태아신생아 용혈성질환 진단에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 임상적 의의

나현진¹ · 이은경¹ · 송재우¹ · 정준원² · 김현옥¹

연세대학교 의과대학 세브란스병원 진단검사의학교실¹, 내과학교실²

The Clinical Significance of Implementing Concurrent Direct Antiglobulin Test and Antibody Elution Test in Diagnosing Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn

Hyunjin Nah¹, Eunkyung Lee¹, Jaewoo Song¹, June-Won Cheong², Hyun Ok Kim¹

Departments of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine², Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) is a condition in which immune hemolytic anemia occurs in fetuses or newborns as a result of maternal alloimmunized antibodies transfer. Antibody elution test and direct antiglobulin test (DAT) can be performed to diagnose HDFN; maternal originated antibodies cannot be confirmed if DAT is utilized alone. In this study, we analyzed the clinical significance of implementing concurrent DAT and antibody elution test in diagnosing HDFN.

Methods: We retrospectively analyzed the DATs and antibody elution tests that were simultaneously conducted in a period of 11 years, between 2005 and 2015, in newborns that received hemoglobin, reticulocyte, and total bilirubin tests. According to the results of these tests, the number of newborns diagnosed with HDFN was measured. Furthermore, the sensitivity and specificity of DAT and antibody elution test were compared.

Results: Among 325 newborns, the results of DATs and antibody elution tests were both negative in 208 (64.0%), negative and positive, respectively, in 80 (24.6%), positive and negative in 10 (3.1%), both positive in 27 (8.3%). When this was compared to the clinical diagnosis of HDFN, more sensitive and specific diagnoses were possible when implementing DAT and antibody elution test together (sensitivity of 76.9% for antibody elution test and specificity of 90.3% for DAT). Twenty-six (8.0%) newborns suspected for HDFN showed clinically significant hemolytic anemia.

Conclusion: It is necessary to conduct both DAT and antibody elution test when HDFN is suspected. The severity of hemolysis in HDFN can be indirectly anticipated using an antibody elution test confirming maternal originated alloantibodies. (Korean J Blood Transfus 2017;28:238-247)

Key words: Direct antiglobulin test, Antibody elution test, Hemolytic disease of the fetus and newborn

Received on November 9, 2017. Revised on November 24, 2017. Accepted on November 29, 2017

Correspondence to: Hyun Ok Kim

Department of Laboratory Medicine, Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea
Tel: 82-2-2228-2444, Fax: 82-2-364-1583, E-mail: hyunok1019@yuhs.ac, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4964-1963>

© 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.
Copyright ©2017 The Korean Society of Blood Transfusion

서론

태아신생아 용혈성질환은 산모의 면역글로불린 G (immunoglobulin G, IgG) 적혈구 동종항체가 태반을 통과하여 태아 또는 신생아의 해당 항원을 가지는 적혈구를 파괴하기 때문에 발생한다. 심각한 경우에는 태아 빈혈이나 사망을 초래하며, 출생 후 심한 형태의 신생아 황달과 이로 인한 핵황달(kernicterus)을 일으켜 장애를 남길 수 있다[1]. 출생 후 신생아가 태아신생아 용혈성질환이 의심되는 경우 신생아 적혈구에 대한 ABO 및 RhD 혈액형검사와 직접항글로불린검사를 시행하고, 산모에 대해서는 ABO 및 RhD 혈액형검사와 비예기항체 선별검사를 시행하도록 하고 있다[2].

직접항글로불린검사는 신생아에게 나타나는 면역성과 비면역성 용혈반응을 구별하기 위해 시행하는 검사로서, 생체 내에서 적혈구 표면에 IgG나 보체 C3b 또는 C3d가 부착되어 있는지를 알려준다. 우선 다특이성(polyspecific) 항글로불린 시약을 사용하여 양성을 보이면 anti-IgG 및 anti-C3 단특이성(monospecific) 항글로불린 시약을 이용하여 적혈구 표면 부착 단백질의 종류를 결정하게 된다[3].

