Preparation of Quality Control Slides and Establishment of an External Quality Assessment Program for Five Special Stains Routinely Used in Diagnostic Hematology

Jung Kwon Kim¹, Ji Yeon Sohn¹, Sang-Yong Shin¹, Ju Young Oh¹, Kyoung Joo Lee², and Sun-Young Kong^{1,2,3}

¹Department of Laboratory Medicine, Center for Diagnostic Oncology,

²Department of System Cancer Science, Graduate School of Cancer Science and Policy, ³Division of Cancer Epidemiology and Prevention, Research Institute, National Cancer Center, Goyang, Korea

Corresponding author:

Sun-Young Kong
Department of Laboratory Medicine, Center for Diagnostic Oncology, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10408, Korea
Tel: +82-31-920-1735
Fax: +82-31-920-1268
E-mail: ksy@ncc.re.kr

pISSN: 2384-2458
eISSN: 2288-7261

Background: In general, internal/external quality control of special stains for diagnosis of hematological diseases may be unavailable in a clinical laboratory owing to the lack of an appropriate positive/negative control material.

Methods: We developed a protocol on positive/negative control materials for five special stains (iron, myeloperoxidase [MPO], periodic acid-Schiff [PAS], Sudan black B [SBB], and alpha-naphthyl acetate esterase [ANAE]) using a hematological malignant cell line. First, we compared stainability of seven cell lines (HL-60, THP-1, K562, Kasumi-1, KG-1, KO52, and NKM-1), then confirmed duration of stable stainability. A proficiency test using external quality control materials was conducted at eleven institutions, which participated voluntarily.

Results: HL-60 and THP-1 cell lines, which showed good stainability among the seven cancer cell lines, were selected as external quality control materials. The stainability of a prepared cell line fixed on control slides was stable for 3–4 weeks (MPO, SBB, and PAS) or 9–10 weeks (ANAE). The stainability of paraffin-embedded control material for iron stain was stable for 3 months. The results from 11 institutions were the same on iron, MPO, SBB, and ANAE. Nevertheless, two of 10 institutes showed discrepant results on PAS.

Conclusions: In this study, we demonstrated that cell lines could serve as a standard quality control material for special stains. Most institutions showed representative results on special stains except for PAS. This protocol for special stain may be useful as an external or internal quality control in a haematology laboratory.

(J Lab Med Qual Assur 2017;39:1-8)

Key Words: Cytochemical stain, Laboratory proficiency testing, Quality control

서론

진단혈액 분야의 특수염색은 종류가 매우 다양하지만 그 중에서 iron, myeloperoxidase (MPO), periodic acid-Schiff (PAS), Sudan black B (SBB), alpha-naphthyl acetate

esterase (ANAE) 등이 널리 시행되고 있다[1,2]. 특수염색은 대부분 수기로 시행되는데 검사자의 숙련도, 염색시약의 질, 온도 및 습도를 비롯한 여러 요인들에 의해 염색상이 영향받을 수 있다[3,4]. 특수염색은 일상적으로 시행되지 않고 백혈병 등의 특수한 질환의 진단 시에 시행되므로[5] 모든 병원에서

추고 슬라이드에 피펫으로 30 μ L 분주하여 PAS 염색을 시행하였으나 세포질의 염색상을 판독할 수 없었고, 1 μ L당 400개의 세포 부유액 100 μ L로 cytopsin을 이용하여 슬라이드를 제작함으로써 세포핵과 세포질을 관찰할 수 있는 시야를 충분히 확보할 수 있었다(Fig. 2). 7종의 암세포주(THP-1, K562, Kasumi-1, HL-60, KO52, NKM-1, KG-1) 중 PAS 염색상이 좋지 않은 KO52 및 NKM-1과 세 가지 염색에서 모두 음성인 KG-1은 제외한 후 실험을 진행하였다. 나머지 4종의 암세포주(THP-1, K562, Kasumi-1, HL-60) 중에서는 HL-60 및 THP-1의 염색상이 가장 우수하였다(Fig. 3). Human promyelocytic leukaemia cell line인 HL-60은 MPO 및 SBB 염색에서 양성이고[7], human acute monocytic leukaemia cell line인 THP-1은 PAS 및 ANAE 염색에서 양성이었다[8]. Iron 염색용 슬라이드는 동물(쥐)의 양성/음성 간조직을 사용하여 파라핀 블록으로 절편을 만들어 제작하였다.

