

## 不規則抗体スクリーニングにおける酵素法の意義

大橋 恒 石丸 健 天満 智佳 佐藤進一郎 加藤 俊明

池田 久實

背景：酵素法は、産生初期のRh抗体を感度良く検出できる特徴があり、我が国では多くの施設が不規則抗体スクリーニングにこの方法を組み込んでいる。しかし、酵素法は非特異反応があり臨床的意義のない冷式抗体を検出しやすく、場合によっては必要な輸血を遅延させてしまう恐れがある。今回我々は酵素法で検出される抗体の性状を解析し、不規則抗体スクリーニングにおける酵素法の意義について検討を行った。

方法：酵素法陽性の特異抗体123例について、反応増強剤無添加の間接抗グロブリン法(Sal-IAT)、PEG法(PEG-IAT)、カラム凝集法(MTS-IAT)の3法を実施した。また、抗体の臨床的意義を評価するため、アイソタイプの鑑別とIgG抗体感作量の測定、および単球貪食能試験(MMA; monocyte monolayer assay)を実施した。

結果：3法とも陽性の71例をA群、Sal-IAT陰性でPEG-IATとMTS-IATのどちらかあるいはともに陽性の34例をB群、3法とも陰性の18例をC群に分類し、各群の抗体の性状を比較した。A群とB群はIgG1が主体であり、抗体感作量はC群よりも高く、MMAの陽性率はそれぞれ87%と24%であった。一方、C群はIgMが主体で、MMAは全例陰性であった。

結論：臨床的意義があると考えられる酵素法陽性の抗体は、PEG-IATやMTS-IATによって検出可能であった。高感度な間接抗グロブリン法で不規則抗体スクリーニングを行う場合、酵素法を実施する意義は低いと考えられた。

キーワード：酵素法、不規則抗体スクリーニング、抗体の臨床的意義

## はじめに

不規則抗体スクリーニング(以下、抗体スクリーニング)の検査法は、食塩液法、酵素法、間接抗グロブリン法の3法に大別される。当然、1法よりも2法、2法よりも3法を実施したほうが、抗体の検出率は上がる。しかし、検出された抗体のどれもが溶血性輸血副作用や新生児溶血性疾患に関与するわけではなく、臨床的意義のない抗体も数多く検出される。このため、単に検出率が高いという理由だけで検査法を選択し、抗体スクリーニングを行った場合、無意味な同定検査に時間が費やされ、患者への輸血が遅延しかねない。「輸血療法の実施に関する指針(改定版)」では、臨床的意義のある抗体の検出に優れた間接抗グロブリン法を必須としているが、食塩液法や酵素法についての記載はない<sup>1)</sup>。しかしながら、我が国においては、特に酵素法の実施率が高く、日本臨床衛生検査技師会の調査では8割以上の施設が抗体スクリーニングに酵素法を組み込んでいる<sup>2)</sup>。確かに、酵素法はRh抗体を感度良く検出できる方法であるが、一方で、輸血には全く無害な自己抗体や冷式抗体を数多く検出し、さらには非特

異反応も見られるため、検査の都合だけで輸血が大幅に遅れる場合もある<sup>3)</sup>。今回我々は、酵素法が陽性の抗体について性状解析を行い、抗体スクリーニングにおける酵素法の必要性について検討を行ったので報告する。

## 材料および方法

## 1. 酵素法陽性の特異抗体

約20万検体の献血者スクリーニングから検出された酵素法が陽性の特異抗体123例(抗D:12例, 抗E:76例, 抗c:1例, 抗e:2例, 抗Di<sup>a</sup>:8例, 抗Di<sup>b</sup>:1例, 抗S:4例, 抗Jr<sup>a</sup>:6例, 抗Le<sup>a</sup>:10例, 抗Le<sup>b</sup>:2例, 抗Pi:1例)を対象にした。なお、酵素法は、カラム凝集法によるパパイン2段法(Micro Typing System: DiaMed製)とプロメリン1段法の2法を併用したところ、パパイン2段法は全例が陽性であったが、プロメリン1段法は41例(抗D:1例, 抗E:17例, 抗e:1例, 抗Di<sup>a</sup>:8例, 抗Di<sup>b</sup>:1例, 抗S:1例, 抗Jr<sup>a</sup>:6例, 抗Le<sup>a</sup>:6例)が陰性であった。

