안 실온에서 항온하였다. 그리고 3,000 rpm으로 5분간 원심침전한 후 상층액을 제거한 후 적혈구를 일부 취하여 생리식염수로 4회 세척 후 DAT를 실시하였다. 그러나 해리 후에도 DAT의 응집강도는 4+를 보인 반면, D 혈액형 검사에서 여전히 응집을 보이지 않아서, 항온시간을 4시간으로 연장하였다. 이후 DAT의 응집강도는 4+를 보였으나, D 혈액형 검사 상 시험관법상 2+, 원주응집법상 4+의 응집강도를 보였다(Fig. 1). 원주응집법은 당시 검사실에서 D 혈액형 전용 gel card가 없어서 항글로불린 시약이 첨가되지 않은 saline gel card (ID-Card NaCl, enzyme test and cold agglutinins, BIO-RAD, DiaMed, GmbH, Switzerland)를 이용하였다. 즉 환자의 혈액 검체 20  $\mu$ L를 식염수 1 mL에 혼합하여 0.8% 식염수 적혈구부유액을 만

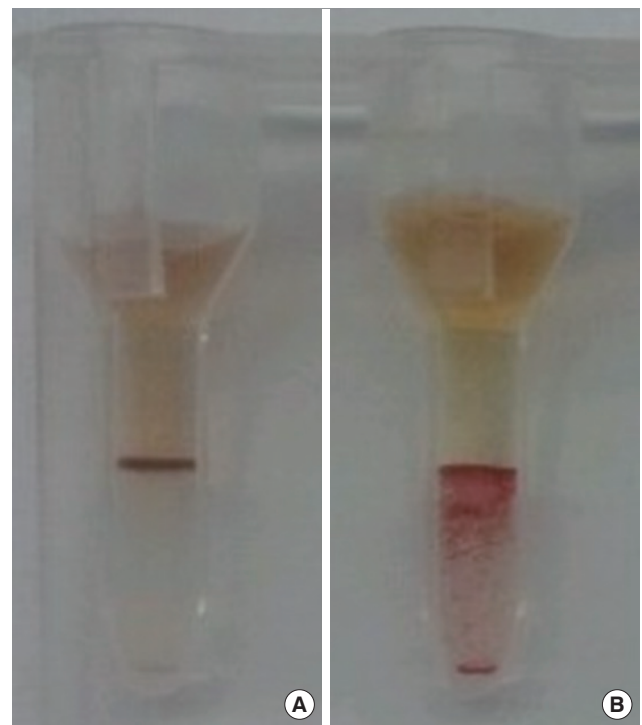


Fig. 1. Red blood cell (RBC) agglutination in the column agglutination test (CAT) for determining Rh(D) type. (A) CAT after 4 hr of chloroquine dissociation (4+). (B) CAT of RBC suspension in 0.8% normal saline before chloroquine dissociation (2+).

Table 1. Rests of red blood cell (RBC) agglutination for D typing

Technique	RBC suspension (%)	Dissociation by chloroquine		
		Before	After (2 hr**)	After (4 hr**)
Tube	Serum (3.0)	Neg (±*)	Neg	2+
Gel card	Saline (0.8)	2+	Not tested	4+

\*with 45 sec centrifugation; \*\*incubation time.

든 후, neutral gel suspension만 들어 있는 칼럼(column)에 환아의 적혈구부유액 50  $\mu$ L와 시험관법과 동일하게 사용된 항-D 항체 시약 50  $\mu$ L를 분주하여 15분간 항온 및 10분의 원심침전 후 응집 유무를 관찰하였다. 원주응집법이 시험관법보다 해리 후의 검체에서 D 혈액형 검사에서 더 강한 응집을 보였기에 해리 전 검체에서도 실시한 결과 시험관법에서는 응집을 보이지 않던 환자의 검체가 0.8% 식염수 적혈구부유액을 사용하는 원주응집법에서는 2+의 응집을 보여 해리하지 않고도 비록 응집강도는 약하였으나 D 양성으로 판정할 수 있었다(Table 1, Fig. 1). 그리고 D 혈액형 시험관법 상 원침시간을 응집이 없던 15초 대신 45초로 연장하였더니 응집이 ±(trace)를 나타내었다(Fig. 2).