2. 염색성 유지기간 검증

MPO, SBB, PAS는 formalin과 ethanol로 고정했을 때 3-4주까지 염색성이 유지되었고, ANAE는 formalin-acetone으로 고정했을 때 9-10주까지 염색성이 유지되었다(Fig. 4). 파라핀 블록으로 제작된 iron 염색용 절편은 3개월 이상 염색성이 유지되었다.

3 외부정도관리 시범사업 시행

1) 검사실별 염색방법 조사

전체 11개 기관 중 5가지 특수염색을 모두 시행하는 기관은 3개였다. Iron은 11개 기관, PAS와 MPO는 10개 기관, ANAE는 8개 기관, SBB는 3개 기관에서 시행하였다. ANAE 염색 후 NaF에 의한 억제 여부를 확인하는 기관은 3개였고, NaF에 의한 ANAE의 억제 여부를 확인하는 대신 ANAE와 alpha-naphthyl butyrate esterase 염색을 함께 시행하는 기관은 2개였다. 참여기관에서 특수염색 시 사용하는 염색시약의 종류와 소요시간은 Table 1에 나타내었다.

각 항목마다 고정/염색/대조염색 단계별 시약종류 및 소요시간은 기관마다 차이가 있었다. Iron 염색은 고정 시 methanol, formalin, 또는 formalin vapour를 사용하거나 고정을 거치지 않고 바로 염색을 하는 기관도 있었다. 염색액은 HCl+potassium ferrocyanide를 혼합하여 사용하였다. 대조염색은 nuclear fast red, safranin O, neutral red solution, Harris' hematoxylin, 또는 basic fuchsin solution+neutral red solution을 사용하였다.

PAS는 고정 시 PAS 고정액, formalin+ethanol, 또는 methanol을 사용하였고 염색액은 periodic acid 후 Schiff solution을 혼합하여 사용하였다. 대조염색은 Harris' hematoxylin, Mayer hematoxylin, Gill's hematoxylin 또는 Carrazi's hematoxylin을 사용하였다.

Fig. 2. Comparison of stainability by different slide preparation methods. (A, B) A direct smear of a suspension of HL-60 cells ($4.5 \times 10^5/\mu\text{L}$) and PAS stain. (C, D) Optimization of the cell density ($4.0 \times 10^4/\mu\text{L}$) with cytopsin and PAS stain. Stainability (HL-60: PAS negative) and cytomorphology were adequate for evaluation in C and D. Abbreviation: PAS, periodic acid-Schiff.

Fig. 3. A comparison of stainability of each cancer cell line. The HL-60 and THP-1 cell lines were selected owing to acceptable stainability and a combination of positive/negative controls for each special stain. Abbreviations: MPO, myeloperoxidase; PAS, periodic acid-Schiff; SBB, Sudan black B; ANAE, acid alpha-naphthyl acetate esterase; NaF, sodium fluoride.

Fig. 4. The duration of stable stainability of each stain. (A) The stainability of MPO and SBB (THP-1 cell line) was stable for 3-4 weeks. The stainability of PAS (HL-60 cell line) was stable for 3-4 weeks. (B) The stainability of ANAE (THP-1 cell line) was stable for 9-10 weeks. Abbreviations: MPO, myeloperoxidase; PAS, periodic acid-Schiff; SBB, Sudan black B; ANAE, acid alpha-naphthyl acetate esterase; NaF, sodium fluoride. The numbers represent weeks after slide preparation.