## 2. 間接抗グロブリン法

各特異抗体について、反応増強剤無添加の間接抗グロブリン法(Sal-IAT)を実施した。さらに、高感度法<sup>4)</sup>として、ポリエチレングリコール添加間接抗グロブリン法(PEG-IAT)とカラム凝集法による間接抗グロブリン法(MTS-IAT)を実施した。Sal-IATとPEG-IATは成書<sup>5)</sup>に従い、PEG溶液はガンマPeG(Immucor製)を使用した。また、MTS-IATはMicro Typing System(DiaMed製)のIgGカードを用いて、使用説明書に準じて行った。

3法とも陽性の抗体をA群、Sal-IATが陰性でPEG-IATとMTS-IATのどちらかあるいはともに陽性の抗体をB群、3法とも陰性の抗体をC群に分類し、各群の抗体の性状を以下の方法で解析した。

## 3. フローサイトメトリー法によるアイソタイプの鑑別とIgG抗体感作量の測定

抗原陽性血球と抗原陰性血球(ともに $3 \times 10^6$ 個)に被検抗体をそれぞれ25 $\mu$ lずつ加え、37°Cで1時間加温後、PBSで3回洗浄して感作血球を作製した。これらの感作血球について、抗ヒトIgGおよびIgM・PE標識抗体(Jackson製)を用いたフローサイトメトリー法を実施し、平均蛍光強度のS/N(抗原陽性血球/抗原陰性血球)比が2以上の場合を陽性と判定して、IgGとIgMの鑑別を行った。さらに、IgGが確認された抗体は、上記の感作血球に抗ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4マウスモノクローナル抗体(Sigma製)をそれぞれ感作し、抗マウスIgG・PE標識抗体(Jackson製)を用いたフローサイトメトリー法により、サブクラスの鑑別を行った。なお、反応性が弱い抗体については、酵素処理血球を用いて測定した。

IgG抗体の感作量は、IgGの鑑別を行った際に測定した平均蛍光強度を定量値として用いた。

## 4. 単球貪食能試験(MMA; monocyte monolayer assay)による抗体の機能測定

Arndtら<sup>6)</sup>の方法を一部改変して実施した。単核球浮遊液の調製: 健常人よりFicoll-Conray法で分離した単核球層をPBSで2回洗浄し、RPMI 1640(Sigma製)に牛胎児血清(PAA製)を5%添加した培養液(5%FCS-RPMI)に $1 \times 10^7$ 個/mlとなるように単核球を浮遊させた。感作血球浮遊液の調製: 抗原陽性血球( $2.5 \times 10^7$ 個)に被検抗体100 $\mu$ l、新鮮正常血清50 $\mu$ lを加えて37°Cで1時間感作後、PBSで3回洗浄し、500 $\mu$ lの5%FCS-RPMIに浮遊させた。単球貪食能試験: 96穴平底マイクロプレート(Nunc製)に単核球浮遊液を100 $\mu$ l/wellずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>中で37°C1時間インキュベーション後、PBSで3回洗浄した。次いで、感作血球浮遊液を100 $\mu$ l/wellずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>中で37°C2時間インキュベーション後、PBSで3回洗浄し、May-Giemsa

染色を行い、鏡検により単球を100~200個カウントして貪食率を求めた。なお、各被検抗体の貪食率は、3名の健常人から分離・調製した単核球浮遊液を個別に使用して3回の測定を行い、その平均値を用いた。また、判定はArndtら<sup>6)</sup>が報告した貪食率のカットオフ値を参考にして、0~5%を陰性、5.1~20%を弱陽性、>20%を強陽性とした。

## 5. 統計

各群の比較は、アイソタイプがFisher's exact test、IgG抗体感作量と貪食率がWilcoxon rank sum testを用いて評価し、危険率5%未満を有意とした。

## 結 果

### 1. 抗体の特異性

酵素法陽性の抗体123例について、Sal-IAT、PEG-IAT、MTS-IATの反応性により分類した結果をTable 1に示す。A群(71例)はRh抗体が73%と最も多く、次いでDiego抗体が13%、抗Jr<sup>a</sup>が9%、抗Sが4%、抗Le<sup>a</sup>が1%であった。B群(34例)はRh抗体の割合が88%と高く、他は抗Sと抗Le<sup>a</sup>であった。C群(18例)は50%がRh抗体であったが、Lewis抗体も44%と比較的高率であった。