항체용출검사는 적혈구에 부착된 다양한 종류의 항체를 분리시켜 기능적인 상태로 얻는 방법으로, 감작된 항체의 특이성을 동정할 때 시행하게 된다[4]. 직접항글로불린검사서 음성이지만 용출액으로 농축하여 소량의 적혈구 부착 항체를 검출하거나[5], 용출액에서 항체의 특이성을 확인하고 모체의 혈액형과 비교함으로써 태아신생아 용혈성 빈혈의 원인 항체를 규명하여 진단에 도움을 주기 위해 항체용출검사를 시행할 수 있다[2].

대한임상검사정도관리협회의 혈액은행 외부

정도관리에 항체용출검사가 포함되어 있지 않아 국내의 자료는 없지만, 항체용출검사를 실제로 실시하는 기관의 수는 한정되어 있을 것으로 추정한다. 그러나 태아신생아 용혈성질환에서 직접항글로불린검사만 시행할 경우 모체 유래 항체가 증명되지 않을 수 있다. 한 연구에 의하면 ABO 부적합에 의한 태아신생아 용혈성질환 신생아에서 직접항글로불린검사가 음성으로 나온 비율이 35%였다[6]. 또한 직접항글로불린검사는 300에서 500분자 이상의 IgG 항체를 검출할 수 있어 그보다 낮은 수의 항체가 신생아의 적혈구에 부착되어 있는 경우에는 검출되지 않을 수 있기 때문이다[5].

따라서 본 연구에서는 태아신생아 용혈성질환이 의심되는 환아에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 시행되었던 결과를 후향적으로 분석하여, 실제로 태아신생아 용혈성질환으로 진단된 환자에서 두 검사가 어떠한 결과를 보이며, 처음부터 이 두 검사를 동시해 시행하는 경우 어떠한 임상적인 정보를 줄 수 있는지에 대한 자료를 제공하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

세브란스병원 혈액은행에서 2005년 1월 1일부터 2015년 12월 31일까지 11년간 태아신생아 용혈성질환이 의심되어 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 동시에 시행되었던 신생아(생후 1개월 미만)를 대상으로 하였다. 이중 용혈의 소견을 확인하기 위한 검사로 직접항글로불린검사 및 항체용출검사 의뢰일 전후 3일에 혈액색소, 망상적혈구, 총빌리루빈을 모두 검사한 신생아에 대하여 분석을 실시하였다. 대상 환자에 대해 나이,

성별을 조사하였으며, 환자의 혈액형과 모체의 혈액형, 그리고 모체의 비예기항체 검사 결과를 조사하였다. 모체가 비예기항체 양성인 경우 신생아의 해당 항원 여부도 조사하였다. 본 연구는 연세의료원 세브란스병원 임상연구보호센터 연구심의위원회의 승인을 통과하였다(IRB 승인번호: 4-2016-0046).

2. 검사방법

직접항글로불린검사는 우선 원주응집법을 시행하였다. 다특이성 항글로불린이 첨가된 ID-Card LISS/Coombs (BioRad, Cressier, Switzerland)에 ID-Diluent II (modified LISS, BioRad)로 희석한 0.8~1.0% 적혈구 부유액을 50 μ L 분주하여 원심 침전 후 반응을 보았다. 양성이 나올 경우 시험관법을 시행하였다. 3개의 시험관에 각각 3~5% 적혈구 부유액을 1방울 넣어 3번 세척한 후, 각 시험관에 다특이성 항글로불린 시약(BioClone Anti-IgG, -C3d Polyspecific Green, Ortho-Clinical Diagnostics, Pencoed, UK), 단특이성 항글로불린 시약(Ortho Anti-IgG, Ortho-Clinical Diagnostics), 항 C3b, 항 C3d (Anti-C3b, -C3d BioClone, Ortho-Clinical Diagnostics)을 각각 두 방울 가하여 응집여부를 관찰하였다. 응집이 없는 경우는 위음성을 배제하기 위하여 IgG 감작 적혈구를 한 방울 첨가하여 응집을 확인하였다. 항체용출검사는 2005년부터 2007년까지 가열 용출법(heat elution method)을 사용하였다. 가열 용출법은 우선 적혈구를 5~6회 세척한 뒤 동량의 알부민(Ortho Bovine Albumin Solution Polymerized Bovine Albumin, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, USA)을 6%로 희석하여 혼합하였다. 56°C 수조에서 10분간 흔들면서 항온한 뒤 원심 침전하여 상층액을 이용하여 검사를 진행하였다. 2008년부터 2015년까지는 AABB Technical manual method를 변형하여 glycine acid

