

# HLA 동종항체 선별을 위한 ELISA 및 Luminex Panel Reactive Antibody 검사의 비교평가

정선경<sup>1</sup> · 오은지<sup>1</sup> · 양철우<sup>2</sup> · 안웅식<sup>3</sup> · 김용구<sup>1</sup> · 박연준<sup>1</sup> · 한경자<sup>1</sup>

가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup> · 내과학교실<sup>2</sup> · 산부인과학교실<sup>3</sup>

## Comparative Evaluation of ELISA and Luminex Panel Reactive Antibody Assays for HLA Alloantibody Screening

Seonkyung Jung, M.D.<sup>1</sup>, Eun-Jee Oh, M.D.<sup>1</sup>, Chul-Woo Yang, M.D.<sup>2</sup>, Woong-Shick Ahn, M.D.<sup>3</sup>, Yonggoo Kim, M.D.<sup>1</sup>,  
Yeon-Joon Park, M.D.<sup>1</sup>, and Kyungja Han, M.D.<sup>1</sup>

Departments of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Internal Medicine<sup>2</sup>, and Obstetrics and Gynecology<sup>3</sup>, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background** : For the detection of HLA antibodies, solid-phase tests using purified HLA antigens are increasingly used. In this study, we analyzed the panel reactive antibody (PRA) test results using ELISA and Luminex methods, and the results were compared with those of crossmatch test.

**Methods** : A total of 111 sera including 90 sera from kidney transplanted patients were tested. ELISA-PRA was performed using Lambda Antigen Tray Class I and II Mixed kits (One Lambda Inc., USA) and additional test was performed to identify HLA specificities. Luminex-PRA tests were performed using LABScreen Mixed kits (One Lambda Inc., USA) and LIFECODES LifeScreen Deluxe kits (Tepnel Co., USA).

**Results** : The positive rates of PRA were higher in Tepnel ( $P=0.006$ ) and One Lambda Luminex ( $P<0.001$ ) methods than ELISA, without significant difference between two Luminex methods ( $P=0.087$ ). The overall concordance rate among the three PRA tests was 62.2% (69/111). The positive and negative predictive values of PRA tests for the flow cytometric crossmatch were 33.3-45.7% and 85.7-89.5%, respectively. Of the two Luminex methods, One Lambda showed higher positive rate than Tepnel for the detection of class I antibodies. The sensitivity of pretransplant PRA for the detection of posttransplant acute rejection episodes was higher in Luminex ( $P=0.007$  for Tepnel,  $P=0.003$  for One lambda) than ELISA method.

**Conclusions** : Different methods used to detect HLA antibodies showed discrepant results. As the Luminex method was more sensitive than ELISA for the detection of HLA antibodies, it can be used as a routine test in the transplantation laboratory. (*Korean J Lab Med* 2009;29:473-80)

**Key Words** : Panel reactive antibodies, HLA antibodies, Luminex-PRA, ELISA-PRA

Received : July 20, 2009

Revision received : September 24, 2009

Accepted : September 30, 2009

Corresponding author : Eun-Jee Oh, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Seoul St. Mary's Hospital,  
505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea  
Tel : +82-2-2258-1641, Fax : +82-2-2258-1719  
E-mail : ejoh@catholic.ac.kr

\*This study was supported by the Catholic Medical Center Research Foundation made in the program year of 2007.

## 서론

수혈, 임신, 장기이식 등의 과정을 통해 형성되는 항 HLA항체는 이식 후 초급성 거부반응과 밀접하게 연관되어 있으며, HLA 항체에 의한 항체매개성 거부반응(antibody-mediated rejection, AMR)은 세포성 거부반응에 비해 매우 치명적이고, 치료

가 어렵기 때문에 예후가 불량하다[1]. 이러한 AMR의 방지와 진단을 위해 HLA 항원에 대한 감각여부를 검출하는 방법으로는 다양한 공여자의 항원을 이용하여 항체의 유무나 동정을 하는 panel reactive antibody (PRA) 검사와 특정공여자의 항원과 수혜자의 혈청을 반응시키는 교차시험이 있다. PRA 검사는 림프구를 이용하는 cell-based 방법과 추출된 항원을 microplate나 bead에 부착하여 혈청 내 항체를 검출하는 solid phase-based 방법이 있다. Cell-based 방법인 보체의존성 림프구독성법(complement-dependent cytotoxicity, CDC)을 이용한 PRA 방법은 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 non-HLA 항원에 의해 비특이적인 반응을 보일 수 있고 검사시간 검사방법과 판독의 표준화가 어려운 단점이 있다. Solid phase-based 방법은 1) microplate에 부착된 HLA 항원을 효소면역측정법(ELISA)으로 확인하는 ELISA-PRA, 2) flow-beads를 이용하여 유세포분석기로 검출하는 Flow-PRA, 그리고 3) luminex-beads를 이용하여 Luminex 장비로 검출하는 Luminex-PRA 등이 있다[2, 3]. Solid phase-based PRA 방법은 추출한 HLA 항원을 이용하므로 non-HLA 항체에 의한 위양성을 배제할 수 있고, 림프구를 이용한 PRA 방법에 비해 민감도가 높으며, 상품화된 시약을 이용할 수 있는 장점이 있는데 국내 검사실에서는 특히 ELISA를 이용한 PRA 방법의 사용이 증가하고 있다[3, 4].