MPO는 고정 시 formalin+ethanol이나 methanol을 사용하였고, 상용 키트를 사용할 경우 고정과 염색을 동시에 진행하였다. 상용 키트로 는 NEW-PO-K stain kit (Muto Inc., Tokyo, Japan) 또는 PO-K stain kit (Muto Inc.)가 사용되었고, 시약을 조제하여 사용할 경우 peroxidase 염색시약 (O-toluidine+absolute ethanol+distilled water (DW))을 여과한 뒤 H₂O₂를 사용하였다. 대조염색에는 Wright counter stain, Giemsa's stain solution, Wright Giemsa, safranin O 또는 Harris' hematoxylin을 사용하였다.

SBB는 고정 시 formalin+ethanol이나 formalin vapour

를 사용하였고, 염색액은 SBB stock solution+SBB buffer solution (KH₂PO₄+phenol+ethanol+DW) 또는 상용 SBB kit (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 대조염색으로는 safranin O, Wright stain+buffer solution, 또는 Wright+Giemsa를 사용하였다.

ANAE는 고정 시 formalin-acetone mixture (Na₂HPO₄+KH₂PO₄+acetone+DW+formalin), Esterase kit 내 고정액 또는 formalin vapour를 사용한다. 염색시약은 pararosanilin solution+sodium nitrite+phosphate buffer+α-naphthyl acetate solution으로 조제해서 사용하거나 상용 Esterase kit

Table 1. Staining reagents and time required for special stains

	Institutions	Participants (%)	Staining reagents	Reaction time (min)
Iron	11	11 (100)	HCl+potassium ferrocyanide	30–12
Myeloperoxidase	10	6 (60)	PO-K stain kit (Muto Inc., Tokyo, Japan)	4–10
	10	4 (40)	Peroxidase solution (O-toluidine+absolute ethanol+DW)	5–10
Periodic acid-Schiff	10	10 (100)	Periodic acid (0.5%–5%), Schiff solution	5–20, 10–40
SBB	3	2 (66)	SBB stain kit (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)	20–60
	3	1 (33)	SBB solution (KH ₂ PO ₄ +phenol+ethanol+DW)	30
ANAE	8	6 (75)	ANAE solution (pararosanilin solution+sodium nitrite+phosphate buffer+ α -naphthyl acetate solution)	20
	8	2 (25)	Esterase kit (Muto Inc.)	30
NaF	3	2 (66)	Esterase kit+NaF	30
	3	1 (33)	ANAE solution+NaF	40

Abbreviations: DW, distilled water; SBB, Sudan black B; ANAE, acid alpha-naphthyl acetate esterase; NaF, sodium fluoride.

(Muto Inc.)를 사용하였다. NaF에 의한 억제 여부를 판정할 경우에는 위의 염색시약에 NaF를 첨가하였다. 대조염색에는 Harris' hematoxylin, Mayer hematoxylin 또는 esterase kit 내 Carrazi hematoxylin이 사용되었다.

2) 특수염색 판독결과 비교

Iron은 11개 기관 모두에서 increased/decreased 여부 판정결과가 일치하였고, grade는 평균 4.6, 표준편차 ± 0.7 로 고른 결과를 나타내었다. MPO는 10개, SBB는 3개 기관에서 1번/2번 검체에 대해 각각 negative/positive로 보고하였고 이는 예상결과와 일치하였다. ANAE 염색을 행하는 10개 기관 중 NaF 처리를 시행하지 않는 7개 기관에서는 1번/2번 검체에 대해 각각 ANAE negative/positive로 보고하였고, NaF 처리를 시행하는 3개 기관에서는 ANAE negative/positive and inhibited by NaF로 예상과 일치하는 결과를 보였다. PAS 염색의 경우 10개 기관 중 8곳은 1번/2번 검체에 대해 각각 positive/negative로 보고하여 예상결과와 일치한 반면, 2곳에서 negative/negative, negative/positive로 보고하였으며, 예상결과와 일치한 8개 기관 중 3곳에서는 a few positive로 판독하였다(Table 2, Fig. 5).