환아의 검체 및 용출액에서 실시한 항체선별검사(ID-DiaCell I-II, ID-Dia (Diego) positive, BIO-RAD, DiaMed, GmbH, Switzerland) 및 항체동정검사(ID-DiaPanel P, BIO-RAD, DiaMed, GmbH, Switzerland)에서 항-D 항체가 검출되었고, 그 외의 다른 비예기항체가 검출이 되지 않았으므로, 두 번째 가능성을 배제할 수 있었다. 결론적으로 환아의 혈액형은 A형 D 양성 혈액형으로 판단할 수 있었다.

환아의 검사가 진행되는 동안 이송된 산모의 검체로 시행한 시험관법 혈액형 검사에서 산모는 A형, D 음성 혈액형으로 확인되었다. 산모의 비예기항체 검사는 환아에서 동일하게 시행된 원주응집법으로 시행하여 항-D 항체가 검출되었다. 결국 산모 혈액으로 환아의 교환수혈에 적합한 혈액을 찾을 수 있었다. 세 번의 교환수혈을 통하여 환아의 임상 증상이 호전이 되었고, 총 빌리루빈 수치도 4.0 mg/dL로 감소하여 퇴원하였다.

## 고 찰

D 항원 불일치는 신생아에 있어서 중증도의 신생아용혈빈혈 주요 원인 인자로 알려져 있고, 광선요법이나 면역 글로불린 투여 등의 치료방법이 있으나, 증상이 심할 경우 교환수혈(exchange transfusion)을 해야 한다[7]. 교환수혈을 위한 혈액을 선택할 경우 환아의 혈액 대신 산모의 혈액으로 교차시험(cross-matching)을 하게 된다. 그 이유는 신생아 면역력의 대부분은 태반을 통해서 넘어온 산모의 IgG 항체로 유지하고 있으므로 신생아의 혈액보다는 산모의 혈액에 더 많은 양의 비예기항체가 존재하기 때문이다[8].

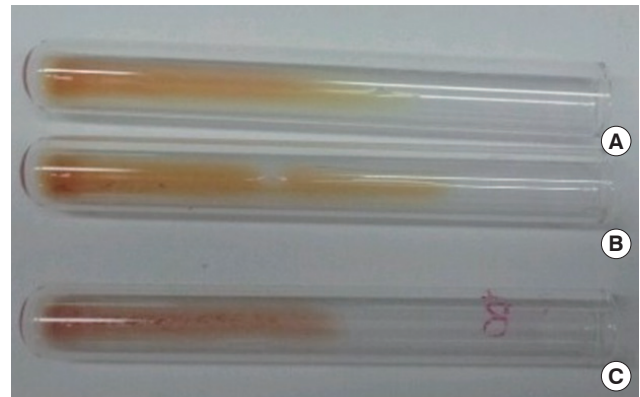


Fig. 2. Red blood cell agglutination in tube tests for determining Rh(D) type. (A) Tube test after 15 sec centrifugation (no agglutination). (B) Tube test after 45 sec centrifugation (trace). (C) Tube test after 4 hr of chloroquine dissociation (2+).

그러나 이번 증례와 같이 신생아에서 응급으로 교환수혈이 필요할 때, 본원에서 산모의 혈액을 확보하지 못하였으므로, 산모의 혈액 대신 신생아 혈액으로 혈액형 검사 및 교차시험을 하여 교환수혈에 적합한 혈액을 선택하려고 하였다.

아래의 다양한 사유들로 인하여 D 혈액형 검사상 위양성이나 위음성을 보일 수 있다. 우선 위양성은 적혈구에 붙어 있는 면역글로불린에 의해 야기되는 한냉 혹은 온난 자가항체(cold or warm auto-antibodies)에 의하거나 적혈구의 연전현상(rouleaux formation)에 의해 야기될 수 있다. 본 증례에서는 시험관법을 15초가 아닌 45초로 연장하였을 때 응집을 보이긴 하였으나, 혈액형 검사 시 원침시간을 연장하면 위양성을 보일 수 있으므로 이 방법을 통상적으로 사용하기에는 무리가 있다[9]. 그리고 위음성인 경우는 검사 절차상의 오류에 의해서 야기될 수 있지만, 드물게 DAT 검사에서 강한 양성을 보인 적혈구에 붙어있는 항-D 항체들에 의해서 D 혈액형 검사 시약의 적혈구 항원에 대한 반응이 저해되기 때문에 야기될 수 있다. 본 증례에서는 산모에서 유래된 항-D 항체가 신생아용혈성빈혈 증상이 있는 신생아의 적혈구 막에 코팅되어 D 항원 검사 시약인 항-D 항체가 신생아의 적혈구 막의 D 항원과 결합할 수 없어서 D 항원 검사 결과가 위음성을 나타내었다[3]. 그러므로 정확한 D 혈액형 검사를 위하여 적혈구 막에 있는 항체의 해리가 필요하다.