Luminex-PRA는 HLA 항원이 부착된 luminex-beads를 혈청 내 HLA 항체와 반응시키고 전용 장비와 프로그램을 이용하여 HLA 항체를 검출하는 방법이다[5]. Luminex-PRA는 ELISA-PRA나 Flow-PRA에 비해 민감도가 우수하다고 보고되어 있으며[6], 소량의 검체를 사용하고, 96 well microplate를 이용하여 검사할 수 있으므로 대량검사가 가능한 장점이 있다. 또한 100개까지 구분이 가능한 beads에 HLA 항원들을 부착시킨 후, 소량의 혈청과 한 개의 well 내에서 반응시켜 각 beads에 부착된 항체의 형광을 측정함으로써 항체의 동정이 가능하다. 상품화된 Luminex-PRA 키트로는 Tepnel사와 One-lambda사의 PRA 시약이 소개되어 있으며, 기존방법들과 비교한 보고들이 있으나[5-8], 두 가지 상품화된 Luminex-PRA 결과를 ELISA-PRA, 교차시험 등과 동시에 비교한 결과는 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 동일한 검체로 ELISA-PRA와 두 회사의 Luminex-PRA 방법으로 선별검사를 시행하고, 림프구를 이용한 교차시험 결과와 비교 분석하여 Luminex-PRA 검사방법의 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상 검체

2005년 11월부터 2008년 3월까지 가톨릭대학교 강남성모병원에 PRA 검사가 의뢰되어 ELISA 방법으로 검사를 시행하였던 111예의 검체를 대상으로 하였다. ELISA-PRA는 mixed class I, class II 항원에 대한 항체 선별검사를 시행하고, 선별검사에서 양성인 경우 multiple antigen과 single antigen이 부착된 키트를 이용하여 동정검사를 시행하였으며, 공여자 특이 HLA 항체(donor-specific HLA antibody, DS-HLA항체) 유무를 판정하였다. 선별검사에서 양성인 예는 모두 동정검사에서도 양성결과를 나타내었다. 총 111예에는 신이식을 시행한 68명 환자의 90예 검체가 포함되었는데, 이식 전 검체가 54예, 이식 후 검체가 36예였다. -70°C 냉동고에 보관되었던 111예의 혈청 검체를 이용하여 LIFECODES LifeScreen Deluxe kits (Tepnel Lifecodes Co., Stamford, CT, USA)와 LABScreen Mixed kits (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA)를 이용한 Luminex-PRA 선별검사를 시행하였다. Luminex-PRA 결과를 ELISA-PRA 및 CDC 교차시험(CDCXM), flow cytometric crossmatch (FCXM) 결과와 비교하고, 신이식을 시행한 환자에서 초기급성거부반응(acute rejection episode, ARE)에 대한 민감도와 특이도를 분석하였다. 대상환자의 의무기록을 조사하였고, ARE는 특별한 이유 없이 혈청 크레아티닌 수치가 이식 후 초기 크레아티닌 값에 비해 20% 이상 증가되고 스테로이드 치료 후 정상화된 경우로 정의하였다[4, 9].

### 2. ELISA-PRA 검사

Lambda Antigen Tray Mixed, Class I and II (One Lambda, Inc.)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 ELISA-PRA 검사를 시행하였다. 실온에서 안정화된 microplate에 1:2로 희석된 혈청 10  $\mu$ L를 분주하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척액으로 2회 세척하였다. 희석된 enzyme-conjugate 용액 10  $\mu$ L를 넣고 실온에서 40분 반응시킨 후, 효소 기질액 10  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 10-15분간 반응시켰다. 반응 정지액을 넣고 1시간 이내에 Microplate Reader EL $\times$ 800 (TEK Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)에 넣고 판독하였다. 양성판독기준은 제조회사의 지침에 따라 음성 blank 흡광도를 보정한 평균 양성대조 혈청 흡광도에 0.2, 0.4, 0.6, 0.8을 곱한 값을 Grade 2, 4, 6, 8의 경계치(cutoff)로 정하고 Grade 4 이상을 PRA 양성으로 판독

하였다.

### 3. Tepnel-Luminex-PRA 선별검사

LIFECODES LifeScreen Deluxe kits (Tepnel Lifecodes Co.)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 검사를 시행하였다. 96 well plate의 각 well에 세척액 40  $\mu$ L씩을 분주한 후, 혈청 12.5  $\mu$ L과 beads 5  $\mu$ L를 분주하였다. 30분간 암실에서 분당 200회로 회전하면서 반응시켰다. Vacuum manifold로 3회 세척 후, 1:10 희석된 R-Phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-human IgG 50  $\mu$ L를 각 well에 분주하였고 이전 과 동일한 방법으로 30분 더 반응시켰다. 세척 후, LABScan100 flow cytometer (Luminex, Austin, TX, USA) 장비에서 Quick-Type Version 2.4 User's Manual RUO 프로그램을 사용하여 결과값을 얻었다. 각 실험 시에는 양성혈청 대조군과 음성혈청 대조군을 포함하였으며, 각 well의 반응시약 내에는 총 16가지의 beads가 들어있는데 class I HLA 항원은 7가지의 beads에 class II HLA 항원은 5가지의 beads에 코팅되어 있고, background를 측정할 수 있는 3종류의 음성실험대조군 beads와 human IgG가 결합된 beads인 양성실험 대조군이 포함되어 있다. Adjusted ratio를 이용하여 점수를 정하는데 먼저 각 bead가 혈청의 항체와 반응하여 검출되는 mean fluorescence intensity (MFI)를 구하여 이것을 세 개의 음성실험 대조군 MFI로 각각 나눈 후 제조회사에서 제공하는 background adjustment factor (BAF)를 빼서 구한 값이 1 이상의 점수를 보인 경우를 양성으로 판독하였다. 양성혈청 대조군과 양성실험 대조군은 MFI 수치가 10,000 이상인지 확인하였다.