EDTA 법으로 항체용출검사를 시행하였다[7]. Glycine acid EDTA 법의 시약은 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), Glycine hydrochlorid (Sigma-Aldrich), TRIZMA base 용액(Sigma-Aldrich)으로 자가 제조하여 사용하였다. 6회 세척한 적혈구 500 μ L에 TRIZMA 용액을 50 μ L를 첨가하고 원심 침전하였다. 상층액을 다른 시험관에 옮겨 TRIZMA 용액을 25 μ L씩 첨가하여 pH 7.0~7.4에 맞춘 뒤 원심 침전하여 상층액을 이용하여 검사를 진행하였다. 두 검사법 모두 분리한 용출액을 이용하여 선별용 혈구(SELECTOGEN I & II, Ortho-Clinical Diagnostics)와 ID-Micro Typing System IgG, -C3d Card (Ortho-Clinical Diagnostics)에서 비예기항체 선별검사를 실시하였으며, 여기서 반응이 없는 경우 A1 및 B 혈구(Affirmagen A1 and B, Ortho-Clinical Diagnostics, Pencoed, UK)와의 반응을 검사하였다.

3. 항체용출검사의 방법에 따른 항체 회수율 비교

본 기관에서 시행된 가열 용출법과 glycine acid EDTA법에 따른 항체 회수율을 비교하기 위하여 2005년부터 2007년까지 의뢰된 신생아의 검사 결과와 2008년부터 2015년까지 의뢰된 검사 결과를 나누었다. 그리고 직접항글로불린검사가 다특이성 시약과의 반응 양성 및 anti-IgG 시약과의 반응 양성인 신생아 검체 가운데 항체용출검사가 양성으로 나오는 신생아 검체의 수를 구하였다. 이를 독립표본 t-검정을 통하여 서로 비교하였다.

4. 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과의 분석방법

태아신생아 용혈성질환이 의심되었고, 혈액소, 망상적혈구, 총빌리루빈을 모두 검사한 신생아를

대상으로 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 결과에 따라 각각 음성과 음성, 음성과 양성, 양성과 음성, 양성과 양성으로 분류하였다. 각각에 해당하는 신생아 수를 조사하고, 항체용출검사가 양성일 경우 용출액에서 동정된 항체에 따라 anti-A 또는 anti-B 항체, anti-D 항체, anti-D를 제외한 동종항체에 해당하는 신생아의 수를 조사하였다.

위 신생아 중 다음의 세가지 기준을 모두 만족하는 경우 태아신생아 용혈성질환의 추정 진단 [8]으로 간주하고 해당하는 신생아의 수를 구하였다. 첫째, 모체와 환자의 ABO 또는 RhD 형, 기타 다른 혈액형의 부적합이 있으며, 모체가 태아 적혈구 항원에 부착 가능한 anti-A, anti-B, 비에기 항체를 가지고 있다. 둘째, 신생아의 검사 결과 상 혈색소가 14.0 g/dL 미만, 망상적혈구가 2.31%를 초과, 총빌리루빈이 1.2 mg/dL를 초과하는 수치를 모두 만족한다(혈색소, 망상적혈구, 총빌리루빈 결과치는 본 의료기관에 설정된 환자 연령에 해당하는 참고치를 기준으로 함). 셋째, 다른 면역성 또는 비면역성 용혈의 증거를 찾을 수 없다.

앞서 구한 태아신생아 용혈성질환으로 추정 진단된 신생아를 질병이 있는 집단으로, 이에 속하지 않는 신생아를 질병이 없는 집단으로 보고, 질병이 있는 집단 가운데 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사 양성 신생아의 수를 각각 구하여 검사의 민감도(sensitivity)를 계산하였다. 또한 질병이 없는 집단 가운데 직접항글로불린검사 또는 항체용출검사 음성 신생아의 수를 각각 구하여 검사의 특이도(specificity)를 계산하였다.

5. 통계 분석

통계 분석은 Microsoft Excel (version 14.0.4760.1000, Microsoft Corporation, Redmond, WA), SPSS (PASW Statistics 18, SPSS Inc., Chicago, IL), MedCalc

(version 17.9.7, MedCalc software, Mariakerke, Belgium)를 이용하였다. 모든 통계적 유의 수준은 *P* value 0.05를 기준으로 하였다.