항체를 해리하는 방법에는 가열법(heat elution), pH의 저하를 통하여 해리시키는 acid-digitonin법, 글리신(glycine acid)법, ZZAP법, 그리고 클로로퀸을 첨가하여 해리하는 클로로퀸법 등이 있다[9, 10]. 비록 글리신법이 해리 과정이 간단하고 용출능이 클로로퀸법보다 뛰어나다는 보고가 있지만[11], 본 검사실에서는 당시 클로로퀸법만이 가능하여 이를 이용하였다. 클로로퀸법도 항체의 해리능이 높고, 적혈구에 붙어있는 항원의 파괴가 적어서 DAT가



양성이어서 ABO 및 Rh형을 결정할 수 없는 경우 항체를 제거하고 적혈구의 표현형검사를 실시할 때 유용한 검사이나 항체의 해리시간이 긴 것이 단점이다[9, 11, 12].

기존의 클로로퀸법에서는 용혈 및 적혈구의 항원의 소실을 방지하기 위하여 항온시간이 2시간을 초과하지 않도록 되어있으나[6], 실제로 해리가 잘 되지 않았기 때문에, 항온시간을 2시간에서 4시간으로 늘린 결과 항체 해리가 증가하여 결과적으로 D 양성 혈액형으로 판정할 수 있었다. 그러므로 신생아태아용혈질환이 있는 신생아에서 D 위음성이 의심된다면 적혈구에 코팅되어 있는 항-D 항체를 해리시켜 D 혈액형 검사를 시행해야 하며, 해리가 잘 되지 않는 경우에는 항온시간을 늘리는 등의 반응 시간을 늘려서 해리 후 D 혈액형 검사를 실시해야 한다고 판단된다. 본 증례처럼 DAT가 강양성인 경우는 해리과정의 항온시간을 늘렸다고 하더라도 DAT의 응집강도는 역시 4+이었기 때문에, 배양항온시간을 늘리기 전후로 DAT의 응집강도가 변화가 없더라도, D 혈액형 검사를 실시하는 데 무리가 없을 정도로 항체가 해리된 것으로 여겨진다. 이는 체외반응에서는 DAT의 응집강도가 4+로 동일하게 보일지라도 실제로 적혈구에 부착된 항체의 양에는 상당한 차이가 있을 것으로 판단되기 때문이다.

환아의 D 혈액형 검사에서 이용한 시험관법에서는 음성을 보였으나 원주응집법에서는 양성을 보인 가장 큰 이유는 검사기법 간의 민감도 차이보다는 검사에서 사용된 혈구 부유액의 조성 때문으로 여겨졌다. 시험관법인 경우에는 환아의 혈액에서 혈청이 함유된 3%의 적혈구부유액을 그대로 사용하였으나, 원주응집법에서는 검사 수기상 환아의 적혈구를 식염수로 0.8% 부유액을 만들어 반응시켰기 때문에 적혈구에 부착된 항-D 항체가 식염수로 확산되었을 가능성 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 DAT에서 강한 양성 및 D 혈액형 검사상 응집을 보이지 않을 경우, 세척적혈구나 식염수로 적혈구부유액을 만들어 D 혈액형 검사를 우선 시도할 필요가 있을 것으로 여겨진다.

본 저자들은 원주응집법을 이용하여 D 혈액형 검사를 할 때, D 혈액형 검사 전용 gel card를 사용하고 있지 않아서 saline gel card를 사용하였다. 본원에서 사용되는 gel card의 동일 회사 제품인 D 혈액형 검사 전용 gel card (ID-Card ABO/Rh BIO-RAD, DiaMed, GmbH, Switzerland)와 saline gel card (ID-Card NaCl, enzyme test and cold agglutinins)의 두 제품을 비교하면, D 혈액형 검사 전용 gel card는 항-D 항체 시약이 neutral gel suspension과 혼합되어 들어있는 반면 saline gel card는 neutral gel suspension만 포함되어 있다. 그리고 D 혈액형 검사 전용 gel card를 이용하는 검사에서는 전용 희석액(ID-Diluent, DiaMed, GmbH, Switzerland)으로 희석된 5% 적혈구부유액 10-12.5  $\mu$ L를 사용해야 하는 반면, 저자들이 saline gel card를 이용하여 임의로 검사한 방법에서는 식염수

로 희석한 0.8% 식염수 적혈구부유액 50  $\mu$ L와 항-D 항체 50  $\mu$ L를 사용하였다. 두 검사 방법은 검사 원리 상 큰 차이가 없는 것처럼 보이나, 부유액을 제조할 때 사용되는 희석액의 차이 및 반응 시키는 적혈구 부유액의 농도 차이가 있었다. 그러므로, 실제로 본 저자들이 시행한 방법으로 얻어진 결과가 D 혈액형검사 전용 gel card를 사용하는 방법으로 얻어진 결과를 대체할 수 있을지는 추후 확인되어야 할 것으로 생각된다.