### 4. One Lambda-Luminex-PRA 선별검사

LABScreen Mixed kits (One Lambda, Inc.)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 검사를 시행하였다. 96 well plate의 각 well에 세척액 300  $\mu$ L를 분주한 후 10분간 platform 위에서 반응시킨 후 vacuum manifold로 흡입하였다. 각 well에 혈청 20  $\mu$ L과 beads 5  $\mu$ L를 분주하고, 30분간 암실에서 회전하면서 반응시켰다. 세척액 275  $\mu$ L를 각 well에 분주한 후, vacuum manifold를 이용하여 5회 세척하였다. 희석된 R-PE-conjugated goat anti-human IgG 100  $\mu$ L를 각 well에 분주하고, 동일한 방법으로 30분 더 반응시켰다. 5회 세척 후 80  $\mu$ L의 PBS를 각 well에 첨가하고, LABScan100 flow cytometer (Luminex) 장비에서 One Lambda LABScreen software를 이용하

여 결과값을 얻었다. 시약 내에는 총 19가지의 beads가 들어있는데 class I HLA 항원이 코팅된 12가지의 beads와 class II HLA 항원이 코팅된 5가지의 beads 그리고 HLA 항원을 부착하지 않은 음성실험 대조군과 human IgG가 부착된 양성실험 대조군 beads가 각각 한 가지씩 들어있다. FCXM에서 음성 결과를 나타내었던 10개의 검체를 선택하여 normalized background (NBG) ratio를 각각 구하였고, 이들 중 가장 높은 값을 선택하여 구한 평균인 1.0을 경계치로 하여 양성으로 판독하였다. 양성혈청 대조군 beads는 500 이상, 음성 대조군은 500 미만의 NBG ratio를 나타내는지 확인하였다.

### 5. 보체의존 림프구독성법을 이용한 교차시험

공여자의 림프구에서 CD19 단클론 항체가 부착된 bead를 이용하여 T 세포와 B 세포를 분리한 후  $2 \times 10^6$ /mL로 조정된 세포액 1  $\mu$ L에 수여자의 혈청 1  $\mu$ L를 넣어 T 세포와 B 세포를 각각 실온에서 30분간 반응시켰다. Anti-human immunoglobulin 1  $\mu$ L를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시키고 세척하였다. 보체를 첨가하여 실온에서 60분간 반응시킨 후 acridine orange와 ethidium bromide로 염색하여 형광현미경으로 세포독성의 정도를 판정하였는데, American Society for histocompatibility and immunogenetics (ASHI) 기준[10]에 따라 1점(0-10% 세포독성), 2점(11-20%), 4점(21-50%), 6점(51-80%), 8점(81-100%)으로 판정하여, 4점 이상을 보인 경우를 양성으로 판정하여 음성대조 well에 비해 죽은 세포가 20% 이상 관찰될 때를 양성으로 판정하였다.

### 6. 유세포분석기를 이용한 교차시험

$2 \times 10^6$ /mL로 조정된 공여자 림프구액 100  $\mu$ L에 수여자의 혈청 50  $\mu$ L를 실온에서 30분간 반응시켰다. 2회 세척 후 항글로불린 1:10 희석액(FITC-F[ab']<sub>2</sub> anti-human IgG, DAKO, Tokyo, Japan) 20  $\mu$ L와 PE-labeled anti-CD3 또는 anti-CD19 (DAKO) 10  $\mu$ L를 각각 T 세포와 B 세포 교차시험을 위해 넣고 30분간 암실에서 반응시켰다. 3회 세척 후 PBS 1 mL를 넣어 세포 부유액을 만들고 유세포분석기(Coulter Epics XL Co., Miami, FL, USA)를 이용하여 형광반응 양상을 비교하였다. 음성 대조군에 비해 log mean channel displacement가 T 세포의 경우 5, B 세포의 경우 10 이상일 때 또는 양성세포가 10% 이상인 경우를 양성으로 판독하였다.