결 과

1. 항체용출검사 방법에 따른 회수율 비교

2005년부터 2007년까지 직접항글로불린검사의 다특이성 시약과 anti-IgG 시약에서 양성을 보인 신생아의 검체는 7개였고, 이 가운데 가열 용출법으로 5개(71.4%)의 검체에서 항체용출검사가 양성을 보였다. 그 특이성은 anti-D가 3개, anti-A와 anti-B가 각각 1개씩 동정되었다. 2008년부터 2015년까지 직접항글로불린검사의 다특이성 시약과 anti-IgG 시약에서 양성을 보인 신생아의 검체는 25개였고, 이 가운데 glycine acid EDTA법으로 19개(76.0%)의 검체에서 항체용출검사가 양성

Table 1. Comparison of recovery between Heat method and Glycine EDTA method for antibody elution test in eluates from antecedent positive DATs using polyspecific and anti-IgG antihuman globulin

Results	Heat method*	Glycine acid EDTA method*
Reactive eluates	5 (71.4%) [†]	19 (76.0%) [‡]
Nonreactive eluates	2 (28.6%)	6 (24.0%)
Total positive DATs	7 (100%)	25 (100%)

*No significant difference between reactive rates of antibody elution tests performed with heat method and glycine acid EDTA method (*P*=0.818); [†]The specificity of eluates from heat methods are three anti-D, one anti-A, and one anti-B; [‡]The specificity of eluates from glycine acid EDTA methods are nine anti-D, five anti-A, three anti-B, one anti-A and anti-D, and one anti-E and anti-c. Abbreviation: DAT, direct antiglobulin test.

을 보였다. 그 특이성은 anti-D가 9개, anti-A가 5개, anti-B가 3개, anti-A 및 anti-D가 1개, anti-E 및 anti-c가 1개 동정되었다. 따라서 본 기관에서 일정 기점을 기준으로 변경된 두 방법의 회수율의 통계적인 차이가 없음($P=0.818$)을 확인하였다(Table 1).

2. 태아/신생아 용혈성질환에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과의 임상적 의의

신생아를 대상으로 두 검사가 동시에 의뢰된 숫자는 332명이었으며 남아 186명, 여아 146명이었다. 이중 용혈의 소견을 확인하기 위한 검사로 혈액소, 망상적혈구(%), 총빌리루빈을 모두 검사한 신생아는 325명으로 이에 대하여 분석을 실시하였다.

직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과에 따른 신생아의 수와 이 가운데 태아신생아 용혈성질환으로 추정 진단된 신생아의 수를 Table 2에 정리하였다.

직접항글로불린검사와 항체용출검사 모두 음성인 신생아가 208명(64.0%)으로 가장 많았다. 여기서 태아신생아 용혈성질환으로 진단될 수 있는 신생아는 5명이었다. 이 환자들은 모체에서 유래한 항체가 환아의 적혈구를 감작시킨 증거가 없었지만, 신생아와 모체간에 혈액형 부적합이 존재하고 명백히 검사 소견 상 용혈성 빈혈을 보이며, 다른 면역성 또는 비면역성 용혈의 원인도 찾을 수 없어 태아신생아 용혈성질환에 포함하였다.

직접항글로불린검사와 항체용출검사 중 한 검사에서라도 양성인 경우는 117명으로 양성율은

Table 2. Results of DATs and antibody elution tests in 325 patients and correlation with the clinical diagnosis of HDFN

DAT	Elution	Total No. of patients	Red cell sensitization of the patients		No. of patients diagnosed as HDFN*
			Antibody specificity in eluates	No. of patients	
Negative	Negative	208 (64.0%)	-	-	5
Negative	Positive	80 (24.6%)	Anti-A or B	39	7
			Anti-D	39	6
			Anti-B + Anti-D	1	0
			Unidentified antibody	1	0
			-	-	0
Positive	Negative	10 (3.1%)	-	-	1
Positive	Positive	27 (8.3%)	Anti-A or B	11	2
			Anti-D	13	4
			Anti-A + Anti-D	1	0
			Anti-E	1	1
			Anti-E + Anti-c	1	0
Total		325 (100%)		107	26

*The presumptive diagnosis of HDFN was made when the patient meets all of the following three criteria: 1) incompatibility of ABO, RhD, and other blood types between mother and child with detection of corresponding antibody in the maternal serum was confirmed, 2) laboratory test results are Hb < 14.0 g/dL and reticulocyte (%) > 2.31% and total bilirubin > 1.2 mg/dL, 3) evidence of other immune or non-immune causes of hemolytic anemia could not be found.