또한 각 기관에서 판독한 결과와 국립암센터에서 판독한 결과가 대부분 일치하였으나, PAS에서 판독 차이가 있었던 경우가 1건 있었다(그 기관에서는 positive로 판독하였으나 본원에서는 negative로 판독됨).

Table 2. Summary of the proficiency test for special stains

	No. of participating institutions	Agreement with expected results	Discrepant results
Iron	11	11	0
Myeloperoxidase	10	10	0
Periodic acid-Schiff	10	8	2
Sudan black B	3	3	0
Acid alpha-naphthyl acetate esterase	8	8	0
Sodium fluoride	3	3	0

고찰

5종의 주요 특수염색 검사항목(Iron, PAS, MPO, SBB, ANAE)의 외부정도관리를 위하여 HL-60 및 THP-1 암세포주를 선정하여 양성/음성 대조 슬라이드를 제작하였다. 슬라이드에 도말된 정도관리 검체를 고정하고 보관하면 MPO, SBB, PAS는 3-4주까지 염색성이 유지되었고, ANAE, NaF는 9-10주까지 염색성이 유지되었다. Iron 염색용 파라핀 절편은 3개월 이상 염색성이 유지되었다. 11개 기관을 대상으로 시범적 외부정도관리를 시행한 결과, 4가지(iron, MPO, SBB, ANAE) 항목에서는 참여기관 모두 같은 결과를 보고하였다. PAS 염색용 1번 검체의 경우 일부 기관에서는 뚜렷한 양성 소견이 관찰되었으나 다수의 기관에서 염색성이 약하거나 음성 소견이었다. 따라서 PAS 염색의 경우 양성 염색성을 보이는 다른 암세포주를 추가로 확보하는 한편, 염색성이 좋지 않았던 기관에서는 염색법의 개선을 고려하는 것이 추천된다.

지금까지 국내에는 진단혈액 분야 특수염색에 대한 외부정

	Iron		MPO		PAS		SBB		ANAE		NaF	
Sample no.	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Expected results	Increased	Decreased	Negative	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive	NA	Inhibited
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												

Fig. 5. Staining results on all 11 participating institutions. The red dashed-line square box indicates discrepant results. Abbreviations: MPO, myeloperoxidase; PAS, periodic acid-Schiff; SBB, Sudan black B; ANAE, acid alpha-naphthyl acetate esterase; NaF, sodium fluoride; NA, not applicable.

도관리 프로그램이 없어[9,10] 대신 검사실 간 비교검사가 실시되어 왔다. 이는 보편적이고 표준적인 염색상을 제시하기 어렵고 시행 중인 검사기법의 문제점을 찾는 데 한계가 있다. 본 연구에서 시행한 시범적 외부정도관리에서는 참여한 11개 기관이 같은 양과 질의 암세포주 슬라이드에 염색을 시행함으로써 염색상의 수평 비교가 가능하였다. 이로 인해 정도관리의 용이성 및 보편성을 확보하여 검사결과의 신뢰성을 높일 수 있고, 또한 각 기관의 검사방법을 함께 조사함으로써 추후 검사방법 표준화를 위한 기초자료로도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

연구에 참여해 주신 전문의, 병리사 선생님들께 감사드립니다 (건강보험공단 일산병원 유종하, 서미옥/동국대학교 일산병원 허희진, 석진희/삼성서울병원 김선희, 이범세/서울아산병원 조영욱, 이명심/양산부산대학교병원 김인숙, 천정은/연세대학교 세브란스병원 송재우, 양미숙/원자력병원 장윤환, 이강원/이화여자대학교 의료원 허정원, 박상희/인제대학교 부산백병원 이자영, 김성은/인하대학교병원 문연숙, 구명숙).