## 7. 통계

통계 분석은 SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였고 Chi-square 방법을 사용하여,  $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 각 PRA 검사의 양성률

Class I 또는 Class II 항체 검출을 위한 양성률 비교에서는 총 111예의 검체 가운데 ELISA-PRA 양성인 66예(59.5%), Tepnel-Luminex-PRA 양성인 85예(76.6%)였고, One Lambda-Luminex-PRA는 95예(85.6%)에서 양성이었다(Table 1). Tepnel사( $P=0.006$ )와 One Lambda사( $P<0.001$ )의 두 가지 Luminex-PRA 방법 모두 ELISA-PRA에 비해 높은 양성률을 나타냈으며, Luminex-PRA 방법 사이에 양성률의 유의한 차이는 없었다( $P=0.087$ ). Class I 항체 검출에서는 One Lambda-Luminex-PRA의 양성률이 Tepnel-Luminex-PRA ( $P=0.001$ )나 ELISA ( $P<0.001$ )에 비해 유의하게 높았으나, Tepnel-Luminex-PRA의 양성률은 ELISA-PRA와 유의한 차이가 없었다( $P=0.057$ ). Class II 항체 검출에서는 Tepnel-Luminex-PRA ( $P<0.001$ )와 One Lambda-Luminex-PRA ( $P<0.001$ )의 양성률이 모두 ELISA에 비해 유의하게 높았다.

교차시험이 가능하였던 68예 중, CDCXM 양성인 13예(19.1%)로 T 세포 양성 10예와 B 세포 양성 10예를 포함하였다. 또한, FCXM 양성인 20예(29.4%)로 T 세포 양성 12예와 B 세포 양성 19예를 포함하였다. CDCXM과 FCXM 결과가 모두 양성인 12예에서의 양성률은 ELISA-PRA 100%, Tepnel-Luminex-PRA 100%, One Lambda-Luminex-PRA 91.7%였으며, CD-

CXM, FCXM 결과가 모두 음성인 검체에서도 각각 40.4% (19/47), 66.0% (31/47), 74.5% (35/47)의 양성률을 나타내었다(Table 2).

### 2. 세 가지 PRA 검사결과와 일치율

111예 중 세 가지 PRA 방법의 HLA 항체 검출 결과가 모두 일치하였던 예는 69예(62.2%)였다(Table 3). PRA 결과를 class I과 class II 항체 검출로 구분하여 분석한 세 가지 PRA 방법의 일치율은 각각 55.9% (62/111)와 60.4% (67/111)로 항체의 class에 따른 일치율에는 유의한 차이가 없었다( $P>0.05$ ). 세 가지 방법 중 두 가지 방법의 일치율을 각각 비교해 보면 class I 항체 검출의 경우, ELISA-PRA와 Tepnel-Luminex-PRA의 일치율이 ELISA-PRA와 One Lambda-Luminex-PRA의 일치율보다 유의하게 높았으며( $P=0.008$ ), class II 항체 검출의 경우 두 가지 luminex 방법 간의 일치율이 각 luminex 방법과 ELISA 방법의 일치율보다 높았다.

### 3. PRA 검사의 교차시험 결과 예측률

세 가지 PRA 검사결과와 CDCXM에 대한 양성예측률(positive predictive value, PPV)은 22.2-34.3%로 낮았으며, 음성예측률(negative predictive value, NPV)은 92.9-97.0%였다(Table 4). 세 가지 PRA 검사의 CDCXM 결과 예측률 사이에 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ ). 세 가지 PRA 검사의 FCXM에 대한 PPV는 33.3-45.7%였고, NPV는 85.7-89.5%였으며, PRA 방법에 따른 FCXM 결과 예측률에 유의한 차이는 없었다( $P>0.05$ ).

Table 1. Positive rate of panel reactive antibody tests in 111 sera

Antibody specificities	% (N of positive cases)		
	ELISA	Tepnel-Luminex	One Lambda-Luminex
Class I and/or II	59.5% (66)	76.6% (85)	85.6% (95)
Class I	52.3% (58)	64.9% (72)	84.7% (94)
Class II	31.5% (35)	62.2% (69)	55.9% (62)

For Class I and/or II, ELISA vs Tepnel,  $P=0.006$ ; ELISA vs One Lambda,  $P<0.001$ ; Tepnel vs One Lambda,  $P=0.087$ . For Class I, ELISA vs Tepnel,  $P=0.057$ ; ELISA vs One Lambda,  $P<0.001$ ; Tepnel vs One Lambda,  $P=0.001$ . For Class II, ELISA vs Tepnel,  $P<0.001$ , ELISA vs One Lambda,  $P<0.001$ .

Table 2. Comparison between crossmatch and PRA screening results in 68 sera

Crossmatch	Positive N (%)		
	ELISA-PRA	Tepnel-Luminex-PRA	One Lambda-Luminex-PRA
CDCXM(+)/FCXM(+) (N=12)	12 (100)	12 (100)	11 (91.7)
CDCXM(+)/FCXM(-) (N=1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
CDCXM(-)/FCXM(+) (N=8)	4 (50.0)	6 (75.0)	7 (87.5)
CDCXM(-)/FCXM(-) (N=47)	19 (40.4)	31 (66.0)	35 (74.5)

Abbreviations: CDCXM, complement dependent cytotoxicity crossmatch; FCXM, flowcytometric crossmatch; +, positive; -, negative.