Abbreviations: DAT, direct antiglobulin test; HDFN, hemolytic disease of the fetus and newborn.

Table 3. Diagnostic performance of DAT and antibody elution test in HDFN

	True positive	False positive	True negative	False negative	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
DAT	8	29	270	18	30.77% (14.33% to 51.79%)	90.30% (86.37% to 93.41%)
Antibody elution test	20	87	212	6	76.92% (56.35% to 91.03%)	70.90% (65.40% to 75.99%)

Abbreviations: DAT, direct antiglobulin test; HDFN, hemolytic disease of the fetus and newborn; CI, confidence interval.

36.0%였다. 직접항글로불린검사가 음성이나 항체용출검사에서 양성인 신생아는 80명(24.6%)으로, anti-A 또는 B가 용출된 경우가 39명, anti-D가 용출된 경우가 39명, anti-B와 anti-D가 동시에 용출된 경우가 1명, 특이성을 동정할 수 없었던 경우가 1명이었다. 여기서 태아신생아 용혈성질환이 진단 가능한 경우가 13명이었다. 이 중 anti-A 또는 B가 용출된 7명의 환자의 산모는 모두 O형이었다. Anti-D가 용출된 6명의 신생아는 모두 RhD 양성으로, RhD 음성 산모에서 태어났으며, 1명을 제외하고 산모의 RhD 면역글로불린 투여 이력을 확인할 수 있었다. Anti-B와 anti-D가 동시에 용출된 1명의 신생아와 특이성이 동정 불가능한 항체가 용출된 1명의 신생아 모두 태아신생아 용혈성빈혈이 관찰되지 않았다.

직접항글로불린검사가 양성이나 항체용출검사가 음성인 경우도 10명(3.1%)에서 관찰되었다. 태아신생아 용혈성질환으로 진단 가능한 신생아는 1명이었다. 이 신생아는 모체에서 유래한 것으로 의심되는 항체가 환자의 적혈구에서 용출되지는 않았지만, 정주용 면역글로불린(intravenous immunoglobulin, IVIG)을 사용한 이력은 없었으며, O형의 산모에서 출생한 B형 신생아였다.

직접항글로불린검사 및 항체용출검사 모두 양성인 경우는 총 27명(8.3%)으로, anti-A 또는 B가 용출된 경우가 11명, anti-D가 용출된 경우가 13

명이었다. 그리고 3명에서 각각 anti-A와 anti-D, anti-E와 anti-c, 그리고 anti-E가 1명씩 용출되었다.

이를 바탕으로 민감도와 특이도를 계산해 보았을 때, 직접항글로불린검사의 민감도는 30.8% (8/26), 특이도는 90.3% (270/299)였고, 항체용출검사의 민감도는 76.9% (20/26), 특이도는 70.9% (212/299)였다(Table 3).

고 찰

직접항글로불린검사와 항체용출검사는 혈액은행에서 면역용혈성 빈혈의 진단에 가장 중요한 검사로 특히 태아신생아 용혈성질환에서 직접항글로불린검사를 통하여 모체에서 유래한 IgG 항체가 태아의 적혈구 표면에 부착되어 있음을 확인할 수 있으며, 항체용출검사를 통하여 이를 동정하고 모체와 태아 또는 신생아의 혈액형 상의 부적합을 증명하는데 시행되고 있다[2].