### 2. 抗体のアイソタイプ

IgG1、IgG2、IgG3、IgMは、それぞれ78%、6%、33%、40%の抗体に認められたが、IgG4は検出されなかった。アイソタイプ別に各群を比較した結果をFig. 1に示す。IgG1を含む抗体の割合は、A群(85%)およびB群(82%)と比較して、C群(44%)が有意に低かった。また、IgG3についてもC群(6%)はA群(42%)に対して有意に低かった。一方、IgMはC群(72%)が有意に高かった。

### 3. IgG抗体の感作量

IgG抗体感作量の中央値は、A群(88.3)、B群(20.9)、C群(8.0)の順に高く、各群の間に有意差がみられた(Fig. 2)。

### 4. MMAの貪食率

A群の貪食率は、B、C群に対して有意に高かった(Fig. 3)。また、IgG3はIgG1よりも高い貪食率( $P < 0.01$ )を示し、IgG2とIgMは何れも低値であった。さらに、貪食率とIgG抗体感作量には相関がみられた。

各群におけるMMAの判定結果は、A群に強陽性が42例(59%)と弱陽性が20例(28%)、B群に強陽性が2例(6%)と弱陽性が6例(18%)みられたが、C群は全て陰性であった。

## 考 察

抗体スクリーニングにおける酵素法の意義を検討した報告では、米国Issittら<sup>7)</sup>のretrospective studyが有

Table 1 Reactions of 123 enzyme-positive samples in Sal-IAT, PEG-IAT and MTS-IAT

	Sal-IAT	PEG-IAT and MTS-IAT	Anti-	Number (% **)
Group A (n = 71)	Positive	Positive	D	10 (14)
			E	41 (58)
			c	1 (1)
			Di <sup>a</sup>	8 (12)
			Di <sup>b</sup>	1 (1)
			Jr <sup>a</sup>	6 (9)
			S	3 (4)
			Le <sup>a</sup>	1 (1)
Group B (n = 34)	Negative	Positive*	D	2 (6)
			E	26 (76)
			e	2 (6)
			S	1 (3)
			Le <sup>a</sup>	3 (9)
			P <sub>1</sub>	1 (6)
Group C (n = 18)	Negative	Negative	E	9 (50)
			Le <sup>a</sup>	6 (33)
			Le <sup>b</sup>	2 (11)
			P <sub>1</sub>	1 (6)

\*PEG-IAT and/or MTS-IAT positive. \*\* Percentage in each group.

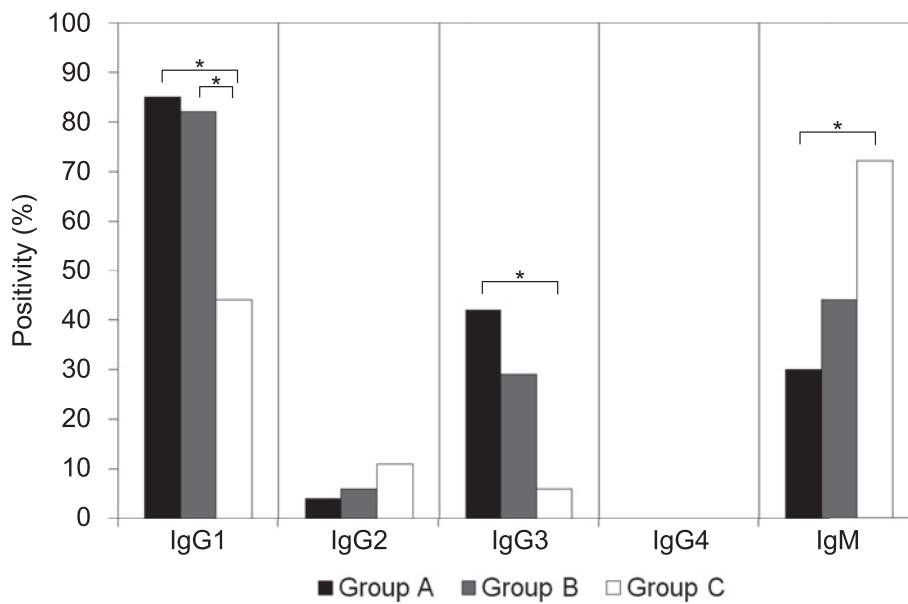


Fig. 1 Isotypes of 123 enzyme-positive alloantibodies  
\*P<0.01

名である。彼らは、間接抗グロブリン法が陰性で輸血を受けた患者の保管検体 10,000 例について、酵素法によるスクリーニングを行い、35 例の患者から特異抗体を検出した。これらの患者のうち 19 名(抗 E : 17 名, 抗 e : 1 名, 抗 c : 1 名)が不適合輸血を受けていたが、遅発性溶血性輸血副作用 (DHTR ; delayed hemolytic transfusion reaction) を認めたのは抗 c を保有する 1 名のみであった。また、酵素法スクリーニングでは、これらの特異抗体の他に、臨床的に無意味な自己抗体や冷式抗体などが 300 例以上検出され、同定検査や吸