**Table 3.** Concordance rates of the results of three PRA methods in 111 sera

Antibody specificities	ELISA, Tepnel-Luminex, and One Lambda-Luminex	ELISA and Tepnel-Luminex	ELISA and One Lambda-Luminex	Tepnel-Luminex and One Lambda-Luminex
Class I and/or II	62.2%	77.5%	68.5%	77.5%
Class I	55.9%	78.4%	62.2%	71.2%
Class II	60.4%	64.0%	72.1%	84.7%

For class I, 'ELISA and Tepnel' vs 'ELISA and One Lambda',  $P=0.008$ .  
For class II, 'ELISA and Tepnel' vs 'ELISA and One Lambda',  $P<0.001$ ;  
'ELISA and One Lambda', vs 'Tepnel and One Lambda',  $P=0.023$ .

**Table 4.** Predictive value of PRA screening tests for CDC or flow cytometric crossmatch

PRA methods	For CDCXM		For FCXM	
	PPV	NPV	PPV	NPV
ELISA	34.3% (12/35)	97.0% (32/33)	45.7% (16/35)	87.9% (29/33)
Tepnel-Luminex	24.5% (12/49)	94.7% (18/19)	36.7% (18/49)	89.5% (17/19)
One Lambda-Luminex	22.2% (12/54)	92.9% (13/14)	33.3% (18/54)	85.7% (12/14)

Abbreviations: CDCXM, complement dependent cytotoxicity crossmatch; FCXM, flowcytometric crossmatch; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

#### 4. 신이식 환자에서 PRA 결과의 분석

신이식 전 PRA 검사 결과와 이식 후 ARE 발생과의 관계를 알아보기 위해, 신이식 전에 PRA 검사가 의뢰된 48명의 이식 전 PRA 결과를 분석하였다(Table 5). 48명의 환자 중 22명에서 ARE 발생이 관찰되었다. 이식 전 ELISA-PRA, Tepnel-, One Lambda-Luminex-PRA 검사의 ARE 발생에 대한 민감도는 31.8%, 72.7%, 77.3%였고, 특이도는 61.5%, 38.5%, 7.7%로서, Tepnel ( $P=0.007$ )과 One Lambda ( $P=0.003$ ) Luminex-PRA 검사는 ELISA-PRA에 비해 민감도는 높았으나, 특이도는 One Lambda-Luminex-PRA ( $P<0.001$ )가 ELISA-PRA에 비해 낮았다.

ELISA-PRA 양성인면서 항체동정검사를 실시하여 DS-HLA 항체로 판정된 검체는 18예였고, 이들 예에서 Luminex-PRA의 양성률을 분석한 결과, Tepnel-Luminex-PRA 검사는 18예(100%) 모두 양성으로 검출되었고, One Lambda-Luminex-PRA검사는 검사가 가능하였던 18예 중 17예(94.4%)에서 양성으로 검출되었다. 18예 중 교차시험 결과가 있었던 검체는 13예

**Table 5.** Performance data of pre-transplant PRA screening tests for the detection of acute rejection episodes in 48 kidney transplanted patients

PRA methods	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
ELISA	31.8%	61.5%	41.2%	51.6%
Tepnel-Luminex	72.7%	38.5%	50.0%	62.5%
One Lambda-Luminex	77.3%	7.7%	41.5%	28.6%

Abbreviations: See Table 4.

였고, 이 중 CDCXM 6예(46.2%), FCXM 9예(69.2%)에서 양성이었다. 추후 DS-HLA항체로 판정된 검체를 대상으로 각 PRA 선별검사의 양성률을 비교한 결과, Tepnel-Luminex-PRA가 CDCXM ( $P<0.001$ )나 FCXM ( $P=0.022$ )에 비해 양성률이 유의하게 높았으며, One Lambda-Luminex-PRA는 CDCXM에 비해 높은 양성률을 보였다( $P=0.004$ ).

## 고 찰

항 HLA 항체에 의한 AMR의 예방과 조기검출은 이식의 성공을 위해 매우 중요하며, 신장이식 전후 항 HLA 항체의 선별과 동정검사는 초급성 거부반응을 예방하고 AMR의 조기검출을 위해 반드시 필요한 검사이다[1]. 국내에서는 공여자 특이 항체 검출을 위해 공여자의 림프구를 이용한 CDCXM와 FCXM 방법 등이 시행되고 있으며, HLA 항체 검출을 위한 PRA 검사방법으로는 ELISA 방법이 보편적으로 사용되고 있다.

최근 luminex-beads에 HLA 항원을 부착시켜 혈청 내 HLA 항체를 luminex 장비로 검출하는 Luminex-PRA 검사법이 소개되었으며[6], Luminex-PRA를 HLA 항체 검출을 위한 검사 알고리즘에서 가장 일차적인 방법으로 사용할 것을 제안한 보고도 있다[6]. Luminex-PRA 검사법의 원리는 검사에 사용되는 개개 bead의 형광강도수준(fluorescence intensity level)이 달라 각기 다른 bead를 구분할 수 있다. 또한 각각의 bead 표면에는 분석하고자 하는 HLA 항원이 부착되어 있어, 여기에 반응할 수 있는 HLA 항체를 항원항체반응을 통해 검출이 가능하다. Beads에 부착된 HLA 항체에 PE 형광물질이 결합된 2차 항체를 반응시킨 후 두 개의 레이저를 사용하여 분석하는데, 하나의 레이저(Red laser, classification channel)는 bead를 감지하여 bead의 고유번호를 알아내고 다른 레이저(green laser, reporter channel)는 PE 형광을 검출하여 HLA 항체 유무를 점수로 판정한다. 기존 연구보고에 의하면 Luminex-PRA는 Flow-PRA와 비교할 만한 민감도를 가지고 있고 검사자가 사용하기에 편리하며 Flow-PRA에 비해 가격이 싸고 데이터 분석 시 좀 더 친