DAT가 양성인 경우는 신생아용혈성빈혈 외에도 약제(용혈성 빈혈의 발생 유무와 관계 없음), 수혈, 전신성홍반성루푸스 등의 자가면역질환, 종양 등이 원인일 수 있고, 정상적인 상태에서도 DAT 양성일 경우도 있다[13]. 특히 자가면역질환이나 종양 등의 치료에서 수혈이 필요하면서 DAT가 강양성이 나올 수 있으므로, 이러한 질병을 가진 성인에서도 D 혈액형 검사에서 위음성이 나올 수 있어 정확한 혈액형 판독이 어려울 수 있다. 이러한 경우, 환자의 혈액을 식염수로 희석시킨 적혈구부유액이나 용출한 적혈구를 이용하여 D 혈액형 검사를 실시하되, DAT가 강양성인 경우에는 클로로퀸 해리 시 배양시간을 증가시키는 것도 정확한 D 혈액형 검사를 실시하는 데 도움을 줄 것으로 생각된다.

## 요 약

D 혈액형은 임상적으로 중요한 혈액형이므로 검사 결과의 정확성이 요구된다. 저자들은 D 부적합 신생아용혈질환이 의심되며 직접항글로불린검사에서 4+ 이상의 강양성을 보이는 환아에서 D 혈액형 검사상 위음성을 경험하였기에 이를 보고하고자 한다. 환아의 적혈구에 붙어있는 항체는 클로로퀸 해리법으로 항-D 항체였음을 확인하였다. 식염수에 부유한 0.8% 적혈구로 시행한 식염수 원주응집법에서는 2+의 응집을 보였다. 또한 클로로퀸 해리 항온시간을 4시간으로 늘린 후의 적혈구는 직접항글로불린검사에서 지속적 양성을 보이더라도 D 혈액형 검사의 시험관법(2+)과 원주응집법(4+) 모두에서 적혈구 응집을 보였다. 그러므로 직접항글로불린검사에서 강양성을 보이는 환자의 D 혈액형 검사상 응집을 보이지 않는 경우에는 식염수 적혈구부유액을 사용하거나 항체 해리 후 D 혈액형을 재검하는 것을 권장한다.

## REFERENCES

1. Roback JD, Brenda JG, et al. eds. Technical manual. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2011:400.
2. Roback JD, Brenda JG, et al. eds. Technical manual. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2011:637.
3. Roback JD, Brenda JG, et al. eds. Technical manual. 17th ed. Bethesda:

- American Association of Blood Banks, 2011:406-7.
4. Hwang YS. Haplotype frequencies of Rh gene loci in Koreans. *Korean J Blood Transfus* 1996;7:233-40.
  5. Han KS, Park KU, et al. eds. *Transfusion medicine*. 4th ed. Seoul: Korea Medical Publishing Co., 2014:102.
  6. Roback JD, Brenda JG, et al. eds. *Technical manual*. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2011:891-2.
  7. Armstrong B and Smart E. Haemolytic diseases. *ISBT SciSer* 2008;3:93-109.
  8. Brand A. Fetal, neonatal and paediatric transfusion medicine. *ISBT SciSer* 2007;2:14-21.
  9. Han KS, Park KU, et al eds. *Transfusion medicine*. 4th ed. Seoul: Korea Medical Publishing Co., 2014:193-4.
  10. Roback JD, Brenda JG, et al. eds. *Technical manual*. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2011:500-1.
  11. Lee SH, Oh YC, Kim KH, Han KS, Han BY, Kim SI. IgG elution method using glycine acid EDTA -comparison to chloroquine method-. *Korean J Blood Transfus* 1993;4:61-6.
  12. Edwards JM, Mods JJ, Judd WJ. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobin test. *Transfusion* 1982;22:59-61.
  13. Hannon JL. Management of blood donors and blood donations from individuals found to have a positive direct antiglobin test. *Transfus Med Rev* 2012;26:142-52.