収試験など、その精査には多大な労力を要した。結果として、彼らは、1 例の DHTR を防止するために 10,000 例の酵素法スクリーニングを行うことは、手間やコストの面から容認できないと結論している。こうしたエビデンスから、現在の米国では酵素法が抗体スクリーニングで常用されることはなくなった。英国においても同様に、BCSH (British Committee for Standards in Haematology) のガイドライン<sup>8)</sup>は、酵素法をルーチンで使用するについて否定的である。一方、日本輸血学会 (現、日本輸血・細胞治療学会) のガイドライ

ン<sup>9)</sup>では、酵素法の必要性については明言されていないが、間接抗グロブリン法が適切な条件下で行われていれば酵素法を行う意義は高くはないとしている。しかしながら、我が国における酵素法の実施率は、未だに高く、減少傾向もない<sup>2)</sup>。

酵素法は産生初期のRh抗体を感度良く検出できる特徴を持つが<sup>10)~12)</sup>、DHTRの防止に役立つとの統計学的な確証は得られていない。臨床的意義のある抗体の検

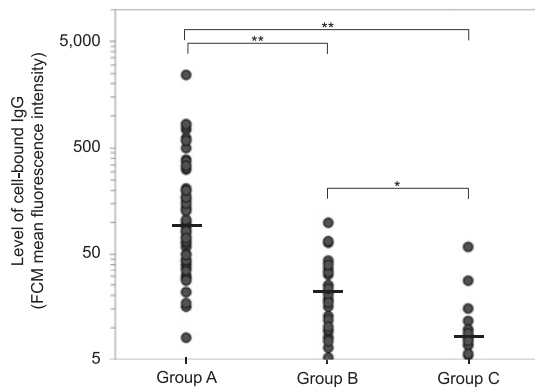


Fig. 2 Levels of cell-bound IgG of 123 enzyme-positive alloantibodies

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

出に最も優れている間接抗グロブリン法を行っても、DHTRは5,000~10,000回の輸血に1回程度の頻度で起こり得る<sup>12)~14)</sup>。免疫抗体の産生時期は輸血後2~16週と幅広く<sup>15)</sup>、産生後も約30%の抗体が1年以内に陰性化してしまうため<sup>16)17)</sup>、酵素法を追加しても、これ以上の防止効果は望めないのかも知れない。また、酵素法を廃止したことによってDHTRが増加したという報告もなく、Reisnerら<sup>18)</sup>は、アルブミン法による間接抗グロブリン法とパパイン2段法を用いて抗体スクリーニングを実施していた2年間(alb/pap期)と、PEG法による間接抗グロブリン法を実施していた2年間(PEG期)について比較を行い、Rh抗体の検出に有意差はなく( $p = 0.40$ )、DHTR発症数も増加しなかった(alb/pap期17例、PEG期11例)と報告している。このように、抗体スクリーニングにおける酵素法の利点は少なく、酵素法の実施は、非特異反応に由来する不必要な検査を増やすだけで、さらなる輸血副作用の防止効果はほとんど見込めないと考えられる。

では、実際に酵素法で検出される抗体は、どのような性状を持つのであろうか。まず、我々は酵素法陽性の抗体123例に対してSal-IAT、PEG-IAT、MTS-IATを実施し、各抗体を3群に分類した(Table 1)。抗体スクリーニングにおいて、間接抗グロブリン法は必須で