속하게 접근할 수 있는 장점이 있다[6]. 또한 Luminex-PRA는 12.5-20  $\mu$ L 정도의 소량의 시료로도 항체동정검사가 가능한 장점이 있으며, CDC-PRA, ELISA-PRA, Flow-PRA와의 비교 검사에서 민감도가 가장 우수한 방법으로 보고되어 있다[11]. 그 외에 Luminex-PRA 검사는 검체 분석과 동시에 각 반응 well 내에 음성과 양성 정도 관리용 bead의 분석이 가능하고, 분석된 bead 개수를 알 수 있으며, 각 회사에서 제공하는 개별의 고유 프로그램을 통해 이루어지기 때문에 주관적인 요소가 개입될 수 있는 유세포분석기를 이용한 방법보다도 분석이 객관적이고 편리하다.

본 연구에서 총 111예의 검체를 이용하여 HLA 항체검출 결과를 비교한 결과, Luminex-PRA의 양성률이 ELISA-PRA의 양성률보다 높았으며, ELISA나 CDC 방법의 PRA에 비해 민감도가 높다는 기존보고와 동일한 결과를 얻었다. 두 가지 Luminex-PRA 방법 사이의 양성률 비교에서는 전체 양성률에는 차이가 없었으나 class I 항체의 경우, One Lambda-Luminex가 Tepnel-Luminex 보다 높은 양성률을 보였다( $P < 0.001$ ) (Table 1). 교차시험 결과에 따른 PRA 검사의 양성률 비교에서도 양성예수가 적어 통계적으로 유의한 차이는 없었으나, PRA 방법에 따라 다른 양성률 결과를 보였다(Table 2). 세 가지 PRA 방법 결과가 모두 일치한 경우는 62.2%로서 class I과 class II 결과에 따른 분석에 의하면 Tepnel-Luminex-PRA 검사는 class I 항체 검출은 ELISA 방법과 더 일치하고, class II 항체 검출은 One Lambda-Luminex-PRA와 더 일치하였는데(Table 3), 이 또한 Table 1에서 보인 항체 양성률의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 동일한 luminex 방법 간의 차이를 유발할 수 있는 원인으로는 beads에 부착된 항원의 종류와 양의 차이 및 항원 항체 결합력의 차이 등을 생각해볼 수 있다. 두 제조회사에서 사용한 항원을 0.1% 이상의 대립유전자빈도를 나타내는 한국인의 HLA-A, -B, -DR 항원[12, 13]과 비교하여 분석해보면, Tepnel사는 B59 항원을 포함하지 않았고, One Lambda 키트는 모든 항원을 포함하고 있다. 추후 Tepnel-Luminex-PRA 음성, One Lambda-Luminex-PRA 양성 검체의 차이 분석을 위해 PRA 추적검사와 동정검사를 시행하여 공여자특이 HLA 항체 검출 결과를 추적 비교해보다면, 항원 양의 차이와 항원 항체결합력의 차이인지 위양성에 의한 차이인지를 구별할 수 있을 것이다.

공여자 림프구를 이용하는 CDCXM은 이식 후 항체매개성 거부반응을 예방하기 위해 시행하는 전통적인 교차시험인데 민감도를 높이고 IgM 자가항체의 위양성 감별을 위해 FCXM를 추가적으로 시행할 수 있다. 그러나 최근 non-HLA 항체에 의한 위양성을 배제하고, class I, II 항체를 구분할 수 있고 민감도가

증가된 solid-phase based HLA 항체 검출 방법이 보편화되면서, 림프구를 이용하는 교차시험 대신 solid-phase based HLA 항체 검사를 실시하고 HLA 항체 동정결과를 토대로 DS-HLA 항체 유무를 결정하는 'virtual crossmatch'가 소개되고 있다[14, 15]. Virtual crossmatch를 시행하는 기관에서의 보고에 의하면 solid-phase based HLA 항체 검사의 FCXM에 대한 NPV를 90% 이상으로 보고하고 있는데[14, 15], 본 연구에 포함된 세 가지 PRA 방법은 CDCXM에 대해서는 모두 90% 이상의 NPV를 보였으나, FCXM에 대해서는 ELISA-PRA, Tepnel-Luminex-PRA, One Lambda-Luminex-PRA가 각각 87.9%, 89.5%, 85.7%의 NPV를 보였으며 세 방법 사이에 유의한 차이는 없었다(Table 4). 본 연구에서는 총 111예 중 FCXM 양성 검체 20예가 포함되었고 이 중 19예는 B세포 양성이었는데, Fc receptor와 결합한 비특이 항체에 의한 FCXM 위양성 가능성이 있으므로, pronase 처리 등을 통해 위양성 검체를 제외시킨다면 PRA 검사의 NPV는 더 증가할 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구에서는 PRA 선별검사 결과만을 분석하였으므로 교차시험 음성인 47예에서도 40.4-74.5%의 양성률을 보였고(Table 2), 교차시험 결과에 대한 PPV도 22.2-45.7로 낮았다(Table 4). PRA 방법 간 유의한 차이는 없었으나 본 연구에서는 PRA 선별검사 결과를 분석하였으므로 공여자 비특이 HLA 항체의 결과도 양성에 포함되었다. 따라서 PPV 및 virtual crossmatch 가능성의 분석은 동정검사를 실시하여 DS-HLA 항체 결과로의 재분석이 필요하다.