이 연구는 2015년 대한임상검사정도관리협회의 학술연구과제 지원으로 수행되었다(연구과제: 15040910-1).

REFERENCES

1. Swerdlow SH; International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
2. Foucar K, Reichard K, Czuchlewski D. Bone marrow pathology. 3rd ed. Chicago (IL): American Society for Clinical Pathology Press, 2010.
3. Rosenthal NS, Farhi DC. Special stains in the diagnosis of acute leukemia. Clin Lab Med 2000;20:29-38.
4. Hollensead SC, Lockwood WB, Elin RJ. Errors in pathology and laboratory medicine: consequences and prevention. J Surg Oncol 2004;88:161-81.
5. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 2010;115:453-74.
6. Kottke-Marchant K, Davis BH. Laboratory hematology practice. Chichester: Wiley-Blackwell/International Society for Laboratory Hematology, 2012.
7. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line:

- proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987;70:1233-44.
8. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47:22-31.
9. Kwon GC, Kim J, Ra GS; Diagnostic Hematology Subcommittee, Korean Association of External Quality Assessment Service. Annual report on the external quality assessment for diagnostic hematology in Korea (2015). *J Lab Med Qual Assur* 2016;38:1-10.
10. Kwon GC, Kim J, Ra GS; Diagnostic Hematology Subcommittee, The Korean Association of Quality Assurance for Clinical Laboratory. Annual report on the external quality assessment scheme for diagnostic hematology in Korea (2014). *J Lab Med Qual Assur* 2015;37:1-11.

진단혈액 특수염색 5종의 정도관리 개선을 위한 대조군 슬라이드 제작 및 외부정도관리

김중권¹ • 손지연¹ • 신상용¹ • 오주영¹ • 이경주² • 공선영^{1,2,3}

¹국립암센터 진단검사센터 진단검사의학과, ²국제암대학원대학교 시스템중양생물학과, ³국립암센터 연구소 암역학예방연구부

배경: 혈액질환의 진단에 이행되는 특수염색은 적절한 양성/음성 대조물질이 없어서 내부 및 외부정도관리가 용이하지 않을 수 있다.

방법: 표준 세포주를 이용하여 5종의 주요 특수염색(iron, myeloperoxidase [MPO], periodic acid-Schiff [PAS], Sudan black B [SBB], alpha-naphthyl acetate esterase [ANAE])에 대한 정도관리용 슬라이드 제작 프로토콜을 개발하였다. 각각 염색성 유지기간을 검증한 뒤, 총 11개 기관이 참여하는 외부정도관리 시범사업을 시행하였다.

결과: 염색성이 가장 우수한 HL-60과 THP-1을 이용하여 양성/음성 대조 슬라이드를 제작하였다. 도말한 슬라이드 검체를 고정하고 보관하면 MPO, SBB, PAS는 3-4주까지, ANAE는 9-10주까지 염색성이 유지되었다. 파라핀 블록으로 제작한 iron 염색용 절편은 3개월 이상 염색성이 유지되었다. 시범적 외부정도관리를 시행한 결과 iron, MPO, SBB, ANAE 항목에서는 11개 참여기관 모두의 판독결과가 예상결과와 일치하였으나, PAS는 10개 기관 중 2개 기관이 예상결과와 불일치하였다.

결론: 본 연구를 통해 표준 세포주를 이용한 5가지 특수염색용 정도관리 슬라이드의 유용성을 확인하였다. PAS를 제외하고 대부분의 검사실에서 특수염색의 결과가 일치했다. 특수염색을 위한 프로토콜은 혈액학 검사실에서 외부 및 내부정도관리를 위해 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

(J Lab Med Qual Assur 2017;39:1-8)

교신저자: 공선영

우)10408 고양시 일산동구 일산로 323, 국립암센터 진단검사센터 진단검사의학과

Tel: 031)920-1735, Fax: 031)920-1268, E-mail: ksy@ncc.re.kr