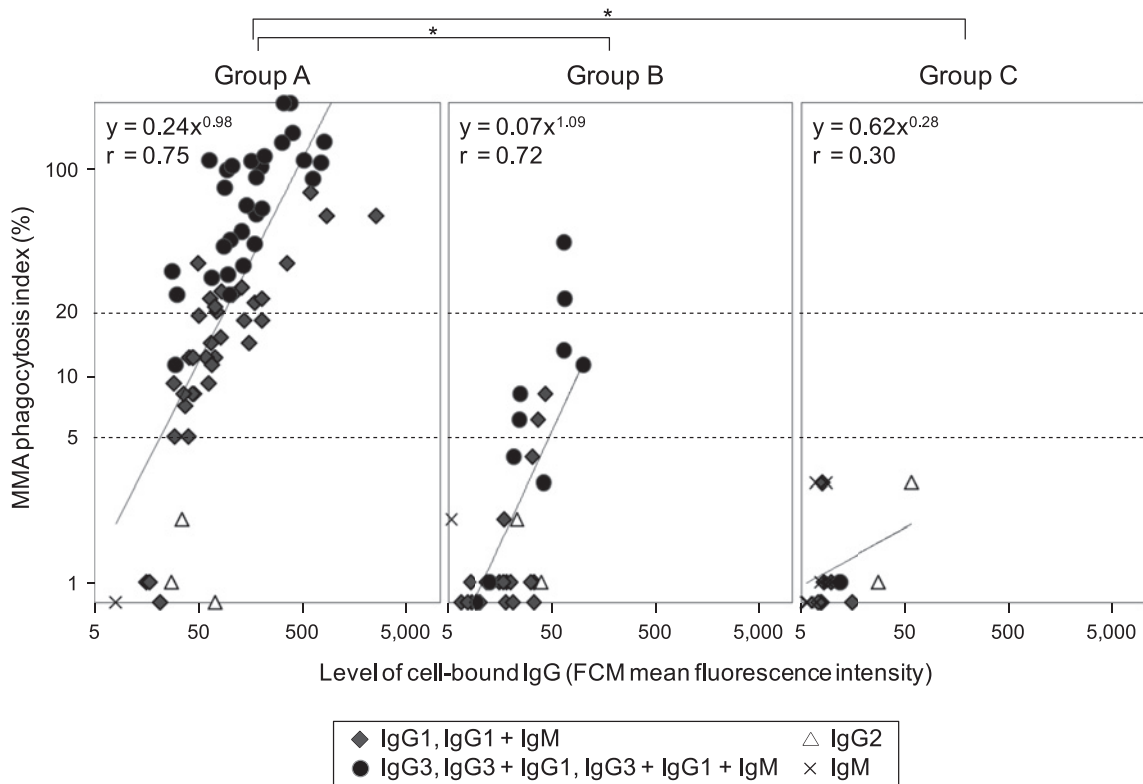


Fig. 3 Correlation of MMA phagocytosis with cell-bound IgG in 123 enzyme-positive alloantibodies  
(---) Two MMA cutoff lines (5% and 20%) based on clinical data described by Arndt, et al<sup>6)</sup> \*Significant differences ( $P < 0.01$ ) with the MMA phagocytosis index.

あるため、A群は酵素法を廃止しても検出される抗体、B群は酵素法を廃止しても高感度な間接抗グロブリン法を行っていれば検出される抗体、C群は酵素法を廃止すると検出されなくなる抗体と考えることができる。そこで、各群の抗体の臨床的意義を比較することにより、酵素法の必要性について検討を行った。抗体の臨床的意義は、特異性と反応温度域（特に間接抗グロブリン法）に関連させながら積み上げられた実際の輸血症例に基づいて評価されるものだが、今回はPooleらの総説<sup>19)</sup>を参考に、抗体の特異性、アイソタイプ、感作量、さらに抗体の機能面から臨床的意義を予測した。