Amico 등[15]은 334명의 신장이식 환자를 대상으로 single-antigen flow-beads를 이용하여 DS-HLA항체를 검사하고 이식 후의 clinical/subclinical AMR 발생과 비교하였는데, DS-HLA항체 양성 환자의 55%에서 AMR이 발생하였고, 5년 후 이식장기의 생존율 감소와 관련이 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 48명의 신이식 환자의 이식 전 PRA결과를 분석한 결과, Tepnel-Luminex-PRA 검사의 ARE 발생에 대한 PPV와 NPV는 각각 50.0%와 62.5%로 Amico 등의 보고와 비슷하였으나, One Lambda-Luminex-PRA의 PPV와 NPV는 41.5%와 28.6%로서 다소 낮았다.

Luminex-PRA는 민감도가 높아 전통적인 교차시험이나 CDC-PRA, ELISA-PRA에 비해 HLA 항체 검출률이 높고, 검출된 HLA 항체는 임상적으로 ARE 발생을 예측하고 조기진단 하는 데 매우 유용하다고 보고되어 있다[11]. 본 연구에서도 ELISA 키트를 이용한 항체동정에 의해 DS-HLA항체로 판정된 18예에서, Luminex-PRA의 양성률이 CDCXM나 FCXM에 비해 유의하게 높았으므로, Luminex-PRA 방법의 사용은 DS-



HLA항체를 조기검출하고 ARE를 예방하는데 유용할 것으로 생각된다. 그러나 Luminex-PRA는 ELISA-PRA에 비해 민감도가 높으므로 임상적으로 거부반응을 유발하지 않는 강도가 매우 약한 항체를 위양성으로 보고할 가능성이 있다. 또한 교차시험 음성인 환자에서 PRA 양성으로 보고하는 빈도가 증가하여, PRA 양성결과로 인해 고위험군으로 간주되어 불필요한 치료와 검사를 동반하게 되는 단점도 예상된다. 본 연구에서 48명의 신이식 환자를 대상으로 분석한 Luminex-PRA 검사 결과는 ELISA-PRA에 비해 민감도가 높은 대신 공여자 비특이 항체도 검출하므로 특이도가 7.7-38.5%로 매우 낮았다. 또한 ARE 양성 환자와 ARE 음성 환자에서 PRA 양성률에 유의한 차이가 없어, 선별검사 단독으로는 이식 후 ARE 발생을 예측할 표지자로서의 임상적 유용성은 낮다. 따라서 항체 선별검사 후 정확한 항체 동정이 반드시 동반되어야 하겠고, DS-HLA항체 양성인 환자의 50% 정도만 급성거부반응과 관련이 있다는 보고가 있으므로[15], ARE 발생을 유발하는 DS-HLA항체의 성상과 발생기전에 관한 연구가 지속되어야 할 것이다.

최근 국내에서는 2000년 2월 이후 '장기 등 이식에 관한 법률'의 시행으로 인해 사체나 뇌사자를 통한 신이식을 포함한 장기이식의 수요가 점차 증가함에 따라 HLA 교차시험 외에도 PRA 검사의 필요성이 증가하고 있다. 본 연구결과 Luminex-PRA 검사는 제조회사에 따라 민감도에 차이가 있었으나, ELISA-PRA 방법에 비해 민감도가 높고 대량검사가 가능하며, 일반검사실에서 사용할 수 있는 편리하고 객관적인 방법이므로, 장기이식 면역검사실에서 유용하게 사용할 수 있으리라 생각한다.

## 요 약

**배경 :** HLA 항체 검출을 위한 검사에서 추출한 HLA 항원을 고체상에 부착하여 검사하는 방법의 사용이 증가하고 있다. 본 연구에서는 ELISA와 Luminex 방법을 이용한 panel reactive antibody (PRA) 검사를 시행하고 교차시험 결과와 함께 분석하였다.

**방법 :** 신이식 환자에서 채취한 90개 혈청을 포함한 총 111개의 혈청을 대상으로 하였다. ELISA-PRA는 Lambda Antigen Tray Class I and II mixed kit (One Lambda, Inc., USA)를 이용하였고 추가검사를 시행하여 HLA 특이성을 동정하였다. Luminex-PRA 검사는 LABScreen mixed kits (One Lambda, Inc., USA)와 LIFECODES LifeScreen Deluxe kits (Tepnel Lifecodes Co., USA)를 이용하여 수행하였다. PRA 검사의 유세포분석기를 이용한 교차시험(FCXM) 결과에 대한 양성예측

률과 음성예측률을 분석하였고, 아울러 초기급성반응에 대한 민감도와 특이도를 확인하였다.