직접항글로불린검사는 비교적 표준화되어 있는 반면 항체용출검사의 방법은 다양하며, 온도 변화를 이용한 방법, 산도(pH) 변화를 이용한 방법, 화학 물질(chemical)을 사용하는 방법, 유기용매(organic solvent)를 이용하는 방법 등이 있다[9-13]. 각 항체용출검사법에 따라 항체의 회수율에는 차이가 있으며, 이중 glycine acid EDTA 법이 비교적 가장 민감한 방법으로 소개되고 있다

[10,12,13]. 또한 가열 용출법을 사용할 수 있지만 ABO 항체 이외에는 검출이 잘 되지 않아 ABO 부적합에 의한 태아신생아 용혈성질환에서만 사용하도록 하고 있다[14]. 본 기관에서는 2008년을 기점으로 항체용출검사의 방법을 가열 용출법에서 glycine acid EDTA법으로 변경한 바 있으며, 후향적인 자료를 바탕으로 분석해 보았을 때 이 두 방법 사이에 회수율에는 통계적으로 유의미한 차이가 없었다. 그러나 이를 통하여 본 기관에서 항체용출검사의 방법을 변경하였을 때 회수율의 차이가 없었음을 알 수 있었을 뿐이며, 두 방법상의 동등성을 엄격하게 비교한 것은 아니다. 실험에 영향을 주는 조건과 변수를 충분하게 통제하여 평가를 한다면 적혈구 부착 항체의 종류에 따른 각 항체용출검사 방법의 회수율은 이전 문헌들과 마찬가지로 차이가 날 것으로 보인다 [9-13].

본 연구에서 두 검사가 동시에 의뢰되고 혈액소, 망상적혈구, 총빌리루빈검사를 시행한 325명의 신생아 중 27명이 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 양성을 보였으며, 직접항글로불린검사에서는 음성이었으나 항체용출검사에서는 양성을 확인할 수 있었던 신생아는 80명으로 태아신생아 용혈성질환의 유무에 관계없이 모체에서 유래한 항체가 태아와 신생아의 적혈구를 감작시킬 수 있음을 알 수 있었다. 이렇게 신생아에 따라 서로 감작되는 수준이 다른 가장 큰 요인은 모체의 혈청에 존재하는 항체의 역가가 다르기 때문으로 해석하였다. 특히 ABO 태아신생아 용혈성질환의 경우 항체용출검사서 anti-A 또는 anti-B가 용출되고, 태아신생아 용혈성질환으로 진단된 신생아 9명이 모두 O형 산모에서 출생하였다. O형인 사람은 IgG인 anti-A 및 anti-B의 역가가 A형이나 B형의 산모보다 더 높게 존재함은 이미 잘 알려져 있다[2]. Rh 태아신생아 용혈성질

환도 산모의 혈청에 원인이 되는 anti-D나 anti-E 등 항체의 역가가 이전 임신 또는 수혈 여부 등에 의하여 다를 수 있다[2,8,14].

그러나 본 연구에서 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 음성임에도 임상적으로 태아신생아 용혈성질환으로 진단된 신생아가 208명 중 5명(2.4%)있었다. 이 신생아들은 다른 용혈의 원인이 될 만한 증거도 찾을 수 없었다. Desjardins 등 [15]에 의하면 만약 태아와 모체 사이에 혈액형의 부적합이 존재한다면 직접항글로불린검사나 항체용출검사서 환아 적혈구의 감작이 증명되지 않더라도 용혈의 증거가 존재할 수 있다고 하였다. 또한 본 연구에서는 10명에서 직접항글로불린검사가 양성이나 항체용출검사가 음성인 신생아가 있었다. 적혈구에 부착된 항체의 수가 작거나 결합력이 약하여 직접항글로불린검사가 음성이나 항체용출검사가 양성으로 나올 수는 있으나 그 반대의 경우는 통상적으로 적혈구에 부착된 단백질이 IgG 항체가 아닌 다른 단백질(IgM, IgA, 그리고 보체)이거나, IgG 항체의 비면역성 결합, 또는 약제에 의한 용혈성빈혈을 의심하게 된다 [16-18]. 또한 항체용출검사서 시약에 의하여 항체의 분리가 실패한 경우도 가능하다[5]. 즉, 직접항글로불린검사서 anti-IgG가 양성이라고 하더라도 항상 항체가 용출되는 것은 아니고, 특히 용출 방법에 따라 그 회수율이 다를 수 있다 [9-13]. 실제로 본 연구에서 10명의 신생아 가운데 태아신생아 용혈성질환으로 진단할 수 있었던 환자는 1명으로, 이 신생아는 O형 산모에서 출생한 B형으로 직접항글로불린검사서 다특이성 및 anti-IgG 시약에만 양성이고 IVIG도 사용하지 않았으며, 다른 비면역성 용혈의 증거도 찾을 수 없어 항체용출검사가 위음성이었을 것으로 추정하였다.