各群の臨床的意義を抗体の特異性からみると、臨床的意義が高いと考えられるRh抗体、抗D<sup>i</sup>、抗D<sup>i</sup>、抗Sを含む割合は、A群が90%、B群が91%、C群が50%であったことから、C群の臨床的意義はA、B群に対して低いと予測された(Table 1)。また、アイソタイプでも、C群はA、B群に対して、溶血反応との関連性が高いIgG1とIgG3の割合が少なかった(Fig. 1)。さらに、IgG抗体感作量についても、C群が最も低かった(Fig. 2)。抗体の機能試験として実施したMMAでは、A群の貪食率がB、C群に比較して有意に高かった(Fig. 3)。MMAの貪食率と抗体の臨床的意義の関係については、Arndtら<sup>6)</sup>が溶血性輸血副作用のリスクを予測するためのカットオフ値を報告している。彼らは、過去20年間の不適合輸血症例を調査し、溶血性輸血副作用の有無と<sup>51</sup>Cr標識赤血球寿命試験の結果に基づいたROCカーブ分析を行い、貪食率が5%以下であれば、長期の輸血効果は保証できないが、溶血性輸血副作用のリスクはまずないとしている。一方、貪食率が5.1~20%、さらに20%より大きい場合には、溶血性輸血副作用の発症頻度がそれぞれ33%と64%であったと述べている。そこで、貪食率が0~5%を陰性、5.1~20%を弱陽性、>20%を強陽性として各群の抗体を判定してみると、A群では59%が強陽性、28%が弱陽性、B群では6%が強陽性、18%が弱陽性であった。この陽性頻度に、先に述べた溶血性輸血副作用の発症頻度を考え合わせると、もし、不適合輸血が行われた場合、A群では47%、B群では10%の抗体が溶血性輸血副作用に関与する可能性があるとして予測された。一方、C群の抗体は全て陰性であり、溶血性輸血副作用に関与する可能性は低いと予測された。溶血性輸血副作用の有無は、輸血される患者の状態など、多くの要因に影響されるため、この予測では不十分と言わざるを得ないが、臨床的意義の高い抗体がA、B群に含まれることは間違いないと考えられた。

以上をまとめると、抗体の特異性、アイソタイプ、感作量、機能の何れの面からみても、C群の臨床的意義はA、B群よりも低いと考えられた。もちろん、今回

の結果からC群には臨床的意義がないとは結論できない。しかし、臨床的意義が高い抗体はA、B群に含まれることから、PEG-IATやMTS-IATといった高感度な間接抗グロブリン法を実施していれば、酵素法を行う意義は低いと考えられた。そして、これを実践したのが先に述べたReisnerら<sup>18)</sup>の報告であり、酵素法の意義が最終的に判断されるためには、こうしたエビデンスの積み重ねが必要であろう。平成21年に全国1,536施設に対して行われたアンケート調査では、7割以上の施設がPEG-IATやカラム凝集法による間接抗グロブリン法を実施している<sup>2)</sup>。我が国においても、酵素法の必要性を議論するには十分な環境が整いつつあり、最近に関連する報告も散見されるようになってきた<sup>20)~24)</sup>。

抗体スクリーニングの検査法には、臨床的意義がある抗体を検出できる感度とともに、高い特異性も求められる。抗体スクリーニングの目的は溶血性輸血副作用の防止であるため、検出感度は重要であるが、単に検出感度だけを求めて検査法を選択すると、臨床的意義のない抗体も検出して、場合によっては必要な輸血を遅延させてしまう恐れがある。その最たる検査法が、酵素法であろう。抗体スクリーニングにおいて、感度と特異性の面で最もバランスがとれている検査法は間接抗グロブリン法であることは論じるまでもない。我々は、抗体スクリーニングに酵素法を組み入れることを廃止して、その実施に要した労力や費用を間接抗グロブリン法の高感度化や精度管理に向けたほうが、より安全な輸血がスムーズに実施できると考える。

本論文の要旨は第58回日本輸血・細胞治療学会総会（名古屋市）において発表した。

## 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局血液対策課：輸血療法の実施に関する指針（改定版），2007。
- 2) 日本臨床衛生検査技師会：平成21年度「日臨技臨床検査精度管理調査報告書」，輸血部門，2009。
- 3) Issitt PD, Anstee DJ: Principle of serological methods. Applied blood group serology, 4th ed, Montgomery Scientific Publications, Durham, 1998, 43-69。
- 4) 佐々木正照, 山田美加子, 金子礼子, 他：各種検査法における赤血球IgG性同種抗体の検出感度の検討。日本輸血学会雑誌，49：640-645, 2003。
- 5) 日本臨床衛生検査技師会：不規則抗体検査，新輸血検査の実際 初版，東京，2009, 35-42。
- 6) Arndt PA, Garratty G: A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. Transfusion, 44: 1273-1281, 2004。