**결과 :** Tepnel ( $P=0.006$ )과 One Lambda-Luminex-PRA 방법( $P<0.001$ )의 양성률은 ELISA-PRA 보다 높았으나, 두 가지 Luminex 방법들 간에 유의한 차이는 없었다( $P=0.087$ ). 세 가지 PRA 검사법의 전체적인 일치율은 62.2% (69/111)였다. FCXM에 대한 PRA 검사의 양성예측률과 음성예측률은 각각 33.3-45.7%와 85.7-89.5%였다. Class I HLA 항체 검출의 경우, 두 가지 Luminex 방법 중 One Lambda가 Tepnel보다 더 높은 양성률을 나타내었다. 48명의 신이식 환자에서 이식 후 초기급성반응 발생에 대한 이식 전 PRA 검사의 민감도는 Tepnel ( $P=0.007$ )과 One Lambda ( $P=0.003$ ) Luminex 방법이 ELISA 방법보다 더 높았다.

**결론 :** 본 연구결과, HLA 항체 검출을 위해 사용되는 PRA 방법들 간에 결과의 불일치를 나타낼 수 있음을 보여주었다. Luminex 방법은 ELISA 방법에 비해 HLA 항체검출을 위한 민감도가 높으므로 이식 검사실에서 일상적인 PRA 검사로 사용될 수 있을 것이다.

## 참고문헌

- 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. (오은지, 박연준, 김진영, 양철우, 김동구, 문인성. Antibody Monitoring System을 이용한 공여자 특이 HLA 항체 검출. 대한이식학회지 2006;20:63-8.)
- Ki CS, Yang YS, Kim DW. Comparison of complement-dependent cytotoxicity, enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometric assay for the detection of HLA class I alloantibodies. Korean J Clin Pathol 1998;18:624-9. (기창석, 양운선, 김대원. HLA Class I 동종항체 선별을 위한 보체의존림프구독성법, 효소면역측정법 및 유세포분석법에 의한 Panel Reactive Antibody 검사법의 비교. 대한임상병리학회지 1998;18:624-9.)
- 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. (오은지, 이재훈, 양철우, 문인성, 박연준, 한정자. 항-HLA 항체 검출을 위한 검사방법의 비교: Cytotoxicity, Flow Cytometric Crossmatch, Multiple Antigen-ELISA, and Single Antigen-ELISA. 대한이식학회지 2008;22:85-91.)
- Oh EJ, Park YJ, Lee KY, Choi BS, Yang CW, Kim YS, et al. Analysis

- of pretransplant ELISA-Panel reactive antibody in kidney transplant patients. *J Korean Soc Transplant* 2004;18:134-9. (오은지, 박연준, 이교영, 최범순, 양철우, 김용수 등. 신장이식 환자에서 이식 전 ELISA-Panel Reactive Antibody 검사의 분석. *대한이식학회지* 2004;18:134-9.)
5. El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Hum Immunol* 2005;66:989-97.
  6. 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.
  7. Song SM, Park BT, Yang YS. Performance analysis of panel reactive antibody test by lambda antigen tray kit using enzyme-linked immunosorbent assay. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:583-7. (송선미, 박병택, 양윤선. 효소면역측정법을 이용한 Lambda Antigen Tray 키트의 Panel Reactive Antibody 검사 유용성 평가. *대한임상병리학회지* 2000; 20:583-7.)
  8. Zachary AA, Delaney NL, Lucas DP, Leffell MS. Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: I. Evaluation of the GTI QuikID assay and analysis of antibody patterns. *Hum Immunol* 2001;62:228-35.
  9. Remuzzi G, Lesti M, Gotti E, Ganeva M, Dimitrov BD, Ene-Iordache B, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of acute rejection in renal transplantation (MYSS): a randomised trial. *Lancet* 2004;364:503-12.
  10. Hopkins KA, Zachary AA, et al. eds. ASHI laboratory manual. Lexnexa: American society for histocompatibility and immunogenetics, 1990;195.
  11. 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 Flow-PRA, ELISA and CDC vs luminex screening. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:223-6.
  12. Whang DH, Yang YS, Hong HK. Allele and haplotype frequencies of human leukocyte antigen-A, -B, and -DR loci in Koreans: DNA typing of 1,500 cord blood units. *Korean J Lab Med* 2008;28:465-74. (황동희, 양윤선, 홍혜경. 한국인에서 Human Leukocyte Antigen-A, -B, -DR 대립유전자와 일배체형 빈도: 제대혈 1,500단위의 DNA 형별검사. *대한진단검사의학회지* 2008;28:465-74.)
  13. Hwang SH, Oh HB, Yang JH, Kwon OJ, Shin ES. Distribution of HLA-A, B, C allele and haplotype frequencies in Koreans. *Korean J Lab Med* 2004;24:396-404. (황상현, 오홍범, 양진혁, 권오중, 신은순. 한국인의 HLA-A, -B, -C 대립유전자와 일배체형 분포. *대한진단검사의학회지* 2004;24:396-404.)
  14. Lee PC, Ozawa M, Hung CJ, Lin YJ, Chang SS, Chou TC. Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:95-8.
  15. Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation* 2009;87:1681-8.