신생아의 적혈구가 감작됨을 직접항글로불린

검사와 항체용출검사에서 확인하더라도 모든 신생아가 빈혈이 나타나는 것은 아니었다. 직접항글로불린검사 음성, 항체용출검사 양성 신생아 80명 가운데 13명(16.3%)만이 태아신생아 용혈성질환에 의한 빈혈이 관찰되었는데 직접항글로불린검사와 항체용출검사가 모두 양성인 신생아 27명 가운데 조금 더 많은 비율인 7명(25.9%)에서 빈혈이 관찰되었다. 즉, 태아신생아 용혈성질환은 단지 태아 적혈구의 IgG 감작만을 보이는 경우부터 태아사망까지 다양한 양상을 보일 수 있으며[15], 이를 진단하기 위해서는 직접항글로불린검사 및 항체용출검사뿐만 아니라 환자의 임상양상이나 다른 검사도 같이 참고해야 할 것으로 판단된다. 즉, 신생아의 적혈구에 모체 유래 항체가 부착된 정도는 용혈의 심한 정도와 잘 연관되지 않을 수 있다[15]. 이는 적혈구 표면에 부착된 항체의 양 이외에도 IgG subgroup 등 다른 요소가 용혈의 정도에 관여함을 의미하는데[19], 본 연구에서는 IgG에 대한 subgroup을 검사하지 않아 그 부분까지는 검증하지 못하였다.

태아신생아 용혈성질환이 의심되는 경우 일반적으로 직접항글로불린검사를 시행하게 된다. 본 기관에서는 항체용출검사와 병행하여 시행한 결과 직접항글로불린검사에서 음성이었던 환자의 80명에서 항체용출검사 양성의 결과를 보여주었으며, 항체용출검사의 민감도가 76.9%로 직접항글로불린검사의 30.8%보다 높았다. Song 등[6]에 의하면 원인항체에 따라 직접항글로불린검사의 민감도는 항체의 종류마다 달랐으며, 전체적으로는 88.1%였다. 그리고 항체용출검사의 민감도는 전체적으로 100%였다. 본 연구에 비하여 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 민감도는 각각 더 높았지만, 항체용출검사의 민감도가 직접항글로불린검사보다 더 높은 점은 본 연구와 일치하였다. 그리고 다른 문헌에 의하면 특히 ABO 및

Kell 혈액형 불일치에 의한 경우 직접항글로불린검사가 음성으로 나올 수 있다고 기술하고 있었다[8].

이를 볼 때 신생아가 태아신생아 용혈성질환이 의심될 경우 직접항글로불린검사뿐만 아니라 항체용출검사를 동시에 실시해야 하며, 직접항글로불린검사가 음성이라고 해서 항체 용출 검사를 시행하지 않고 태아신생아 용혈성 질환을 배제해서는 안될 것으로 판단되었다[2,6].

결론적으로 본 연구에서는 혈액은행으로 의뢰되었던 검사 결과를 바탕으로 후향적으로 그 임상적 의의를 분석하여 신생아에서 태아신생아 용혈성질환이 의심되는 경우 두 검사를 동시에 시행하고 연관하여 해석하는 경우 좀 더 민감하게 질환을 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 태아신생아 용혈성질환이 임상적으로 심한 정도를 두 검사가 직접적으로 반영하지는 않겠지만, 항체용출검사로 증명한 모체 유래 항체의 종류를 통하여 임상적으로 심한 정도를 간접적으로 예측하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

요 약

배경: 태아신생아 용혈성질환은 모체 유래의 동종항체로 인하여 태아 및 신생아에서 면역용혈성 빈혈이 발생하는 질환이다. 진단을 위해 직접항글로불린검사와 더불어 항체용출검사가 시행될 수 있으나 직접항글로불린검사만 단독으로 시행하는 경우 모체 유래 항체가 증명되지 않을 수 있다. 이에 본 연구에서는 태아신생아 용혈성 질환을 진단하기 위해 두 검사가 동시에 의뢰되었던 신생아를 대상으로 두 검사를 동시에 시행하는 것의 임상적 의미를 분석하고자 하였다.