- 7) Issitt PD, Combs MR, Bredehoeft SJ, et al: Lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell alloantibodies. *Transfusion*, 33: 284—293, 1993.
- 8) Chapman JF, Elliott C, Knowles SM, et al: Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfusion medicine*, 14: 59—73, 2004.
- 9) 赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン作成委員会: 赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン(会告 VIII). *日本輸血学会雑誌*, 49: 398—402, 2003.
- 10) 石丸 健, 天満智佳, 藤原義一, 他: 一次免疫応答により惹起されたと考えられる遅発性溶血性輸血副作用の1症例. *日本輸血学会雑誌*, 50: 768—773, 2004.
- 11) 北澤淳一, 猪俣真喜子, 鎌田千鶴, 他: 一次免疫反応により産生された抗 C + e 抗体による遅発性溶血性輸血副作用を呈した1例. *日本輸血学会雑誌*, 51: 594—600, 2005.
- 12) Vamvakas EC, Pineda AA, Reisner R, et al: The differentiation of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reaction: incidence and predictors of hemolysis. *Transfusion*, 35: 26—32, 1995.
- 13) Ness PM, Shirey RS, Thoman SK, et al: The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. *Transfusion*, 30: 688—693, 1990.
- 14) Pineda AA, Vamvakas EC, Gorden LD, et al: Trends in the incidence of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reactions. *Transfusion*, 39: 1097—1103, 1999.
- 15) Redman M, Regan F, Contreras M: A prospective study of the incidence of red cell allo-immunisation following transfusion. *Vox Sang*, 71: 216—220, 1996.
- 16) Ramsey G, Smietana SJ: Long-term follow-up testing of red cell alloantibodies. *Transfusion*, 34: 122—124, 1994.
- 17) Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM: RBC antibody persistence. *Transfusion*, 40: 1127—1131, 2000.
- 18) Reisner R, Butler G, Bundy K, et al: Comparison of the polyethylene glycol antiglobulin test and the use of enzymes in antibody detection and identification. *Transfusion*, 36: 487—489, 1996.
- 19) Poole J, Daniels G: Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev*, 21: 58—71, 2007.
- 20) 高橋俊二: 酵素法は必要か?—酵素法の目的と効果—, *日本輸血学会雑誌*, 52: 209, 2006.
- 21) 楠本壽子, 柴田洋子, 矢田久美: 不規則抗体検査法における酵素法の実施意義について. *日本輸血学会雑誌*, 52: 258, 2006.
- 22) 関戸啓子, 嘉成孝志, 増田和子, 他: 不規則抗体スクリーニング検査における酵素法の有用性. *日本輸血・細胞治療学会雑誌*, 53: 252, 2007.
- 23) 菊池正美, 安田広康, 奥津美穂, 他: 酵素法を省略した不規則抗体スクリーニング検査. *日本輸血・細胞治療学会雑誌*, 53: 252, 2007.
- 24) 安田広康, 菊池正美, 奥津美穂, 他: PEG-IAT と酵素法によっても検出不可能であった抗 Jk<sup>a</sup> による遅発性血清学的輸血反応. *日本輸血・細胞治療学会雑誌*, 54: 244, 2008.

## CLINICAL SIGNIFICANCE OF ENZYME TECHNIQUES IN IRREGULAR ANTIBODY SCREENING

*Wataru Ohashi, Ken Ishimaru, Chika Tenman, Shinichiro Sato, Toshiaki Kato and Hisami Ikeda*

Hokkaido Red Cross Blood Center

### **Abstract:**

**Background:** Enzyme techniques are highly sensitive assays for the detection of weak or developing Rh antibodies. Therefore, many facilities in Japan prefer to use enzyme techniques for irregular antibody screening. However, enzyme techniques often detect cold antibodies and benign autoantibodies. The purpose of this study was to evaluate the clinical significance of enzyme techniques in irregular antibody screening.

**Methods:** Antibodies detected by enzyme techniques (n = 123) were tested by the indirect antiglobulin test (Sal-IAT), polyethylene glycol test (PEG-IAT) and MTS gel system (MTS-IAT). Clinical significance of the antibodies was evaluated according to Ig isotype, level of cell-bound IgG, and monocyte monolayer assay (MMA).

**Results:** Of 123 samples, 71 were positive by all IAT (group A), 34 were positive by PEG-IAT and/or MTS-IAT (group B), and 18 were negative by all IAT (group C). In groups A and B, levels of cell-bound IgG were high and most Ig isotypes were IgG1. In group C, levels of cell-bound IgG were lower and IgM was the main isotype. The MMA-positive rate of group A and B were 87% and 24%, respectively, while that of group C was 0%.

**Conclusion:** PEG or MTS-IAT was able to detect clinically significant antibodies. Most antibodies detected by enzyme techniques alone were clinically non-significant. Enzyme techniques appear to be unnecessary for antibody screening.

### **Keywords:**

enzyme techniques, antibody screening, clinical significance of antibodies