방법: 2005년부터 2015년도까지 최근 11년간 세브란스병원에서 직접항글로불린검사와 항체

용출검사가 동시에 의뢰된 신생아에서 혈색소, 망상적혈구, 총빌리루빈 검사 소견이 있는 신생아에 대해 의무기록을 후향적으로 조사하여 분석하였다. 그리고 각 검사 결과에 따라 태아신생아 용혈성질환이 진단된 환자의 수를 분류하고, 직접항글로불린검사와 항체용출검사의 민감도 및 특이도를 구하였다.

결과: 대상 신생아 325명 중 직접항글로불린검사와 항체용출검사 결과가 각각 음성과 음성인 경우는 208명(64.0%), 음성과 양성인 경우는 80명(24.6%), 양성과 음성은 10명(3.1%), 그리고 양성과 양성인 경우는 27명(8.3%)이었다. 임상적 진단을 연관하여 분석한 결과 태아신생아 용혈성질환에서 두 검사를 동시에 시행할 경우 더 민감하고 특이적으로 진단이 가능하였다(항체용출검사의 민감도 76.9%, 직접항글로불린검사의 특이도 90.3%). 태아신생아 용혈성 질환이 의심되어 검사가 의뢰된 신생아 가운데 용혈성빈혈까지의 임상증상을 보인 경우는 26명(8.0%)이었다.

결론: 태아신생아 용혈성질환이 의심되는 경우 직접항글로불린검사와 항체용출검사를 병행하여 시행할 경우 그 진단율을 높일 수 있으며 항체용출검사로 증명한 모체 유래 항체의 종류를 통하여 용혈의 임상적 중증도를 간접적으로 예측할 수 있을 것으로 보인다.

References

1. de Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2015;109:99-113
2. Han KS, Park KU, Song EY. Transfusion medicine. 4th ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher, 2014:100-6
3. Han KS, Park KU, Song EY. Transfusion medicine. 4th ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher, 2014:145-52
4. Yazer MH, Triulzi DJ. The role of the elution in antibody investigations. *Transfusion* 2009; 49:2395-9
5. Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol* 2005;42:156-64
6. Song EY, Han BY, Hwang DH, Choi JH, Park SS, Kim EC, et al. Analysis of antibodies causing hemolytic disease of the newborn. *Korean J Blood Transfus* 1998;9:235-41
7. Byrne PC. Use of a modified acid/EDTA elution technique. *Immunohematology* 1991;7: 46-7
8. Kliegman R, Stanton B, Geme JS, Schor NF, Behrman RE. Nelson textbook of pediatrics. 20th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2016:880-9
9. South SF, Rea AE, Tregellas WM. An evaluation of 11 red cell elution procedures. *Transfusion* 1986;26:167-70
10. Burin des Roziers N, Squalli S. Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods. *Transfusion* 1997;37:497-501
11. Alvarez A, Rives S, Montoto S, Sanz C, Pereira A. Relative sensitivity of direct antiglobulin test, antibody's elution and flow cytometry in the serologic diagnosis of immune hemolytic transfusion reactions. *Haematologica* 2000;85: 186-8
12. Lee SH, Oh YC, Kim KH, Han KS, Han BY, Kim SI. IgG elution methods using glycine acid EDTA: comparison to chloroquine method. *Korean J Blood Transfus* 1993;4:61-6
13. Katharia R, Chaudhary RK. Removal of antibodies from red cells: comparison of three elution methods. *Asian J Transfus Sci* 2013;7: 29-32
14. Fung MK. Technical manual. 18th ed. Beth-

- sda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2014:391-424
15. Desjardins L, Blajchman MA, Chintu C, Gent M, Zipursky A. The spectrum of ABO hemolytic disease of the newborn infant. *J Pediatr* 1979;95:447-9
16. Heddle NM, Kelton JG, Turchyn KL, Ali MA. Hypergammaglobulinemia can be associated with a positive direct antiglobulin test, a nonreactive eluate, and no evidence of hemolysis. *Transfusion* 1988;28:29-33
17. Fung MK. Technical manual. 18th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2014:425-45
18. Pierce A, Nester T; Education Committee of the Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientists. Pathology consultation on drug-induced hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 2011;136:7-12
19. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2014:499-548